

参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠的毒性研究

荆宝琴^{1,2}, 张金晓^{1,2}, 王磊^{1,2}, 谭琳³, 段蕊^{1,2}, 申秀萍^{1,2*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

3. 昆明中药厂有限公司, 云南 昆明 650228

摘要: 目的 评价幼龄大鼠重复 ig 给予参苓健脾胃颗粒后的毒性反应, 为儿童的用药安全剂量及临床不良反应监测范围提供参考。方法 176 只幼龄 SD 大鼠随机分为 4 组, 即对照组和参苓健脾胃颗粒低、中、高剂量 (3.3、9.9 和 22.2 g 生药/kg) 组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 3 个月, 停药恢复 1 个月; 检查指标包括临床观察、体质量、摄食量、血液学、血液生化学、凝血功能、尿液生化、生长发育、自主活动、学习记忆能力、血清激素、脏器质量及系数、解剖检查和组织病理学检查。结果 参苓健脾胃颗粒连续 ig 给药 1 个月及 3 个月检查, 与对照组比较, 除 22.2 g 生药/kg 组雄性大鼠自给药 21 d 起至给药结束, 大部分检测时间点平均摄食量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01) 外, 各剂量组其它各项指标未见与药物相关的毒性反应。结论 参苓健脾胃颗粒重复 ig 给药 3 个月, 对幼龄大鼠未观察到毒性反应的剂量 (NOAEL) 为 22.2 g 生药/kg, 为 5~14 岁儿童临床最大拟用剂量 (0.56 g 生药/kg) 的 40 倍, 提示临床长期使用的安全性较好。

关键词: 参苓健脾胃颗粒; 幼龄大鼠; 毒性研究

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018)09- 1621 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.011

Toxicity study for Shenling Jianpiwei Particles in juvenile rats

JING Baoqin^{1,2}, ZHANG Jinxiao^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, TAN Lin³, DUAN Rui^{1,2}, SHEN Xiuping^{1,2}

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd, Tianjin 300301, China

2. Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

3. Kunming Chinese Medicine Factory co. Ltd, 650228, Kunming 650228, China

Abstract: Objective To investigate the toxic effect of Shenling Jianpiwei Particles (SLJPWP) in juvenile rats for evaluating its safe dosage in children and providing reference for monitoring its clinical adverse reaction. **Methods** Totally 176 juvenile SD rats (males and females) were randomly divided into four groups, control group and SLJPWP high, medium, and low dose (0, 3.3, 9.9, and 22.2 g crude drug/kg) groups. All animals were ig administered once daily for three months continuously, and then recovered for one month with no dosing. Parameters were examined including general condition, body weight, food intake, hematological and biochemical index, blood coagulation parameter, urine biochemical parameters, growing development, autonomous activity, learning and memory ability, hormone, organ coefficient, anatomic examination, and histopathological examination. **Results** Compared with control group, the average amount of food intake was decreased in 22.2 g crude drug/kg SLJPWP group in male rats from 21 d to the end of administration. No other drug-related toxic reaction was found in other indexes of SLJPWP granules. **Conclusion** After rats were ig administered with SLJPWP for three months continuously, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in juvenile rats was 22.2 g crude drug/kg, amount to 40 times the recommended dose (0.56 g crude drug/kg) for children aged 5-14, which suggested that the safety of long-term clinical use is fine.

Key word: ShenlingJianpiwei Particles; juvenile rats; toxicity study

近年来, 随着临床儿科用药需求的增加, 儿科药物的研发也成为热点。由于儿童处于生长发

育期, 不同器官及组织发育程度不同, 儿科用药的临床前安全性评价与成人的关注点不同, 在试

收稿日期: 2018-01-09

第一作者: 荆宝琴 (1983-), 女, 助理研究员, 从事药理、毒理学研究。Tel: (022)84845264 E-mail: jingbq@tjipr.com

*通信作者: 申秀萍 Tel: (022)84845266 E-mail: shenxp@tjipr.com

验设计中要考虑到其特殊性^[1]。参苓健脾胃颗粒为昆明中药厂有限公司的上市产品,主治脾胃虚弱,饮食不消等,为了确保其临床儿科用药(临床拟用于5~14岁儿童)的安全性,本研究开展幼龄大鼠的安全性评价,为临床安全性用药提供科学参考依据^[2-3]。

1 材料

1.1 药物

参苓健脾胃颗粒(昆明中药厂有限公司,批号500003,散粉),对照:去离子水(北京中盛茂源科技发展有限责任公司生产的BM-40纯水机制备)。

1.2 试验动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半,3周龄,体质量40~59 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号SCXK(京)2012-0001。动物在天津药物研究院新药评价有限公司SPF级动物房内饲养,动物使用许可证号SYXK(津)2016-0009,每笼同性别不多于5只,自由饮水摄食,喂饲SPF级大小鼠维持饲料及无菌饮用水,饲养室温度20~26℃,湿度40%~70%,光照12 h明12 h暗交替。

1.3 主要试剂

乌来糖(北京索莱宝科技有限公司,批号HX0569);生长激素(EMD Millipore,批号2714267、2790776);雌二醇(R&D systems,批号340932);孕酮(Enzo Life Sciences,批号06181504C);睾酮(R&D systems,批号341237)。

1.4 主要仪器

Varioskan Flash 酶标仪, Thermo Fisher Scientific Inc.; MG-3 迷宫刺激器,原阳县振华教学仪器厂; ADVIA2120 血液分析仪, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.; 7180 型全自动生化分析仪,日本株式会社日立高新技术; BX51 显微镜,日本奥林巴斯光学株式会社; E3000-0.5 电子天平,常熟市双杰测试仪器厂; ML203 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司; 0~150 mm 数显式游标卡尺,世达工具(上海)有限公司; ACL9000 凝血分析仪, Instrumentation Laboratory Co.; EX-180 电解质分析仪,日本常光株式会社; URITEST-500B 尿液分析仪,桂林优利特电子集团有限公司。

2 方法

2.1 分组与剂量设计^[4-5]

176只大鼠随机分为4组,每组44只,雌雄各半,分别为对照,参苓健脾胃颗粒低、中、高剂量(3.3、9.9、22.2 g 生药/kg)组,分别为儿童临床最大拟用剂量(临床拟用量为10 g 生药/人/日,5~14岁儿童体质量范围为18~54 kg,即0.19~0.56 g 生药/kg)的6、18和40倍,其中高剂量为幼龄大鼠的最大给药量;对照组给予去离子水。ig给予,每天给药1次,连续给药90 d,停药恢复30 d;给药体积为15 mL/kg。

2.2 给药方法及检查指标^[4-5]

186只SD大鼠,检疫后适应性饲养观察3 d,适应期结束选取176只进行分组。参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠的重复给药周期为90 d,停药恢复30 d。试验期间每日进行1次临床观察、每周至少进行1次体质量检查(给药第1个月期间每周称量2次),每周进行1次摄食量检查;给药1、3个月及恢复期结束前1周进行1次尿液检查;给药1个月进行1次自主活动、学习记忆能力检查;给药1、3个月和恢复1个月分别剖杀12、20和12只动物(雌雄各半),各进行1次生长发育、血液学、凝血功能、血液生化、血液电解质、激素检查、解剖检查、脏器统计和组织病理学检查,具体检查指标见表1。

2.3 统计方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Excel软件进行统计学分析,计量资料采用组间 t 检验,计数资料采用等级指数检验或秩和检验,各组与对照组进行差异性比较,评价时考虑统计学差异和生物学意义。

3 结果

3.1 临床观察

各组动物均未出现死亡,大鼠外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸等均未观察到明显的异常反应。

3.2 体质量与摄食量

参苓健脾胃颗粒各剂量雌雄大鼠体质量与对照组比较未见明显异常。高剂量组雄性大鼠自给药21 d起至给药结束,大部分检测时间点平均摄食量均明显低于对照组($P < 0.05$ 、 0.01),其他组别仅个别时间点平均摄食量出现统计学差异,但无明显毒理学意义。结果见图1、2。

表1 参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠毒性检测指标
Table 1 Toxicity index of SLJPWP in juvenile rats

项目	检查指标
临床观察	外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸等
一般检查	体质量、摄食量
尿液生化	白细胞、酮体、亚硝酸盐、尿胆原、胆红素、蛋白质、葡萄糖、尿比重、隐血、pH、维生素C
生长发育	胫骨长度及身长
自主活动	开阔场试验
学习和记忆能力	Y型迷宫试验
血清激素	生长激素、雌二醇、孕酮和睾酮
血液学	红细胞计数(RBC)、红细胞容积(HCT)、平均红细胞容积(MCV)、血红蛋白浓度(HGB)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、白细胞计数(WBC)、中性粒细胞(Neut)比例、淋巴细胞(Lymph)比例、单核细胞(Mono)比例、嗜酸性粒细胞(Eos)比例、血小板计数(PLT)、网织红细胞计数(Ret)等
凝血功能	凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)
血液生化及电解质	天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、血清尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆固醇(TCHO)、血糖(GLU)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、三酰甘油(TG)、肌酸磷酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)和γ-谷氨酰转移酶(γ-GGT)、血清钾离子(K ⁺)、钠离子(Na ⁺)、氯离子(Cl ⁻)等
大体剖检	体表及皮下、颈部、胸腔及胸腔脏器、盆腔及盆腔脏器、腹腔及腹腔脏器、头部、淋巴、乳腺、脊髓、坐骨神经等
脏器重量及系数	心、肝、脾、肾、脑、肾上腺、胸腺、雄性睾丸和附睾、雌性子宫和卵巢
组织病理学	心、主动脉、脑、脑垂体、肺、气管、食管、肝、肾、胰腺、脾、胸腺、淋巴结(颌下、肠系膜淋巴结)、唾液腺、甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、脊髓(颈椎、中段胸椎、腰椎)、坐骨神经、乳腺(前列腺)、子宫和子宫颈(睾丸)、卵巢和输卵管(附睾)、胃(前胃、腺胃)、十二直肠、回肠、空肠、盲肠、结肠、直肠、膀胱、眼、哈氏腺、胸骨、股骨、精囊、骨骼肌、皮肤、阴道等

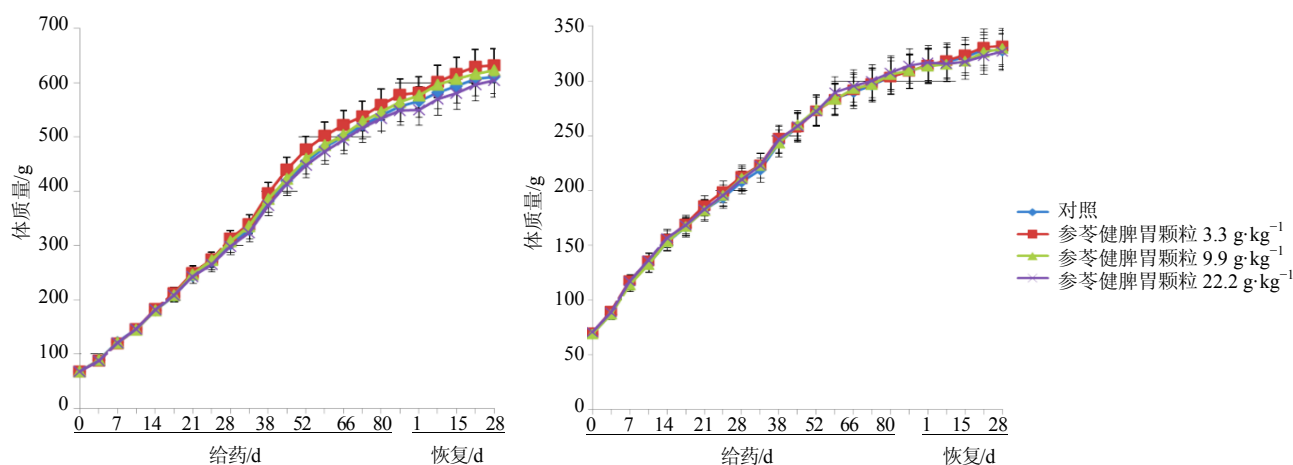


图1 雄性(A)、雌性(B)大鼠体质量曲线图

Fig. 1 Body weight of male (A) and female (B) rats

3.3 尿液检查

参苓健脾胃颗粒各剂量雌雄大鼠各项指标与对照组比较未见明显异常。

3.4 生长发育

参苓健脾胃颗粒各剂量组雌雄大鼠身长、胫骨长度与对照组比较均未见明显异常。结果见表2。

3.5 自主活动与学习和记忆能力

仅参苓健脾胃颗粒低、中及高剂量组雌性大鼠梳理次数与对照组比较略少,结合本实验室背景数据及其它各项指标分析,认为上述差异为正常生理波动,无明显毒理学意义。各剂量组其余各项结果与对照组比较均未见明显异常。见表3、4。

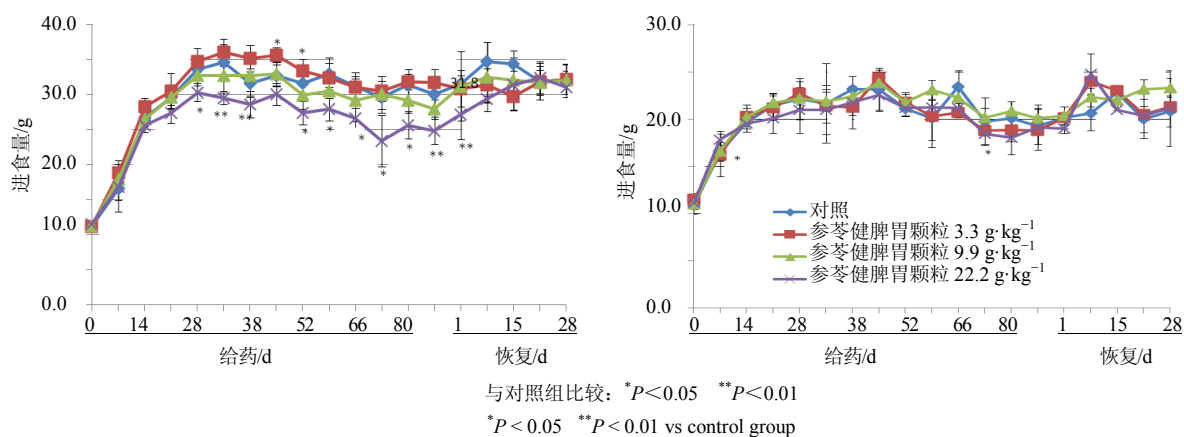


图2 雄性(A)、雌性(B)大鼠摄食量曲线图

Fig. 2 Food intake of male (A) and female (B) rats

表2 参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠生长发育的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect on growing development of SLJPWP in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	检查时间	n/只	身长/cm		胫骨长/mm	
				雄性	雌性	雄性	雌性
对照	—	给药 30 d	6	21.1 $\pm$ 0.4	18.3 $\pm$ 0.3	36.16 $\pm$ 1.02	33.36 $\pm$ 1.53
		给药 90 d	10	25.2 $\pm$ 0.6	20.8 $\pm$ 0.5	43.13 $\pm$ 0.78	37.89 $\pm$ 0.78
		恢复 30 d	6	25.6 $\pm$ 0.8	21.5 $\pm$ 0.5	45.93 $\pm$ 0.76	39.74 $\pm$ 0.72
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	21.2 $\pm$ 0.3	18.3 $\pm$ 0.7	35.85 $\pm$ 0.62	33.47 $\pm$ 1.03
		给药 90 d	10	25.2 $\pm$ 0.6	20.9 $\pm$ 0.7	42.99 $\pm$ 1.06	37.40 $\pm$ 0.89
		恢复 30 d	6	25.9 $\pm$ 0.4	21.9 $\pm$ 0.7	46.55 $\pm$ 0.49	40.46 $\pm$ 1.08
	9.9	给药 30 d	6	21.3 $\pm$ 0.3	17.8 $\pm$ 0.8	36.21 $\pm$ 0.76	33.61 $\pm$ 0.70
		给药 90 d	10	25.1 $\pm$ 0.5	20.7 $\pm$ 0.5	43.21 $\pm$ 1.05	37.30 $\pm$ 0.75
		恢复 30 d	6	25.6 $\pm$ 0.7	22.0 $\pm$ 0.7	45.01 $\pm$ 0.94	40.30 $\pm$ 1.01
	22.2	给药 30 d	6	21.1 $\pm$ 0.5	18.2 $\pm$ 0.6	36.70 $\pm$ 0.44	33.29 $\pm$ 0.74
		给药 90 d	10	24.8 $\pm$ 0.7	20.7 $\pm$ 0.5	42.70 $\pm$ 0.98	37.59 $\pm$ 0.83
		恢复 30 d	6	25.6 $\pm$ 0.9	21.7 $\pm$ 0.5	45.93 $\pm$ 0.65	40.27 $\pm$ 1.33

表3 参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠自主活动(开阔场)的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 3 Effect on autonomous activity (Open Field test) of SLJPWP in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	性别	活动格数	竖起次数	梳理次数	粪便粒数	排尿次数
对照	—	雄性	105.2 $\pm$ 31.0	30.2 $\pm$ 13.3	1.2 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 2.1	0.5 $\pm$ 0.5
		雌性	136.8 $\pm$ 11.1	33.2 $\pm$ 8.9	1.7 $\pm$ 1.0	0.7 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 1.0
参苓健脾胃颗粒	3.3	雄性	124.2 $\pm$ 39.4	34.7 $\pm$ 13.9	0.5 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 1.5	0.7 $\pm$ 0.5
		雌性	140.0 $\pm$ 42.4	34.0 $\pm$ 13.7	0.5 $\pm$ 0.8*	1.8 $\pm$ 2.8	0.8 $\pm$ 0.4
	9.9	雄性	101.0 $\pm$ 28.1	25.3 $\pm$ 10.4	0.5 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 2.0	0.5 $\pm$ 0.5
		雌性	145.7 $\pm$ 15.1	33.2 $\pm$ 7.3	0.5 $\pm$ 0.5*	2.3 $\pm$ 3.6	1.0 $\pm$ 0.9
	22.2	雄性	127.3 $\pm$ 28.5	30.5 $\pm$ 17.9	0.8 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.5
		雌性	124.2 $\pm$ 17.8	28.7 $\pm$ 7.5	0.3 $\pm$ 0.5*	0.8 $\pm$ 1.6	0.3 $\pm$ 0.5

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

表4 参苓健脾胃颗粒对幼龄大鼠学习和记忆能力(Y迷宫)的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Effect on learning and memory ability (Y maze) in SLJPW of juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	性别	初次测试正确率/%	24 h 测试正确率/%
对照	—	雄性	84.4±10.9	90.0±11.0
		雌性	84.4±18.2	88.9±13.1
参苓健脾胃颗粒	3.3	雄性	76.7±18.3	91.1±13.1
		雌性	73.3±17.4	78.9±19.5
	9.9	雄性	83.3±10.1	82.2±5.4
		雌性	85.6±20.0	91.1±15.6
	22.2	雄性	76.7±25.2	77.8±24.5
		雌性	87.8±16.0	85.6±17.1

3.6 激素

仅给药 90 d, 参苓健脾胃颗粒高剂量组雄性大鼠雌二醇及中剂量组雌性大鼠生长激素与对照组比较升高, 出现统计学差异 ($P<0.05, 0.01$); 结合本

实验室背景数据及其他各项指标分析, 认为上述差异为生理波动, 无明显毒理学意义。各剂量组其余各项指标检查与对照组比较均未见明显异常。结果见表 5、6。

表5 参苓健脾胃颗粒对雄性幼龄大鼠激素的影响($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effect on hormone of SLJPWP in juvenile male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	检测时间	n/只	雌二醇/(pg·mL ⁻¹)	孕酮/(pg·mL ⁻¹)	睾酮/(ng·mL ⁻¹)	生长激素/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	205.3±12.7	6 121.1±4 592.8	5.812±1.722	11.324±8.277
		给药 90 d	10	240.9±15.9	4 625.2±3 089.5	4.061±0.827	9.553±16.342
		恢复 30 d	6	245.3±28.5	3 627.8±1 967.0	4.583±0.710	4.753±5.223
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	214.9±6.1	4 003.9±1 498.2	5.504±1.605	16.386±17.132
		给药 90 d	10	239.3±20.1	4 520.4±1 723.1	6.310±5.055	2.270±2.740
		恢复 30 d	6	228.7±20.2	3 244.1±865.1	5.472±1.261	6.519±5.366
	9.9	给药 30 d	6	213.5±21.1	4 439.3±3 611.5	5.558±0.978	33.003±40.418
		给药 90 d	10	238.1±21.9	5 627.2±2 516.5	5.281±2.608	5.506±10.309
		恢复 30 d	6	227.1±13.2	4 458.7±1 410.7	4.409±1.509	8.600±13.747
	22.2	给药 30 d	6	222.5±26.6	3 626.2±1 044.6	6.333±2.278	24.441±22.363
		给药 90 d	10	259.5±22.0*	5 579.5±3 318.3	4.638±3.374	4.672±11.589
		恢复 30 d	6	235.8±17.8	3 649.0±1 752.7	3.684±1.152	8.686±12.183

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

表6 参苓健脾胃颗粒对雌性幼龄大鼠激素的影响($\bar{x} \pm s$)Table 6 Effect on hormone of SLJPWP in juvenile female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	检测时间	n/只	雌二醇/(pg·mL ⁻¹)	孕酮/(pg·mL ⁻¹)	睾酮/(ng·mL ⁻¹)	生长激素/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	222.0±24.7	15 495.3±3802.3	5.503±0.463	36.027±19.849
		给药 90 d	10	244.5±38.5	13 623.1±6186.3	4.642±0.837	32.546±22.073
		恢复 30 d	6	203.0±41.3	15 601.3±5910.9	4.674±1.803	27.383±33.048
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	211.4±21.6	14 641.6±4006.9	5.187±1.027	61.894±52.796
		给药 90 d	10	229.3±28.7	15 580.5±9843.3	5.015±0.886	71.467±113.248
		恢复 30 d	6	227.0±27.4	11 418.8±6596.4	4.497±1.996	34.132±46.865
	9.9	给药 30 d	6	206.5±23.9	17 501.3±11063.9	5.065±0.702	44.039±19.336
		给药 90 d	10	230.3±19.2	13 180.5±5011.3	4.475±0.690	99.809±71.455**
		恢复 30 d	6	214.2±23.9	20 411.1±11142.6	4.946±0.979	29.864±36.527
	22.2	给药 30 d	6	219.0±10.5	14 783.3±4866.5	4.780±0.865	24.746±21.969
		给药 90 d	10	223.6±54.0	12 825.7±7428.7	4.271±0.665	59.331±93.461
		恢复 30 d	6	233.1±18.9	14 897.0±5210.1	5.068±0.986	33.690±42.216

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3.7 血液学

给药 30 d, 雄性大鼠参苓健脾胃颗粒低剂量组 WBC 明显降低 ($P<0.01$)、HGB 明显升高 ($P<0.05$); 雌性大鼠低剂量组 Lymph 比例明显降低 ($P<0.05$), 中剂量组 HGB 及 HCT 明显降低 ($P<0.05, 0.01$)。给药 90 d, 雌性大鼠高剂量 Mono 比例明显升高 ($P<0.05$), Ret 明显降低 ($P<0.05$)。恢复 30 d, 雄性大鼠中剂量组 Eos 比例明显升高 ($P<0.01$), 高剂量组 WBC 明显升高 ($P<0.05$); 雌性大鼠高

剂量组 MCH 明显升高 ($P<0.05$)。分析认为上述指标中 WBC、Lymph 比例、Eos 比例、HGB 及 HCT 的变化无明显的剂量相关性, 且各项指标的变化幅度不大, 无明显毒理学意义; Mono 比例、MCH 及 Ret 的变化幅度不大, 尚在正常范围内, 为正常生理波动。结果见表 7、8。

3.8 凝血功能

参苓健脾胃颗粒各剂量组雌雄动物各项指标与对照组比较均未见明显异常。

表 7 参苓健脾胃颗粒对雄性幼龄大鼠血液学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect on hematology of SLJPWP in juvenile male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n/ 只	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	Neut/%	Lymph/%	Mono/%	Eos/%	RBC/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB/ (g·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	13.46±0.94	11.15±2.53	84.52±2.91	2.33±0.60	0.43±0.15	7.44±0.49	145.33±6.59
		给药 90 d	10	16.71±4.80	10.32±3.09	85.64±3.47	1.96±0.66	1.03±0.29	9.57±0.35	168.40±6.19
		恢复 30 d	6	11.85±2.16	13.27±2.34	82.88±2.26	1.95±0.70	1.02±0.29	9.52±0.38	165.17±7.73
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	10.14±1.39**	14.53±7.82	81.43±8.12	1.95±0.53	0.60±0.23	7.93±0.45	153.17±5.53*
		给药 90 d	10	14.70±2.16	13.08±3.47	82.45±3.52	2.10±0.34	1.21±0.32	9.40±0.46	163.60±8.59
		恢复 30 d	6	13.92±3.22	12.25±1.52	83.42±1.74	2.17±0.49	1.25±0.23	9.43±0.48	165.67±6.31
	9.9	给药 30 d	6	14.60±2.89	9.32±3.13	86.58±4.41	2.02±1.09	0.50±0.11	7.61±0.47	148.83±7.17
		给药 90 d	10	14.55±2.87	11.71±2.28	84.49±2.99	1.75±0.46	1.08±0.25	9.34±0.32	165.50±5.28
		恢复 30 d	6	12.69±3.50	12.77±4.19	82.32±4.36	2.08±0.52	1.82±0.29**	9.72±0.20	167.83±5.08
	22.2	给药 30 d	6	12.20±1.48	12.53±3.90	83.88±4.21	1.82±0.66	0.45±0.15	7.75±0.39	150.17±6.59
		给药 90 d	10	17.39±4.55	12.70±7.81	83.02±7.88	2.24±0.61	1.05±0.35	9.49±0.35	166.40±7.06
		恢复 30 d	6	14.45±1.81*	13.40±1.67	82.28±1.13	2.02±0.17	1.15±0.65	9.89±0.31	170.00±3.85
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n/只	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/ (g·L ⁻¹)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	Ret/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	
对照	—	给药 30 d	6	45.12±2.27	60.75±1.65	19.57±0.64	322.33±4.08	1 634.00±151.59	0.54±0.08	
		给药 90 d	10	49.74±1.51	52.00±1.29	17.58±0.63	337.90±5.67	1 299.80±119.03	0.34±0.05	
		恢复 30 d	6	50.00±2.22	52.57±1.16	17.35±0.48	330.17±3.31	1 255.33±112.89	0.31±0.04	
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	47.42±1.36	59.90±2.13	19.37±0.88	323.00±4.20	1 520.33±193.01	0.54±0.04	
		给药 90 d	10	48.48±2.36	51.59±1.02	17.39±0.33	337.10±5.45	1 266.00±156.70	0.38±0.05	
		恢复 30 d	6	50.40±2.06	53.47±1.74	17.60±0.72	328.83±3.37	1 296.83±161.10	0.31±0.02	
	9.9	给药 30 d	6	46.33±2.25	60.95±1.02	19.58±0.35	321.33±1.86	1 479.83±135.25	0.50±0.06	
		给药 90 d	10	48.94±1.64	52.40±1.24	17.72±0.47	338.10±3.73	1 236.70±45.74	0.33±0.04	
		恢复 30 d	6	51.35±1.00	52.83±1.70	17.28±0.73	326.67±4.46	1 289.83±123.82	0.28±0.06	
	22.2	给药 30 d	6	46.77±1.74	60.35±1.00	19.42±0.54	321.50±6.28	1 463.00±172.73	0.55±0.08	
		给药 90 d	10	49.09±1.77	51.77±1.76	17.55±0.62	338.80±4.29	1 240.80±116.69	0.31±0.04	
		恢复 30 d	6	52.07±1.12	52.68±2.25	17.22±0.79	326.50±3.39	1 232.00±164.64	0.27±0.04	

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表8 参苓健脾胃颗粒对雌性幼龄大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s$)Table 8 Effect on hematology of SLJPWP in juvenile female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n/只	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	Neut/%	Lymph/%	Mono/%	Eos/%	RBC/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	HGB/ (g·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	9.00±2.16	7.75±0.71	88.12±1.74	1.78±0.52	0.93±0.28	7.93±0.50	150.67±2.73
		给药 90 d	10	8.93±2.47	15.56±8.79	79.66±8.53	1.98±0.44	1.21±0.50	8.42±0.53	155.60±11.16
		恢复 30 d	6	5.06±1.43	13.28±3.33	81.85±3.60	2.33±0.66	1.68±0.38	8.71±0.55	159.67±13.37
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	8.83±3.37	12.48±5.17	82.78±4.99*	1.82±0.51	1.25±0.26	7.78±0.34	148.83±8.75
		给药 90 d	10	8.01±2.69	13.44±4.05	81.65±5.11	2.35±1.10	1.52±0.41	8.54±0.45	157.70±5.98
		恢复 30 d	6	7.44±4.81	17.20±10.48	76.68±9.98	2.88±1.38	2.28±2.08	8.79±0.43	161.67±7.50
	9.9	给药 30 d	6	7.59±1.11	10.83±3.01	85.53±2.76	1.40±0.53	1.02±0.34	7.54±0.18	143.33±4.46**
		给药 90 d	10	8.83±1.12	12.89±3.93	81.98±5.34	2.27±0.63	1.38±0.89	8.42±0.33	153.30±6.24
		恢复 30 d	6	5.65±2.34	15.78±3.14	78.75±3.02	2.68±0.71	1.85±0.70	8.50±0.31	159.50±3.02
	22.2	给药 30 d	6	7.88±2.23	11.20±4.48	84.80±4.73	1.80±0.36	0.98±0.38	7.89±0.18	148.50±1.52
		给药 90 d	10	9.92±2.50	11.85±4.75	82.76±5.18	2.57±0.70*	1.26±0.50	8.46±0.36	156.30±5.98
		恢复 30 d	6	5.45±0.84	13.58±6.39	81.83±6.77	2.00±0.57	1.75±0.64	8.45±0.32	160.33±4.72
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n/只	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/ (g·L ⁻¹)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	Ret/($\times 10^{12} \cdot L^{-1}$)	
对照	—	给药 30 d	6	45.42±0.79	57.45±3.05	19.05±1.12	331.83±5.23	1 599.83±217.45	0.34±0.08	
		给药 90 d	10	45.31±2.87	53.82±1.46	18.49±0.59	343.30±5.33	1 301.50±222.87	0.30±0.07	
		恢复 30 d	6	48.00±3.51	55.10±1.28	18.30±0.55	332.17±5.78	1 252.83±157.07	0.28±0.03	
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	44.55±2.22	57.27±2.05	19.12±0.59	334.00±5.93	1 569.50±157.50	0.32±0.12	
		给药 90 d	10	45.73±1.98	53.56±1.18	18.50±0.60	345.40±6.47	1 277.90±168.81	0.29±0.04	
		恢复 30 d	6	48.53±2.15	55.25±1.31	18.42±0.37	333.50±5.54	1 179.83±165.10	0.27±0.05	
	9.9	给药 30 d	6	43.63±1.23*	57.88±1.30	19.00±0.49	328.00±3.52	1 561.67±142.38	0.37±0.10	
		给药 90 d	10	45.10±1.33	53.58±1.15	18.23±0.60	340.10±8.33	1 304.30±161.57	0.27±0.04	
		恢复 30 d	6	47.58±0.92	56.02±1.63	18.77±0.53	335.00±4.34	1 176.17±101.39	0.28±0.04	
	22.2	给药 30 d	6	44.70±0.47	56.68±0.87	18.82±0.41	332.17±2.40	1 421.67±109.65	0.32±0.05	
		给药 90 d	10	45.77±1.52	54.11±1.14	18.47±0.52	341.10±8.45	1 238.20±124.02	0.23±0.04*	
		恢复 30 d	6	47.97±1.52	56.85±1.67	18.98±0.22*	334.00±7.29	1 171.17±146.05	0.29±0.05	

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.9 血液生化与电解质

给药 30 d, 与对照组比较, 雄性幼龄大鼠参苓健脾胃颗粒低剂量组 BUN 升高, GGT 降低, 中剂量组 TG 降低, 高剂量组 BUN 升高, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01); 雌性大鼠高剂量组 ALT 降低, TBIL 升高, 差异显著 ($P < 0.01$)。给药 90 d, 雄性大鼠中、高剂量组 BUN 明显降低 ($P < 0.05$); 雌性大鼠仅高剂量组 TBIL 升高 ($P < 0.01$)。恢复 30 d, 雄性大鼠仅低剂量组 TBIL 明显升高 ($P < 0.05$)。分析认为上述各项指标中 ALT、TG 及 GGT 的降低无明显毒理学意义; BUN 及 TBIL 的变化幅度不大, 尚在正常范围内, 为正常生理波动。结果见表 9、10。

3.10 大体解剖

各只动物毛顺, 有光泽, 营养状况良好, 胸、腹膜光滑, 胸、腹腔内未见积液、粘连, 被检脏器形态、颜色、位置等正常, 未见明显肉眼可见的病理改变。

3.11 脏器质量和系数

参苓健脾胃颗粒各剂量组雌雄动物各项指标与对照组比较均未见明显异常。

3.12 组织病理学

给药期参苓健脾胃颗粒高剂量组各脏器组织结构完整、细胞形态清晰, 与对照组比较未发现明显由供试品引起的组织病理学改变; 停药恢复 30 d, 上述脏器亦未发现明显的延迟毒性反应。

表9 参苓健脾胃颗粒对雄性幼龄大鼠血液生化的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 9 Effect on blood-biochemistries of SLJPWP in juvenile male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	33.0±2.8	159.3±15.6	224.2±48.4	4.84±0.46	52.7±1.4	52.68±1.33	20.97±0.63
		给药 90 d	10	41.4±10.7	151.3±38.0	85.7±17.8	6.48±0.52	73.0±9.0	54.58±1.50	20.38±0.89
		恢复 30 d	6	46.6±11.7	152.0±33.4	85.6±10.2	6.48±0.45	65.4±5.0	57.07±2.20	21.82±1.38
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	29.5±5.3	141.7±14.2	230.9±43.8	5.82±0.53**	52.9±3.3	53.05±1.54	20.95±0.66
		给药 90 d	10	40.0±17.4	152.6±27.1	86.8±34.7	6.28±0.74	73.8±8.9	56.12±2.21	20.51±0.89
		恢复 30 d	6	44.6±11.4	167.3±18.2	86.1±13.8	6.72±0.43	70.0±5.1	59.42±1.62	21.70±0.59
	9.9	给药 30 d	6	30.5±3.5	153.6±18.6	237.0±18.2	5.74±1.09	54.9±4.1	52.32±2.62	21.22±1.34
		给药 90 d	10	36.6±10.7	138.7±33.6	85.1±25.0	5.73±0.50**	70.7±7.1	55.02±1.63	20.51±0.63
		恢复 30 d	6	41.4±8.4	157.3±24.1	79.0±13.9	6.73±0.37	70.2±4.3	59.00±2.83	21.82±1.46
	22.2	给药 30 d	6	28.1±6.5	144.4±17.9	252.9±58.5	6.02±1.16*	56.1±8.2	51.30±2.38	20.60±1.34
		给药 90 d	10	37.7±7.6	154.1±26.6	88.5±30.6	5.88±0.68*	69.9±6.8	55.01±2.25	20.11±0.93
		恢复 30 d	6	52.6±26.0	138.5±31.9	74.7±14.5	6.45±0.75	68.0±4.5	56.77±1.80	21.40±0.36
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	TCHO/ (mmol·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	GGT/ (U·L ⁻¹)	LDL/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	6.25±1.08	1.67±0.23	0.74±0.14	0.79±0.22	1079.7±233.6	1.4±0.1	1 615.5±309.8
		给药 90 d	10	8.43±1.69	1.65±0.37	0.56±0.14	0.61±0.28	1003.1±417.5	0.7±0.3	1 366.2±476.4
		恢复 30 d	6	8.84±1.00	1.84±0.26	0.46±0.20	0.71±0.34	952.5±273.2	0.7±0.3	1 389.2±279.3
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	6.05±0.46	1.57±0.32	0.85±0.17	0.52±0.23	918.8±123.0	1.2±0.1**	1 403.7±164.9
		给药 90 d	10	8.87±1.20	1.92±0.26	0.69±0.20	0.80±0.25	1065.9±248.2	0.9±0.2	1 396.9±219.2
		恢复 30 d	6	9.08±0.82	1.81±0.16	0.70±0.10*	0.57±0.29	1235.1±166.2	0.9±0.2	1 657.8±243.1
	9.9	给药 30 d	6	6.43±0.62	1.77±0.26	0.64±0.19	0.35±0.09**	965.7±185.8	1.4±0.5	1 498.4±302.1
		给药 90 d	10	8.59±0.81	1.72±0.32	0.50±0.14	0.58±0.24	984.0±308.6	0.9±0.2	1 161.5±341.5
		恢复 30 d	6	8.49±0.88	2.06±0.51	0.66±0.15	0.83±0.39	1147.2±220.5	0.7±0.3	1 553.8±404.8
	22.2	给药 30 d	6	6.74±1.14	1.45±0.27	0.68±0.16	0.55±0.15	895.5±128.9	1.5±0.2	1 423.7±203.1
		给药 90 d	10	8.80±1.00	1.63±0.46	0.67±0.26	0.78±0.25	1093.8±238.9	0.9±0.3	1 398.6±431.7
		恢复 30 d	6	9.31±0.43	1.76±0.23	0.59±0.26	0.62±0.17	883.2±275.1	0.9±0.2	1 091.9±292.2

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

*P<0.05 **P<0.01 vs control group

4 讨论

儿童生长发育不同于成人,不同年龄段儿童的器官生理结构及器官成熟程度也存在一定差异,因此儿童对药物吸收、分布、代谢、排泄等有着自身的特点,不能用成人的临床数据和成年动物的临床前安评数据来支持临床儿科用药的安全性^[6],因此采用幼龄动物开展儿科药物的临床前安全性评价非常有必要。在进行幼龄动物的重复给药毒性试验设计时需要考虑以下几点:(1)开始给药时动物年龄需与临床拟用人群最小年龄相当;(2)给药周期需覆盖儿科用药年龄段中涉及发育器官系统及靶器官发育的敏感阶段;(3)增加检测与生长发育密切相关的指标^[7]。

参苓健脾胃颗粒主要成分有北沙参、山药(炒)、薏苡仁、茯苓等,其功能主治为补脾健胃、利湿止泻,用于脾胃虚弱,饮食不消,或泻或吐,形瘦色萎,神疲乏力,处方中主要成分未见严重毒性反应的报道^[8-11],多年的临床使用中也未见严重不良反应报道。参苓健脾胃颗粒临床拟用年龄为5~14岁儿童,因此试验动物选用出生21 d刚离乳动物,适应3 d后进行给药;为了评价药物对幼龄大鼠生长发育的影响,试验中增加了身长、胫骨长度、自主活动、学习记忆能力及激素的检测;为了更好的评价药物对生长发育关键时期幼龄大鼠主要脏器功能及组织学的影响,增加了给药1个月的各项检查。试验结果发现,除高剂量组雄性大鼠摄食量略低外

表 10 参苓健脾胃颗粒对雌性幼龄大鼠血液生化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 10 Effect on blood-biochemics of SLJPWP in juvenile female rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	25.2±3.0	137.4±20.7	142.9±40.1	8.04±1.74	59.4±6.4	57.47±2.73	25.02±1.59
		给药 90 d	10	28.2±5.9	147.9±26.2	42.8±11.6	7.60±0.71	79.1±21.9	63.35±5.08	27.08±3.41
		恢复 30 d	6	40.5±13.7	195.3±97.6	37.8±7.2	7.22±1.07	75.7±7.3	69.12±6.30	30.60±2.62
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	24.3±2.5	149.9±27.7	117.6±34.5	7.29±0.98	65.6±5.6	58.62±2.74	25.20±1.69
		给药 90 d	10	28.6±6.3	150.0±30.1	47.1±13.8	7.56±0.83	82.6±19.0	63.82±4.98	28.03±2.97
		恢复 30 d	6	50.0±31.5	190.5±59.8	39.4±12.0	8.27±0.59	79.0±3.7	65.98±4.16	27.83±3.97
	9.9	给药 30 d	6	25.3±3.2	153.2±29.3	137.2±33.9	7.50±0.94	60.8±1.9	56.52±0.77	24.52±1.78
		给药 90 d	10	34.3±12.5	167.5±48.3	45.0±11.9	7.91±1.03	91.1±27.9	67.73±5.55	29.81±3.19
		恢复 30 d	6	36.6±8.3	173.4±58.9	36.0±8.9	7.41±1.00	77.0±5.2	66.62±6.23	29.05±2.12
	22.2	给药 30 d	6	19.7±1.8**	130.9±16.0	125.3±28.0	7.78±1.25	61.1±5.2	57.62±0.94	24.23±1.04
		给药 90 d	10	35.1±21.6	168.3±79.5	36.7±7.9	7.22±0.93	87.2±24.8	64.57±3.84	28.10±2.77
		恢复 30 d	6	31.3±5.4	151.8±17.5	40.8±9.1	8.36±0.86	80.4±2.4	69.82±2.08	30.68±1.67
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	检测时间	n	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	TCHO/ (mmol·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	GGT/ (U·L ⁻¹)	LDL/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	给药 30 d	6	6.36±0.85	1.66±0.36	0.37±0.11	0.28±0.05	845.7±195.6	1.5±0.2	1323.4±360.2
		给药 90 d	10	7.05±1.07	1.95±0.41	0.86±0.21	0.41±0.14	836.1±181.5	1.2±0.2	1517.1±332.6
		恢复 30 d	6	8.88±0.83	2.64±0.76	1.02±0.24	0.62±0.33	961.0±258.1	1.0±0.2	1252.6±419.9
参苓健脾胃颗粒	3.3	给药 30 d	6	6.89±0.98	1.66±0.30	0.49±0.10	0.32±0.08	1066.5±255.7	1.5±0.1	1564.6±501.1
		给药 90 d	10	6.98±0.58	1.79±0.59	0.96±0.24	0.34±0.10	930.2±232.6	1.1±0.2	1670.1±382.2
		恢复 30 d	6	9.08±1.26	2.20±0.56	0.91±0.29	0.48±0.18	1021.7±303.4	1.0±0.3	1294.8±135.9
	9.9	给药 30 d	6	7.20±0.78	1.66±0.32	0.50±0.09	0.25±0.03	1052.2±305.0	1.6±0.3	1568.2±410.5
		给药 90 d	10	7.53±0.99	2.28±0.48	0.95±0.28	0.39±0.14	906.8±230.7	1.1±0.2	1472.2±278.6
		恢复 30 d	6	8.90±1.64	2.59±0.66	0.99±0.30	0.53±0.23	764.3±194.5	0.9±0.1	900.1±289.2
	22.2	给药 30 d	6	7.32±0.85	1.91±0.36	0.56±0.06**	0.32±0.03	949.3±211.0	1.7±0.3	1409.6±305.8
		给药 90 d	10	7.99±1.47	1.94±0.52	1.14±0.19**	0.47±0.25	861.5±222.5	1.0±0.2	1420.0±240.2
		恢复 30 d	6	9.61±1.12	2.81±0.38	0.92±0.10	0.43±0.09	1011.5±408.7	1.0±0.2	1214.2±373.1

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

其他各项指标均未见明显异常变化。结合大鼠体重增长和其它各项检查指标综合分析,高剂量组雄性大鼠摄食量的减少与每天给予高浓度大体积的供试品药液(影响胃排空)有关,非药物毒性所致,无明显毒理学意义。因此,参苓健脾胃颗粒重复给药 3 个月对幼龄大鼠未观察到毒性反应的剂量(NOEL)为 22.2 g 生药/kg,为 5~14 岁儿童临床最大拟用剂量(0.56 g 生药/kg)的 40 倍,提示临床长期使用的安全性较好。

参考文献

- [1] 黄芳华,朱飞鹏,笪红远,等. 中药儿科用药非临床安全性评价的一般考虑 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(24): 2779-2781
- [2] 药物重复给药毒性试验技术指导原则 [S]. 2014.
- [3] 儿科药品的非临床安全性评价一般原则 [S]. 2009.
- [4] 杨 韬,朱金鹏,邓 青,等. 小儿扶脾颗粒对幼龄大

- 鼠发育毒性的研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(1): 4-7
- [5] 王 永,王 蓉,骆永伟,等. 复方一枝蒿颗粒对幼龄大鼠重复给药毒性研究及评价方法探索 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(14): 1660-1666
- [6] 孙祖越,周 莉,韩 玲. 儿科用药非临床安全性评价要则及中药评价的特殊性 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 13-20
- [7] 蒋德建,杨 威. 中药儿科用药临床前评价策略 [J]. 中南药学, 2017, 15(1): 1-3
- [8] 孙亚凤. 南沙参与北沙参的鉴别应用 [J]. 光明中医, 2011, 26(11): 2348-2349
- [9] 孙晓生,谢 波. 山药药理作用的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3): 353-封三
- [10] 庞张祥,韩晓春,季旭明. 薏苡仁及其拆分组分对脾虚水湿不化模型大鼠胃肠功能的影响 [J]. 山东中医药大学学报 [J]. 2016, 40 (2): 175-177
- [11] 游 昕,熊大国,郭志斌,等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2): 106-109.