

体外培育牛黄研究概况

王莉萍

(江西省抚州市第一人民医院办公室, 344000)

[摘要] 体外培育牛黄可作为天然牛黄的理想替代品,该文就其主要化学成分及其分析、药理活性、临床应用以及相关制剂及其分析等方面的最新研究进展加以综述。

[关键词] 体外培育牛黄;化学成分;药理活性;临床应用;制剂分析

[中图分类号] R286

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)11-1334-03

体外培育牛黄具有清心、豁痰、开窍、凉肝、息风、解毒等功效,用于治疗热病神昏、中风痰迷、惊厥抽搐、癫痫发狂、咽喉肿痛、口舌生疮、痈肿疔疮等症^[1]。体外培育牛黄是国家一类中药新药,药学研究表明体外培育牛黄的性状、结构、成分及其含量、药理、临床疗效与天然牛黄基本一致,无明显不良反应^[2]。

国家食品药品监督管理局已于2004年1月21日颁发《关于牛黄及其代用品使用问题的通知》,对于国家药品标准处方中含牛黄的临床急重病症用药品种(包括安宫牛黄丸等42种)和国家食品药品监督管理局批准的含牛黄的新药,可以将处方中的牛黄以体外培育牛黄替代等量投料使用,但不得以人工牛黄替代。鉴于体外培育牛黄的重要价值,其相关研究引起了全国中药企业的广泛关注和积极响应。本文就其主要化学成分及其分析、药理活性、临床应用以及相关制剂及其分析等方面的研究概述如下。

1 主要化学成分及其分析

体外培育牛黄呈类球形,棕黄色,所含主要化学成分为胆色素、胆酸、胆固醇、磷脂、肽类、氨基酸以及微量元素等,在避光、密封、防潮条件下可稳定存放3 a^[2]。

1.1 胆色素类化合物 体外培育牛黄中胆色素类化合物含量为72%~76%,其中胆红素(bilirubin)含量为25%~70%。胆红素为52个取代基排列顺序不同的同分异构体,但实际上只有型才是其唯一重要的异构体。胆红素性质不稳定,主要是由于连接吡咯环的中央亚甲基桥连对亲电基团、活性氧具有敏感性。在酸或金属离子存在下,胆红素会被氧化分解为胆绿素、尿胆素原等产物。在室温条件下,胆红素在二甲基亚砷中逐渐分解;胆红素对光照不稳定,300~600 nm波长的光波可导致其分解。胆红素不溶于水、石油醚、盐酸,易溶于二甲基亚砷、吡啶、氨性乙醇和氢氧化钠溶液。

胆红素可与蛋白质形成复合物,通过清除氧自由基、单线态氧、炎性细胞因子、病毒等发挥其解毒作用。胆红素可显著抑制大肠埃希菌、肺炎球菌和金黄色葡萄球菌等典型致病菌的增殖,并能杀灭乙型脑炎病毒,另外还具有降低动脉血压、促进红细胞再生等其他作用,临床上广泛用于治疗乙型脑炎、白血病、肝炎、肝硬化、癌症、骨质增生、关节炎等重大疾病。牛黄之

贵,贵在胆红素,由于胆红素具有多重药理活性,现已被众多学者公认为鉴别牛黄真伪、评价其质量优劣的主要指标成分。

1.2 胆酸类化合物 其中胆酸(cholic acid)含量为7%~10%,去氧胆酸(deoxycholic acid)含量为0.45%,另外还包括牛磺酸胆酸盐、甘氨酸胆酸盐等胆酸盐类。胆酸是3,7,12-三羟基-5-胆烷酸,为棱状结晶,有先甜后苦的味道。微溶于水,可溶于乙酸、丙酮和碱性溶液,易溶于乙醇、乙醚,与浓硫酸混合可形成黄色溶液显绿色荧光。去氧胆酸是3,12-二羟基胆烷酸,微溶于水,可溶于乙酸、氯仿、丙酮、乙醇、乙醚以及碱性溶液。

胆酸、去氧胆酸也是体外培育牛黄中具有生物活性的有效成分。据文献报道,胆酸、去氧胆酸及其盐类具有显著的解热作用;去氧胆酸对四联球菌、金黄色葡萄球菌、奎氏双球菌、链球菌等具有明显的抑制作用。除此之外,胆酸、去氧胆酸还具有降压、解痉、镇咳、杀灭乙脑病毒等药理活性。

1.3 脂类化合物 体外培育牛黄中胆固醇含量为2.5%~4.8%,卵磷脂含量为0.17%~0.20%。

1.4 氨基酸类化合物 总氨基酸含量为615.99 mg·(100 g)⁻¹,其中牛磺酸占游离氨基酸总量的15.86%,苏氨酸、缬氨酸、赖氨酸等占其总量的20.25%。

1.5 微量元素 体外培育牛黄中含有钙(Ca)、钠(Na)、铁(Fe)、钾(K)、铜(Cu)、镁(Mg)、磷(P)等微量元素。

针对牛黄中主要含有的胆汁酸类、胆红素类及肽类、蛋白质类等成分,丁岗等^[3]采用指纹图谱技术,对体外培育牛黄与天然牛黄的化学成分进行了对比分析研究。结果显示:体外培育牛黄与天然牛黄3个提取部位(包括酸水、酸醇和二甲基亚砷提取液)的肽类、胆汁酸类、胆红素类等成分,均基本一致,但相对含量有差异;10批体外培育牛黄3个提取部位(包括酸水、酸醇和二甲基亚砷提取液)的HPLC指纹图谱有较好的一致性,说明体外培育牛黄的工艺稳定。而4批天然牛黄的指纹图谱,尤其是胆汁酸类成分的指纹图谱差异明显,说明天然牛黄由于来源不同,导致质量不够稳定;酸水提取时,大部分游离型去氧胆酸类成分未能提取出来,直接用酸醇可以提取出各种胆汁酸。由于胆汁酸类成分的紫外吸收极弱,可用蒸发光散射器(ELSD)检测该类成分。天然牛黄之间胆汁酸类成分的相对含量有明显差异,因此胆汁酸类成分的ELSD、HPLC指纹图谱可以作为区别体外培育牛黄与天然牛黄、人工牛黄的有效手段。

[收稿日期] 2007-03-12 **[修回日期]** 2007-04-21

[作者简介] 王莉萍(1970-),女,江西抚州人,主管药师,学士,主要从事医院药学管理和研究。电话:(0)13870481216, E-mail: fzwanglp@163.com.



2 相关制剂及其分析

《中华人民共和国药典》2005年版规定采用薄层色谱扫描法和分光光度法分别测定体外培育牛黄中胆酸及胆红素的含量^[1]。方建国等^[4]曾报道采用 HPLC法测定体外培育牛黄中胆红素的含量,其色谱条件为以 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 10 μm)为固定相,以二甲基亚砜-乙腈-0.5 mol·L⁻¹醋酸铵缓冲液(以冰醋酸调节 pH值为 5.3)(6:6:7)为流动相,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 452 nm。结果表明胆红素在 0.028~0.450 mg·mL⁻¹范围内呈良好的线性关系($r=0.9999$),平均回收率($n=9$)分别为 98.8% ($RSD=0.68%$); 98.3% ($RSD=1.55%$); 99.0% ($RSD=0.77%$),该含量测定方法可用于体外培育牛黄的质量控制。

根据现有文献报道,牛黄息炎痛胶囊及牛黄肛炎宁栓均是以体外培育牛黄为主药的中药复方制剂,具有清热解毒、凉血止血、消肿镇痛的功效。为了确保制剂质量安全可控,方建国等^[5,6]采用 HPLC法以相同的色谱条件对方中体外培育牛黄建立了胆红素的含量测定方法。结果表明,胆红素与其他组分基线分离度达 1.5 以上,其理论塔板数不低于 1 000。胆红素在 0.28~4.50 μg 范围内线性关系良好($r=0.9999$),平均回收率($n=9$)分别为 99.1% ($RSD=1.0%$); 98.9% ($RSD=1.3%$); 98.2% ($RSD=1.2%$),由此可见该方法准确、快速、可行。

3 药理活性

3.1 抗炎作用 体外培育牛黄对急性炎症的渗出和慢性炎症的增生均有显著抑制作用,其抗炎作用强度与等量天然牛黄相似。以 200~800 mg·kg⁻¹灌胃给予动物 5~7 d,可显著抑制小鼠巴豆油性耳廓水肿,大鼠角叉菜胶性足趾肿胀,大鼠巴豆油肉芽囊肿的渗出和组织增生,抑制白细胞游走反应,对抗 PGE₂致毛细血管通透性增加,但不能影响肾上腺中维生素 C 的含量。提示其抗炎作用不是通过垂体-肾上腺皮质系统,而是可能通过抑制炎症组织中致炎物 PGE₂的生成而发挥作用的,此抗炎作用机制与天然牛黄相同^[7]。

3.2 耐缺氧和清除自由基作用 采用密闭缺氧实验观察小鼠在缺氧条件下的生存时间,并选择生化方法测定小鼠脑、心、肝组织匀浆及血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性以及丙二醛(MDA)的含量。结果表明体外培育牛黄能提高动物机体耐缺氧能力,明显延长缺氧小鼠的生存时间,升高其组织匀浆及血清中 SOD 活性,降低 MDA 含量,提示其具有清除机体氧自由基的能力,可减轻脂质过氧化作用对重要器官组织的损害^[8]。

3.3 抗癌作用 采用单层培养法培养 HepG2 细胞,用不同剂量体外培育牛黄作用于 HepG2 细胞,以荧光显微镜、透射电镜在不同时间点观察细胞形态的改变及其凋亡,用流式细胞仪检测 HepG2 细胞的凋亡率。结果表明,100~800 μg·mL⁻¹体外培育牛黄作用于 HepG2 细胞 48 h 后,出现细胞皱缩、核质浓缩、核碎裂、细胞起泡以及凋亡小体形成等凋亡特征性形态学改变;流式细胞直方图上可见亚二倍体峰,其不同作用时段的细胞凋亡率均显著高于空白对照组(均 $P<0.01$)。结果显示体外培育牛黄在体外具有抗癌细胞作用^[9]。

3.4 护肝作用 梁志鹏等^[10,11]通过血吸虫尾蚴皮肤敷贴法感

染家兔构建肝纤维化模型,应用体外培育牛黄复合制剂进行干预治疗,采用 Masson 染色法及图像分析仪测定肝组织胶原纤维的含量,采用 Western blot 及免疫组织化学方法检测家兔门静脉壁 ERK_{1/2}及 C-fos 的表达。结果表明,模型组家兔肝组织胶原纤维含量、ERK_{1/2}活性、C-fos 平均染色指数较正常对照组明显增加($P<0.01$),药物组肝脏上述指标比模型组明显降低,差异具有显著性($P<0.05$),提示体外培育牛黄可以明显减轻血吸虫病肝纤维化程度,可能通过影响 ERK_{1/2}/C-fos 信号途径来干预血吸虫性门静脉高压性血管病变的形成,对肝纤维化具有改善和治疗作用。

3.5 毒理学研究 采用 Ames 试验、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验以及人外周血淋巴细胞体外培养染色体畸变试验检测体外培育牛黄的诱变性,其中 Ames 试验在 1 250, 5 000, 10 000 μg·mL⁻¹浓度范围内,各浓度组 MR 值在加代谢活化剂 S₉和不加代谢活化剂 S₉两种情况时均未超过 2;微核试验在 50, 150, 500 mg·kg⁻¹3 个剂量水平,各剂量组的微核细胞百分率及嗜多染红细胞/正常红细胞比值与空白对照组比较均差异无显著性;人外周血淋巴细胞体外培养染色体畸变试验在样品浓度为 1, 10, 100 μg·mL⁻¹(不加代谢活化剂 S₉)和 1, 10 μg·mL⁻¹(加代谢活化剂 S₉)两种情况下,各处理组测得的细胞畸变率与空白对照组比较均差异无显著性。结果表明体外培育牛黄在试验剂量范围内各项诱变性试验结果均为阴性,初步显示其无致癌、致畸、致突变作用^[12]。体外培育牛黄的半数致死量 LD₅₀为 9 g·kg⁻¹,是其临床用量的 1 800 倍,表明其具有一定的安全性。

4 临床应用

4.1 治疗中风 将体外培育牛黄单味或复方(安宫牛黄丸)治疗中风(痰热闭窍证),采用随机双盲和单盲对照法,与天然牛黄单味或复方(安宫牛黄丸)对照。单味牛黄共治疗中风患者 127 例,其中体外培育牛黄治疗组 95 例,天然牛黄对照组 32 例。口服用药,每日 3 次,每次 100 mg,疗程 5 d。结果表明治疗组与对照组显效率分别为 37.90% 和 32.25%,总有效率分别为 86.30% 和 80.60%,两种牛黄均有较好的疗效,治疗组与对照组比较差异无显著性($P>0.05$)。用安宫牛黄丸共治疗 396 例患者,其中含体外培育牛黄的安宫牛黄丸治疗组 248 例,含天然牛黄的安宫牛黄丸对照组 148 例。口服用药,每日 2 次,每次 1 丸,疗程 5 d。治疗组与对照组显效率分别为 47.98% 和 47.97%,总有效率分别为 84.68% 和 84.46%,两组间比较均差异无显著性(均 $P>0.05$);ECG、GPT、BUN、血、尿、大便常规等各项检查表明,两组患者均未见明显不良反应^[13,14]。

4.2 治疗口腔疾病 以体外培育牛黄糊剂治疗复发性阿弗它溃疡(RAU)以及口腔黏膜难愈创口(HRW),每日 4 次,敷于口腔黏膜局部病损处。用药后每日复诊 1 次,RAU 组观察疗程为 3 d,HRW 组观察疗程为 5 d。以蛤疔散糊剂为对照组,治疗组共观察 69 例,显效 28 例,占 40.6%;有效 40 例,占 58.0%;总有效例数 68 例,占 98.6%,明显高于对照组(观察 39 例,总有效 31 例,总有效率 79.5%),且差异有显著性($P<0.05$)^[15]。

用体外培育牛黄糊剂(主要成分体外培育牛黄、冰片等粉

碎,用茶油调成糊剂)治疗牙菌斑性及药物性牙龈病,将其置于牙龈袋内局部病损处,表面敷薄层牙周塞治剂,局部药物保存7d后再次行洁刮治术去除残留牙石等局部刺激物。1个月后复诊记录症状和体征,观察47例,显效19例,占40.4%;有效24例,占51.1%;总有效43例,占91.5%。与局部敷牙周塞治剂对照组比较(观察49例,总有效例数37例,占75.5%),差异具有显著性($P < 0.05$)^[16,17]。

以复方牛黄片(主要成分为体外培育牛黄、重楼、虎杖,体外培育牛黄粉碎,重楼、虎杖分别提取甙体皂苷、大黄素等有效成分)治疗舌部疾病(舌扁平苔藓、舌乳头炎、舌痛症),每日3次,每次3片,疗程为2周,以艾力可片和龙血竭胶囊为对照治疗组,以舌黏膜变化和疼痛指数为考察指标。治疗组共计观察68例,显效43例,占63.2%;有效19例,占27.9%;总有效62例,占91.2%,明显高于对照组(观察61例,显效26例,占42.6%;有效24例,占39.3%;总有效例数50例,占82.0%),差异有显著性($P < 0.05$)^[18]。

4.3 治疗脓肿 将体外培育牛黄用茶油调制成糊状,以天然牛黄(京牛黄)作为对照,每天1次,涂于患处,每次0.5g,疗程为5d。观察33例,痊愈16例,占48.5%;显效5例,占15.2%;有效10例,占30.3%;总有效31例,占93.9%。与对照组比较(观察30例,总有效28例,占93.3%),疗效差异无显著性($P > 0.05$)^[19]。

4.4 治疗乙型脑炎 蔡红姣等^[20]采用随机双盲和单盲对照法,以含天然牛黄的安宫牛黄丸为对照,观察含体外培育牛黄的安宫牛黄丸治疗暑温风痰闭窍证(流行性乙型脑炎)的临床疗效及安全性。治疗组观察182例,痊愈108例,占59.3%;显效64例,占35.2%;有效9例,占5.0%;总有效181例,占99.5%。与对照组比较(痊愈49例,占62.8%;显效20例,占25.6%;有效7例,占9.0%;总有效76例,占97.4%)差异无显著性($P > 0.05$)。ECG及实验室各项检查表明,两种安宫牛黄丸均具有较好的疗效,对患者无明显不良反应。

郑志想等^[21]将体外培育牛黄制成丸剂治疗乙型脑炎,口服每日1粒,以脑血活素治疗及其他常规治疗作为对照,以临床体征及后遗症的发生为考察指标。体外培育牛黄治疗组观察45例,显效36例,占80.0%;有效9例,占20.0%;总有效45例,占100.0%。与对照组比较(观察40例,显效21例,占52.5%;有效17例,占42.5%;无效2例,占5.0%;总有效38例,占95.0%),差异有显著性($P < 0.05$)。

4.5 治疗溃疡性结肠炎 采用含体外培育牛黄的消炎栓治疗溃疡性结肠炎,选择溃疡性结肠炎患者184例,随机分为两组,治疗组(体外培育牛黄消炎栓)观察92例,近期痊愈41例,占44.6%;好转38例,占41.3%;总有效79例,占85.9%。对照组(口服柳氮磺吡啶胶囊)观察92例,近期痊愈26例,占28.3%;好转43例,占46.7%;总有效69例,占75.0%,两组比较总有效率差异有显著性($P < 0.05$),结果表明含体外培育牛黄的消炎栓治疗溃疡性结肠炎具有良好疗效^[22]。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 120 - 122
- [2] 鲍凤, 鲁先华. 牛黄乙醇温敷液用于预防化疗性静脉炎的效果观察[J]. 护理学杂志, 2006, 17(12): 26
- [3] 丁岗, 盛龙生, 李明慧, 等. 体外培育牛黄与天然牛黄指纹图谱的比较研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 309 - 312
- [4] 方建国, 王文清, 蒋平, 等. 反相高效液相色谱法测定体外培育牛黄中胆红素的含量[J]. 医药导报, 2006, 25(7): 694 - 695
- [5] 方建国, 王文清, 蒋平, 等. 牛黄息炎痛胶囊中胆红素的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(3): 198 - 200
- [6] 王文清, 方建国, 蒋平, 等. 牛黄肛炎宁栓中胆红素和盐酸小檗碱的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(11): 658 - 661
- [7] 杜佐华, 蔡红姣, 杨荣光, 等. 体外培育牛黄抗炎作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 1996, 7(1): 27 - 29
- [8] 蔡红姣, 汪世元, 刘烈刚, 等. 体外培育牛黄耐缺氧和清除氧自由基作用研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(6): 20 - 22
- [9] 汪世元, 陈孝平, 蔡红姣, 等. 体外培育牛黄诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡的实验研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2005, 34(6): 754 - 756
- [10] 梁志鹏, 杨镇, 蔡红姣, 等. 体外培育牛黄制剂对实验性血吸虫病家兔肝纤维化组织细胞外基质的影响[J]. 广东医学, 2005, 26(8): 1044 - 1045
- [11] 梁志鹏, 杨镇, 蔡红姣, 等. 体外培育牛黄制剂对实验性血吸虫病家兔肝纤维化门静脉壁 ERK1/2 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2005, 21(18): 1994 - 1996
- [12] 徐以平, 宋瑞琨, 石年, 等. 体外培育牛黄的诱变性研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2003, 15(1): 35
- [13] 蔡红姣, 张晓琴, 涂晋文, 等. 体外培育牛黄与天然牛黄的2种安宫牛黄丸治疗卒中疗效与安全性比较研究[J]. 中医药临床杂志, 2004, 16(5): 417 - 419
- [14] 蔡红姣, 张晓琴, 李承晏, 等. 体外培育牛黄治疗卒中的临床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(4): 287 - 289
- [15] 张延琳, 王嘉陵, 李明, 等. 体外培育牛黄糊剂治疗口疮类病损的临床疗效观察[J]. 临床口腔医学杂志, 2002, 18(3): 219 - 220
- [16] 张延琳, 王嘉陵, 张弘, 等. 体外培育牛黄糊剂治疗牙龈病的疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(5): 290 - 291
- [17] 张延琳, 廖永芳, 林正斌, 等. 肾移植术后环孢素A所致药物性牙龈病的治疗[J]. 中华器官移植杂志, 2003, 24(3): 151 - 152
- [18] 张延琳, 王嘉陵, 蒋英, 等. 复方牛黄片治疗舌部疾病的临床疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(4): 230 - 231
- [19] 谌章庆, 蔡红姣, 赖世隆, 等. 体外培育牛黄治疗脓肿一期临床试验分析[J]. 同济医科大学学报, 1998, 27(1): 69 - 70
- [20] 蔡红姣, 张晓琴, 麦根荣, 等. 含体外培育牛黄的安宫牛黄丸治疗流行性乙型脑炎的临床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 217 - 219
- [21] 郑志想, 付红刚. 体外培育牛黄丸治疗乙脑疗效观察[J]. 中华医学丛刊, 2003, 3(1): 75
- [22] 朱伟文, 林佑武. 体外培育牛黄消炎栓治疗溃疡性结肠炎92例疗效观察[J]. 中药材, 2006, 29(9): 1003 - 1004