

关于构建妊娠期应用中药安全性评价体系的思考

宋殿荣^{1*} 郭洁² 张巍¹ 王雅楠¹

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津市河北区真理道 316 号, 300150; 2. 天津中医药大学)

基金项目: 国家中医药管理局中医药行业科研专项资助项目(200707011)

* 通讯作者: songdr58@126.com, (022)60335423

[摘要] 妊娠期应用中药在世界范围存在一定的普遍性,但目前国内外尚缺乏中药胚胎毒性研究的系统方法和评价体系。我们分析了妊娠期应用中药的现状 & 安全性研究的历史背景,根据妊娠期生理特征及中药自身特点,提出了以血清药物化学和血清药理学为理论基础,综合现代高效液相色谱质谱联用和胚胎干细胞体外实验方法为核心技术的中药妊娠期应用安全性研究方法。通过对中药—含药血清—胚胎蓄积组分的综合评价,划分中药妊娠期应用的安全性等级,以初步构建妊娠期应用中药安全性的评价体系。

[关键词] 妊娠期; 妊娠用药; 中药安全性; 评价体系

近年来随着国际上对中医药客观疗效的认可,中医药在世界范围内得到了更加广泛的应用,特别是妊娠期中药的应用在世界范围存在一定的普遍性,其重要原因是大多数人认为中药为天然物质,对人体无害。然而由于历史条件限制,许多常用中药上市前未经过严格的生殖毒性及遗传毒性安全性测试与危险评估,严重制约了中医药的国际交流与发展,这与目前国内尚缺乏具有中医药特色的中药胚胎毒性研究方法 & 评价体系不无关系。本课题组承担了 2007 年国家中医药管理局中医药行业科研专项项目——“妊娠期应用中药安全性评价的关键技术研究”,现就有关问题提出讨论。

1 妊娠期中药应用状况的回顾

1991 年世界卫生组织(WHO)对不同国家和地区妊娠期中药应用状况的调查显示,约有 86% 的妊娠妇女在妊娠期接受过药物治疗,且每位妊娠妇女平均接受 2.9 种处方药,79% 的妊娠妇女平均服用 3.3 种药^[1]。近年来,中医药在世界范围得到了更加广泛的应用。Broussard 等^[2]通过美国新生儿缺陷预防研究项目(The National Birth Defects Prevention Study)对 1998 至 2004 年来自 10 个中心 4239 例妊娠妇女研究发现,在孕期中药使用率为 9.4%,并且多数在妊娠期前 3 个月内使用,据此估计,美国每年大约有 395000 例新生儿在孕期存在中药暴露情况。Zaffani 等^[3]随机对 1044 例意大利女性的调查显示,35.23% 的妊娠妇女在妊娠阶段存在使用中药情况。Fakeye 等^[4]对尼日利亚 595

例妊娠妇女调查显示,67.5% 的妊娠妇女存在使用中药情况,Holst 等^[5]也发现,在英国妊娠妇女存在中药使用情况。Yeh 等^[6]报道,在台湾 2006 年妊娠妇女中 20.6% 存在应用中药情况。在澳大利亚^[7]对 2526 例调查者进行的研究显示,20.26% 妊娠妇女存在妊娠期使用中药情况。在土耳其和伊朗妊娠期使用中药情况也很普遍^[8]。上述结果均显示,妊娠期中药的应用在世界范围存在一定的普遍性,其重要原因是大多数人认为,中药为天然物质,对人体无害^[9-10]。我国妊娠妇女使用中药的现象则更为普遍。

据美国 1997 年 11 月至 2000 年 12 月间的一项调查显示,在 50 多万个不良事件中 7111 例是关于婴儿与儿童不良药物反应的报告,其中 1/5 是因母亲在妊娠期、分娩期或哺乳期用药所致。美国平均每年有 243 名 2 岁以下的儿童由于围产期用药而死亡,而其中 100 例(41%)发生在妊娠的第一个月中^[11]。随着人类生存质量的提高和医疗保健条件的不断改善,围产期安全用药已经日益受到全社会的普遍关注。在我国尽管 79.30% 的被调查者认识到中药存在不良反应,但中药仍为妊娠妇女患病时的首选药,使用最多的是具有保胎和清热解毒、化痰止咳作用的中药达用药构成比的 41.62%^[11]。由于历史条件的限制,许多常用中药上市前未经过严格的生殖毒性及遗传毒性的安全性测试与危险评估。因此,由药物导致的妊娠危害并不少见,如清热解毒中药大青叶和板蓝根有直接兴奋子宫平滑肌的作用,

量大可导致早产,妊娠妇女应慎用^[12]。随着植物药毒理学研究的不断深入,发现许多植物药或单体成分具有致癌、致突变和致畸作用^[13-15],如马兜铃酸、昆明山海棠、槟榔等具有致突变和致癌作用,天花粉蛋白、青蒿素等具有胚胎毒性。而另一方面,由于对用药危害性的恐惧,部分妊娠妇女患病后盲目地拒绝治疗,致使病情加重。因此,客观科学评价中药妊娠期应用的安全性是一个不容忽视的问题。

2 妊娠期应用中药安全性认识的历史背景

美国食品和药品监督管理局(FDA)在1966年提出了《人体使用药物安全性评价生殖发育毒性指南》,并颁布了妊娠期用药安全性分级。随后世界各国均以此为基础,先后制定了有关农产品、化学品、药品、食品等的生殖发育毒性试验指南及妊娠用药分级。各国妊娠期用药分级制度基本相同,妊娠妇女用药一般分为4~5级。A级:动物和临床数据未显示对胎儿有危害的药物。D级:药物对胎儿有风险或怀疑药物对胎儿有危害的药物,利可能大于弊。X级:为禁用于妊娠妇女的药物。B~C级:一般为灰色区,即没有充分的临床数据来说明妊娠期是否适宜用这类药。

我国古代对妊娠期用药危险性已有所认识,古代医家在长期的医疗实践中,观察到某些药物具有损害胎元以致胎动不安、滑胎、堕胎等副作用,将其列为妊娠禁忌药,是中药药性理论的重要内容之一。历代本草均有对妊娠禁忌药的记载和讨论,《神农本草经》中即载有6种具堕胎作用的药物^[16],梁代陶弘景《本草经集注·序例·诸病通用药》专设堕胎药1项,收载堕胎药41种,隋代《产经》已集中列举妊娠禁忌药82种,这可能是直接列述妊娠禁忌药的最早记载^[17]。而系统、完整地著录妊娠禁忌药者当推宋代陈自明的《妇人大全良方》,该书以歌诀的形式列举了妊娠禁忌药69种之多,如“斑蝥水蛭地胆虫,乌头附子配天雄,踯躅野葛蜈蚣类,乌喙侧子及虻虫……”^[18]。自宋代以后,妊娠禁忌药的流传并没有统一形式,从文献上看,《妇人大全良方》、《太平惠民和剂局方·指南总论》、《胎产救急方》、《本草纲目》和《炮炙大法》所载妊娠禁忌药均有出入,其中相同的妊娠禁忌药有:乌头、附子、天雄、半夏、巴豆、大戟、藜芦、牛膝、桃仁、南星、芫花、三棱、红花、赭石、水银、芒硝、硃砂、雄黄、水蛭、斑蝥、地胆、蜈蚣、蜈蚣、蛇蛻、蜥蜴、麝香、牛黄等,共计47种之多^[19],交叉部分约占半数。明代缪希雍提出忌用药物有青皮、

槟榔、细辛、桃仁、沉香等70余种^[20]。《中华人民共和国药典》2005年版(简称《药典》)中收载妊娠妇女禁忌用药总计69种,其中慎服药38种,忌服药5种,禁服药26种。然而有关临床应用的安全性评价的报道却很少。缺乏具有中医药特色的中药胚胎毒性研究方法是中药胚胎毒性研究发展滞后的一个重要问题。因此,建立符合中医药特色的中药妊娠期应用安全性评价的技术方法势在必行。本课题组在中药血清药物化学和中药血清药理学理论指导下,根据妊娠期母儿生理特点,对妊娠常见病、多发病的中医代表方药:黄芩、补骨脂、半夏、寿胎丸、苏叶黄连汤及双黄连冻干粉为模式药进行示范研究,提炼并总结了以血清药物化学和血清药理学为基础的,以母体含药血清和中药胚胎蓄积组分为研究对象的体外胚胎毒性研究方法,初步构建了妊娠期应用中药安全性评价体系。

3 研究思路

3.1 明确中药透过胎盘屏障的药物成分

妊娠期胎盘是母儿物质交换的场所,物质转运是胎盘最重要的功能之一。胎盘的物质转运是指母体血液中的物质与胎儿血液中的物质相互交换的过程。胎盘的血液循环由母体侧循环和胎儿侧循环组成,两者之间相隔胎盘屏障。人类胎盘屏障属于血液/绒毛膜型胎盘,其胎盘屏障由外(母体侧)向内分别为绒毛的滋养层细胞、结缔组织及胎儿血管内皮细胞组成,可使胎儿尽可能少地接触母体内的药物或毒物,而能透过胎盘屏障的药物成分,可直接对胎儿的生长发育产生影响。因此,明确中药能否透过胎盘屏障及其透过胎盘屏障行为特点成为解决妊娠期应用中药安全性研究问题的关键。

中药具有作用整体性、组成成分的多样性和可变性、作用靶点和机制的复杂性,以及成分间相互作用的难以预测性的特点^[21]。中药口服后经胃肠道屏障移行入血,经肝脏首过效应,产生的原形成分及代谢产物等在血液循环分布至周身组织器官而发挥作用。中药血清化学的研究方法正是基于中药必须经由用药部位进入血液循环才能起作用(胃肠道直接起作用及外用药物除外)这一思路,通过研究中药或复方口服后被吸收入血的“含药血清”中的各个移行成分,来间接、快速地筛选有活性的成分,即“分析鉴定中药口服后血清中的移行成分,确定中药药效物质基础并研究其体内过程”^[22]。研究过程基本包括通过动物口服给药后取血制备含药血清,利用液相

色谱—质谱(LC-MS)联用技术将色谱技术的高分离能力与质谱技术的高灵敏和结构解析能力,对比来探究血中移行的活性成分。因此,我们认为,在中药血清药物化学理论指导下,运用 LC-MS 技术,通过对药物、母体血清及胚胎中药物成分进行分析,并在一定程度上对中药透过胎盘屏障的药物成分进行分析鉴定,可为明确胚胎毒性物质奠定基础。本课题组通过研究双黄连冻干粉、寿胎丸、黄芩、补骨脂和苏叶黄连汤透过胎盘屏障的药物成分^[23-24],初步揭示了中药透过不同孕期胎盘屏障的特点和规律,即在妊娠早期、晚期中药成分较易透过胎盘屏障进入胚胎体内,特别是孕早期胎盘屏障尚未形成,药物成分几乎全部进入胚胎体内。妊娠中期胎盘屏障作用最强,药物不易透过胎盘屏障。孕期透过胎盘屏障进入胎儿体内的药物移行成分不多于母体血清中药物移行成分,且未见不同于母体血中移行成分的新的物质产生。

3.2 胚胎毒性的检测

胚胎毒性的检测方法包括体内生殖发育毒性试验和体外替代试验。体内试验是对整体动物所进行的毒性、毒理实验,采用药品注册技术要求国际协调会(ICH)推荐的 3 阶段试验:①生育力与早期胚胎发育毒性试验。②胚胎—胎仔发育毒性试验(致畸敏感期生殖毒性试验)。③围产期毒性试验。这一试验需要使用大量实验动物,费用较高,试验周期长,难以迅速对大量物质进行毒性评价,不能满足减少(Reduction)—替代(Replacement)—优化(Refinement)原则需要。

20 世纪 90 年代末欧洲替代方法研究中心(EC-VAM)推荐了有效性较高的 3 个体外胚胎发育毒性筛选试验作为体外筛选的首选方法,即体外全胚胎培养试验(WEC)、胚胎细胞微团培养试验(MM)和胚胎干细胞试验(EST)。通过上述方法对选定的 20 种化合物进行了测试,根据体内发育毒性数据,化合物被分为 3 类:无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性。试验系统通过建立标准操作规程(SOP)来达到标准化,结果显示有良好的预测能力和重现性。体外试验结果与体内试验基本一致,WEC、EST 和 MM 的预测符合率分别为 80%、78%、71%。而且对于强胚胎毒性物质,3 种方法都显示出了 100%的预测符合率^[25]。小鼠胚胎干细胞体外实验(EST)是目前唯一的利用细胞系而非妊娠动物并可替代检测胚胎发育毒性的哺乳动物实验的体外实验,它可

以在不同的诱导条件下向特定的组织器官细胞分化,而且分化过程包括了整个细胞发育的全过程,利用 ES 细胞这一特点可以对受试物可能作用的靶器官细胞及其方式和阶段进行初步判别。自从 1981 年 Martin Evans 等成功分离培养出未分化小鼠 ES 细胞以来,研究者利用 ES 细胞体外特性开展了多方面研究,根据 ES 细胞的特性发展起来的 EST 可以从细胞毒性、分化抑制以及分子生物学水平反映发育毒性。

中药虽然成分复杂,但究其本源亦是由多种已知或未知的化合物组成,故可以应用 EST 对中药进行体外胚胎毒性的筛查。本课题组首先用 EST 对示范中药(黄芩、制半夏、苏叶黄连汤、寿胎丸、双黄连冻干粉、黄芩苷)进行了胚胎毒性的检测。根据胚胎毒性判定标准预测了上述中药或复方的胚胎毒性。

中药成分在机体内亦呈现复杂的交互作用,或影响彼此的生物转运、转化或竞争同一受体或直接相互发生反应,单味中药所含成分的种类及复方中不同中药的配伍、剂量等因素对机体的作用结果均有影响,因而中药及复方对机体的作用结果非常复杂,试图将中药试验结果外推,用于解释中药在体内的作用效应是不科学的、不合理的。中药血清药理学理论的提出,为这一难题的解决提供了方法。中药血清药理学是将中药或中药复方经口给动物灌服一定时间后采集动物血液、分离血清,用此含有药物成分的血清进行体外实验的技术,具有直接、快速、敏感、准确等作用特点。不但能反映中药及其代谢产物的药理作用,而且能反映可能由药物诱导机体内源性成分所产生的作用,在某种程度上可排除中药制剂直接进行离体实验所特有的、难以确定的因素的干扰,客观地模拟药物在体内环境中产生药理效应的过程,实验条件更接近于药物在体内产生效应的内环境,使实验结果的可信度大为提高。

故本课题组在中药血清药理学理论指导下,研究中药含药血清对小鼠成纤维细胞(3T3)增殖和 ES 细胞增殖及分化的影响,并与中药制剂的 EST 结果及整体实验结果相互比较印证,结果显示,就细胞毒性而言,ES 细胞对受试物的敏感性高于成体组织,含药血清对 ES 细胞的影响较 3T3 细胞更敏感,中药含药血清对 ES 细胞增殖和分化的影响与中药及中药在胚胎体内蓄积组分 EST 结果存在较好的相关性。分别对 3 种形式的受试物进行胚胎

毒性的评价,不仅能够进一步厘定毒效物质,还可根据受试物与胚胎的“接近程度”(胚胎蓄积组分—含药血清—中药)对中药的胚胎毒性进行安全性的评价和分级。因此,对中药—含药血清—胚胎蓄积组分的综合评价法可以作为中药胚胎毒性的筛选方法。

3.3 评价体系的构建

通过对示范中药的研究,初步建立了妊娠期应用中药安全性评价体系,即首先对受试中药进行标准 EST 检测,预测中药的胚胎毒性等级,即强胚胎毒性、弱胚胎毒性、无胚胎毒性,结合含药血清对 ES 细胞增殖及分化的影响程度的不同,对受试中药的胚胎毒性进行综合评价,将受试中药分为 A、B、C1、C2 和 X 5 个离体实验安全等级,即 X 级:中药材及含药血清均显示有强胚胎毒性,建议不宜在妊娠期应用;A 级:中药材及含药血清均显示无胚胎毒性,可能对胎儿无伤害,临床可以使用;B—C 级为灰色

区,B 级:中药材及含药血清中有一组数据显示有弱胚胎毒性,不能肯定药物对胎儿发育有影响;C1 级:中药材及含药血清均显示有弱胚胎毒性,怀疑药物对胎儿发育有影响;C2 级:中药材结果显示有强胚胎毒性,含药血清结果显示有弱胚胎毒性,药物对胎儿发育可能有风险。在实验基础上,加强回顾性研究、调查,并重视上市中药的妊娠期使用的安全性监测和再评价,逐步建立符合中医药特点的妊娠期用药安全性分级制度,指导临床合理用药,最终建立妊娠期应用中药安全性评价体系。

此外,为了明确胚胎毒性的中药物质基础,对 B、C 级中药可以通过对比中药、母体血清及胚胎组织指纹图谱,富集纯化透过胎盘屏障的药物成分,并对此成分进行 EST 检测,从而准确判断造成胚胎毒性的药物成分,为中药的减毒增效,开发有利于妊娠期应用的安全中药提供依据。整个妊娠期应用中药安全性评价体系见图 1。

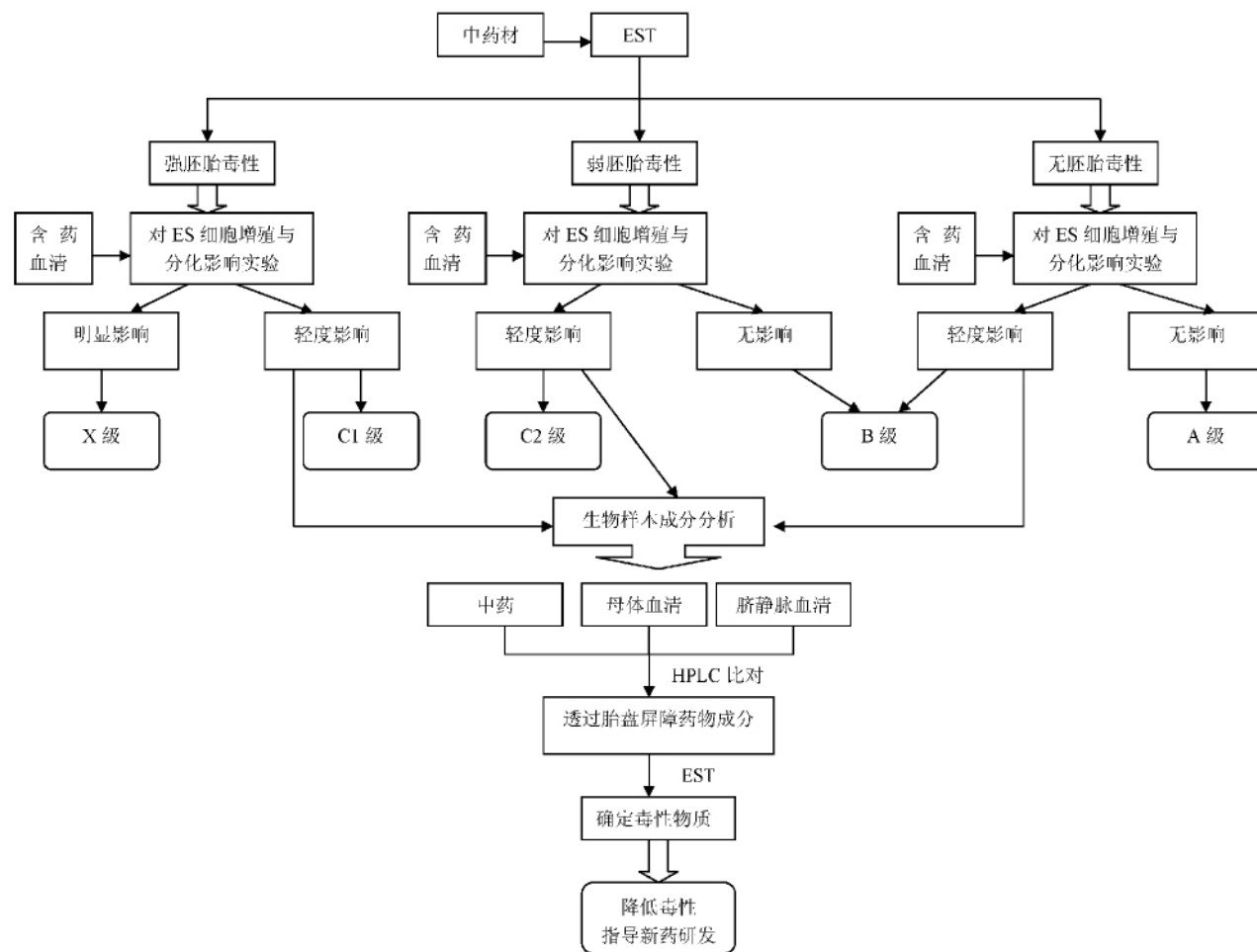


图 1 妊娠期应用中药安全性评价体系示意图

4 存在的问题和展望

中药作为多组分复杂体系,其化学成分众多,现阶段不能做到对每种成分的逐一鉴定。因此,中药及其生物样品复杂成分的检出和结构解析面临巨大的困难和挑战。血清药理学的方法仍然属于一种模糊的黑箱式操作,以含有体内药效物质的含药血清作为研究对象,不能明确中药的入血成分,无法确定中药的药效物质基础,难以建立中药在体内外胚胎毒性评价的量-效关系。因此,还需建立从中药到血中移行成分、胚胎体内药物成分的定量分析方法,为揭示中药含药血清与胚胎毒性间的量-效关系奠定基础,同时对大量中药,特别是对已经明确无或有胚胎毒性的中药及复方进行再评价研究,以反复测试和验证该评价体系的客观性和准确性,不断量化各项评价指标,以期不断完善中药胚胎毒性的评价体系。运用胚胎毒性综合评价体系,对中药胚胎毒性开展大量筛选研究,建立完善的、与国际接轨的中药安全使用指南,指导临床合理用药,同时发现具有胚胎毒性的中药组分,研究中药配伍间的减毒增效作用,推动应用于妊娠期的安全有效的中药制剂的开发。

参考文献

- [1] Gottlieb S. Serious adverse events associated with perinatal drugs[J]. BMJ, 2002, 325(7373): 1132.
- [2] Broussard CS, Louik C, Honein MA, et al. Herbal use before and during pregnancy[J]. Am J Obstet Gynecol, 2010, 202(5): 443.
- [3] Zaffani S, Cuzzolin L, Benoni G. Herbal products: behaviors and beliefs among Italian women[J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2006, 15(5): 354-359.
- [4] Fakeye TO, Adisa R, Musa IE. Attitude and use of herbal medicines among pregnant women in Nigeria[J]. BMC Complement Altern Med, 2009, (9): 53.
- [5] Holst L, Wright D, Nordeng H, et al. Use of herbal preparations during pregnancy: focus group discussion among expectant mothers attending a hospital antenatal clinic in Norwich, UK[J]. Complement Ther Clin Pract, 2009, 15(4): 225-229.
- [6] Yeh HY, Chen YC, Chen FP, et al. Use of traditional Chinese medicine among pregnant women in Taiwan[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2009, 107(2): 147-150.
- [7] Zhang AL, Story DF, Lin V, et al. A population survey on the use of 24 common medicinal herbs in Australia[J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2008, 17(10): 1006-1013.
- [8] Ozsoy SA, Katabi V. A comparison of traditional practices used in pregnancy, labour and the postpartum period among women in Turkey and Iran[J]. Midwifery, 2008, 24(3): 291-300.
- [9] Westfall RE. Herbal healing in pregnancy: women's experiences[J]. J Herb Pharmacother, 2003, 3(4): 17-39.
- [10] Hardy ML. Herbs of special interest to women[J]. J Am Pharm Assoc(Wash), 2000, 40(2): 234-242.
- [11] 易洁梅, 曾毅, 谢伟乾, 等. 妊娠妇女安全用药认知情况的调查分析[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(12): 1124-1126.
- [12] 陈康德, 羊梅兰. 妊娠期抗菌药物的合理应用[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(5): 485-486.
- [13] 王钦茂, 李莉, 方华武, 等. 中药致癌致突变和生殖毒性研究概况[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(5): 64-67.
- [14] 张东玲, 张秀英. 中药毒理学研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2005, 25(1): 51-53.
- [15] 江励华. 中药及其提取物对 NDA 损伤的影响的研究进展[J]. 药物生物技术, 2005, 12(1): 54-57.
- [16] 王筠默, 王恒芬. 神农本草经校证[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1988: 158.
- [17] 李希新. 妊娠期用药禁忌初探[J]. 山东中医药大学学报, 2003, 27(2): 98-100.
- [18] 陈自明. 妇人大全良方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 242.
- [18] 郭润田, 杜惠芳, 肖慧竹. 古籍中的妊娠禁忌药[J]. 河南中医, 2000, 20(1): 69.
- [20] 缪希雍. 神农本草经疏[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2002: 116.
- [21] 齐炼文, 周建良, 郝海平, 等. 基于中医药特点的中药体内药效物质组生物/化学集成表征新方法[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(3): 195-202.
- [22] 王莉梅, 金向群, 赵呈呈. 中药血清化学在药学相关学科研究中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 12(4): 638-642.
- [23] 宋殿荣, 郭洁, 王跃飞, 等. 双黄连冻干粉透过妊娠大鼠胎盘屏障的药物成分研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1626-1629.
- [24] 宋殿荣, 宋红运, 王跃飞, 等. 补骨脂水煎液透过妊娠大鼠胎盘屏障的药物成分研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 26(4): 815-817.
- [25] Scholz G, Pohl I, Genschow E, et al. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells in vitro: Correlation to in vivo teratogenicity[J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165(3-4): 203-211.

(收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2011-12-09)

[编辑: 黄健]