

附录1 五灵胶囊(丸)相关材料

Appendix 1 Wuling capsule (pill) related materials

1 中医理论基础

五灵胶囊(丸)由柴胡、灵芝、丹参、五味子等四味中药组成。方中柴胡辛行苦泄,性善条达肝气,疏肝解郁,理气止痛,为君药。柴胡又为肝之引经药,秉少阳生发之气,引诸药直入肝经。灵芝甘平,益气健脾,补中扶正;丹参活血化瘀,通经止痛,共为臣药。君臣相配,疏肝健脾。五味子酸甘性温,补气养阴,可佐助灵芝益气补中,并安定心神,消除郁闷不乐,还能防柴胡疏泄升散而耗气伤阴,保肝降酶,行佐制之用。诸药同用,肝脾同治,气血并调,收散兼用。诸药合用,共奏疏肝解郁,益气健脾,活血化瘀之功^[22]。

2 药学研究

2.1 物质基础 五灵胶囊(丸)中四味药物含有多种活性成分。柴胡皂苷d、五味子醇甲、五味子乙素、隐丹参酮、丹参酮II A、丹酚酸B为主要药效成分^[23]。其中,柴胡皂苷d具有抗炎、保肝、降低血中胆固醇等药理作用;五味子醇甲、五味子乙素、隐丹参酮、丹参酮II A能够修复和保护受损肝细胞,降低受损肝细胞的ALT、AST活性水平^[23];五味子醇甲等化学成分能够下调肝星状细胞相关信号通路蛋白,具有抗肝纤维化的作用^[24]。药代动力学研究^[25-26]显示,五灵胶囊(丸)中柴胡皂苷d、五味子乙素在体内药效作用长,生物利用度高。

2.2 质量控制 五灵胶囊(丸)规范了药材基源、产地、种植管理、采收及加工过程,保证了原材料的稳定;利用现代化生产线对药材进行提取、浓缩、制剂,最大程度富集有效成分,确保产品疗效;从原料、中间体、成品实施全过程标准化生产,实现了全过程可追溯。

五灵丸执行卫生部药品标准[WS3-125(Z-022)-98(Z)],控制参数如下。规格:每瓶重9g。性状:棕褐色小蜜丸;气微、味甜、微苦、辛。检查:符合丸剂《中华人民共和国药典》(2020年版)通则0108的各项规定。含量测定:按照分光光度法《中华人民共和国药典》(2020年版)通则0405测定。

五灵胶囊执行《中华人民共和国药典》(2020年版),控制参数如下。规格:每粒装0.35g。性状:硬胶囊,内容物为棕黄色粉末;味酸、咸、苦。检查:符合胶囊剂《中华人民共和国药典》(2020年版)通则0103的各项规定。含量测定:按照高效液相色谱法《中华人民共和国药典》(2020年版)通则0512测定。

3 药理研究

3.1 抗HBV毒作用 五灵胶囊(丸)对HBV DNA转染的肝癌细胞HepG2(即2,2,15细胞)的细胞培养上清中HBsAg和HBeAg的分泌有抑制作用,表明五灵胶囊(丸)具有抗HBV活性的作用^[27]。

3.2 抗肝损伤作用 五灵胶囊(丸)对四氯化碳与D-氨基半乳糖(D-GalN)诱导的小鼠肝损伤模型及体外D-GalN、脂多糖诱导的大鼠原代肝细胞损伤模型具有保护作用,结果显示:五灵胶囊(丸)能够有效对抗由四氯化碳的脂质过氧化作用所致的肝细胞坏死,显著阻滞D-GalN诱导的小鼠慢性肝损伤,

明显减少D-GalN、脂多糖诱导损伤原代大鼠肝细胞,五灵胶囊(丸)治疗慢性肝损伤作用于保护肝质膜,增加肝细胞膜的稳定性,促进肝细胞内蛋白合成,有效防止膜的脂质氧化作用。有关的病理形态学、组织学研究^[28]也证实五灵胶囊(丸)能够减轻D-GalN诱导小鼠肝细胞变性,坏死面积的改变与炎细胞浸润等病理特征呈现良好修复和保护作用。

3.3 抗肝纤维化作用 五灵胶囊(丸)能够显著降低血清I、III型前胶原含量及肝组织中I、III型前胶原和羟脯氨酸含量,抑制胶原合成。

五灵胶囊(丸)对大鼠实验性肝纤维化的治疗作用研究^[29]结果显示:五灵胶囊(丸)可显著降低血清I、III型前胶原水平及肝组织I、III型前胶原和羟脯氨酸水平,证实五灵胶囊(丸)能够抑制胶原蛋白合成的增加,使肝脏总胶原及I、III胶原减少,可有效治疗肝纤维化。

五灵胶囊(丸)可通过调节基质金属蛋白酶及其抑制因子,促进细胞外基质(I、III型胶原)降解。

五灵胶囊(丸)对肝纤维化大鼠胶原及基质金属蛋白酶的作用研究^[30]结果显示:五灵胶囊(丸)对肝纤维化具有良好的治疗作用,能够显著降低血清中TBil、AST、ALT活性及肝组织羟脯氨酸含量;肝组织中胶原纤维异常分布明显减轻,胶原纤维形成非薄的完全间隔明显减少,I、III型胶原降解增加,合成减少,五灵胶囊(丸)阻滞肝纤维化的作用机制为激活基质金属蛋白酶1、13/基质金属蛋白酶抑制剂1,增加I、III型胶原降解。

五灵胶囊(丸)通过抑制TGFβ/Smad及Ras/ERK信号通路转化生长因子βI型受体(transforming growth factor β receptor type I, TβRI)、Rasp21、p-ERK蛋白表达及TGFβ1过量分泌达到抗肝纤维化的作用。

五灵胶囊(丸)对肝纤维化大鼠肝组织TGFβ/Smad及Ras/ERK信号通路蛋白的作用研究结果显示:五灵胶囊(丸)可显著降低血清AST、ALT水平,下调肝组织中Rasp21、α平滑肌肌动蛋白、磷酸化细胞外信号调节激酶、TβRI蛋白与TGFβ1,I、III型胶原mRNA表达,增加p-Smad2/3蛋白表达,使肝细胞变性程度与胶原纤维增生程度显著降低,从而达到抗肝纤维化的作用,其作用与抑制TGFβ/Smad及Ras/ERK信号通路TβRI、Rasp21、p-ERK蛋白表达及TGFβ1过量分泌有关^[31]。

4 非临床安全性研究

4.1 急性毒性试验 五灵胶囊急性试验测不出半数致死量,故测其最大耐受量。结果显示:其最大耐受量累积为36g/kg,相当于人体用量的100倍(日剂量)以上,未见毒性反应^[32]。

五灵丸原粉经口给小鼠,其最大耐受量累积剂量达32g/kg,相当于临床人用量的100倍(日剂量)以上,未见毒性反应^[33]。

4.2 长期毒性试验 五灵胶囊经6个月长毒试验,第3个月、第6个月和恢复期测试结果表明,五灵胶囊对试验大鼠未见明显的毒性反应,无毒性反应剂量为1.2g/kg,相当于临床日剂量的13.33倍,在临床拟用剂量的条件给药是安全的^[34]。

五灵丸原粉给药分为3个剂量组,分别为0.36g/kg(人用量的1.2倍),9.0g/kg(人用量的30倍),18.0g/kg(人用量的60倍),2次/d,以蒸馏水为对照组,均采用灌胃给药24周。结

果显示:3个剂量组试验期间大鼠的一般体征、体质量、血液学指标、血液生化指标与对照组比较均无统计学差异,对各器官

进行病理组织学检查均未见明显异常。因此,经6个月长毒试验,试验大鼠未见明显的毒性反应^[35]。

附录2 中医药临床研究证据的分级标准
Appendix 2 Classification standard of evidence for clinical research of traditional Chinese medicine

证据等级	有效性	安全性
I级	随机对照试验及其系统综述、N-of-1试验系统综述	随机对照试验及其系统综述、队列研究及其系统综述
II级	非随机临床对照试验、队列研究、N-of-1试验	上市后药物流行病学研究、IV期临床试验、主动监测(注册登记、数据库研究)
III级	病例对照研究、前瞻性病例系列	病例对照研究
IV级	规范化的专家共识、回顾性病例系列、历史性对照研究	病例系列/病例报告
V级	非规范化专家共识、病例报告、经验总结	临床前安全性评价,包括致畸、致癌、半数致死量、致敏和致毒评价