

丹红注射液对大鼠亚慢性毒性试验研究

薛 云, 戴晓莉, 戴学栋, 马玉奎*

山东省医药工业研究所 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250033

摘 要: **目的** 研究连续 iv 给予丹红注射液对 SD 大鼠产生的亚慢性毒性作用。**方法** SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 随机分为对照组和丹红注射液 600、200、60 mg/kg 剂量组, 每组 20 只, 连续 iv 给药 13 周, 以其体质量、血液生化学、血液学、脏器相对质量、组织病理学检查为指标, 全面评价其对大鼠的毒性作用。**结果** 丹红注射液 600 mg/kg 组大鼠体质量增长明显延缓, 肾功能指标 (BUN、Cr) 明显增加, 组织病理学检查表明肾脏发生病变。**结论** iv 给予丹红注射液 600 mg/kg 对大鼠有明显的肾脏毒性。

关键词: 丹红注射液; 大鼠; 亚慢性毒性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2014)02-0143-004

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.008

Subchronic toxicity of Danhong Injection in rats

XUE Yun, DAI Xiao-li, DAI Xue-dong, MA Yu-kui

Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250033, China

Abstract: **Objective** To investigate the subchronic toxicity of Danhong Injection in rats by continuous iv injection. **Methods** Eighty SD rats (males and females) were randomly divided into control group and Danhong Injection in 3 different dosage groups (600, 200, and 60 mg/kg, 20 in each group). The rats were administered with Danhong Injection by continuous iv injection for 13 weeks. The body weight, blood biochemistry, hematology, viscera relative weight, and histopathology were measured for the overall toxicity assessment. **Results** The normal rats administered with Danhong Injection (600 mg/kg) significantly reduced the growth of body weight and showed abnormal escalation of the levels of urea nitrogen (BUN), creatinine (CR). Pathological changes of kidney were found by histopathological examination. **Conclusion** Danhong Injection with dosage of 600 g/kg has the significant toxicity on kidney by iv injection.

Key words: Danhong Injection; rat; subchronic toxicity

丹红注射液是由丹参、红花配方提取的复方制剂, 具有活血化瘀、通脉舒络功能, 主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑卒中、椎基底动脉供血不足^[1-2]。丹红注射液在临床上的不良反应发生率为 5% 左右, 主要为神经系统、循环系统、皮肤损害及呼吸系统等^[3]。目前国内外研究者已较广泛地研究了其药理学, 但对其毒理学的研究较少, 未见亚慢性毒性研究报道。因此本实验通过给大鼠 iv 丹红注射液 13 周, 检测大鼠血液学、血液生化学及病理学指标, 研究丹红注射液的毒性, 以期为临床应用提供參考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 110~150 g, 由上海斯莱克实验动物公司提供, 合格证号 SCXK (沪) 2007-0005。

1.1.2 药品与试剂 丹红注射液由济南步长制药有限公司提供, 批号 070901-2, 含总黄酮以芦丁计为 75 mg/mL; 血球计数仪测定用试剂由 Drew Scientific 公司提供, 批号 8738101207260436739; 凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 试剂盒均由上海太阳生物技

收稿日期: 2013-08-05

作者简介: 薛 云 (1976—), 女, 山东泰安人, 药师, 主要从事药物临床前安全性评价研究。E-mail: xueyun980702@163.com

*通信作者 马玉奎 (1975—), 男, 山东潍坊人, 博士, 副主任药师, 主要从事药物临床前安全性研究。

Tel: (0531)88962137 E-mail: yukuima@sina.com

术有限公司提供,批号分别为 105065、121021、112041;生化分析仪所用试剂盒由深圳迈瑞生物医疗电子有限公司提供。

1.1.3 仪器 BS300 型生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);C2000 型血凝仪(北京普利生仪器有限公司);S—2000 型电解质分析仪(北京松上技术有限公司);NP—B 包埋机、TK—218 摊烤片机(湖北孝感医疗器械公司)。TP1020 生物组织脱水机、RM2235 切片机、DMLS2 型显微镜(德国徕卡仪器有限公司)。

1.2 剂量设计依据^[4]

丹红注射液临床静脉滴注的最大日剂量为 40 mL/人,以芦丁计为 450 mg,按照 60 kg 体质量计算的剂量为 7.5 mg/kg。按照长期毒性试验剂量设计的原则,本实验的剂量按照剂型毒性试验结果确定,大鼠急性毒性结果显示,750 mg/kg 剂量下,动物给药后立刻出现呼吸急促、俯卧不动、四肢无力、休克等症状,2~8 min 后恢复,而 100 mg/kg 剂量未见任何症状。考虑到给药的周期较长,故选用 600 mg/kg 作为高剂量,为临床用药剂量的 80 倍,60 mg/kg 作为低剂量,为临床用药剂量的 8 倍。并且选用大鼠 iv 给药的常用给药体积 10 mL/kg。

1.3 方法^[5]

健康大鼠 80 只,雌雄各半,随机分为 4 组,即对照组和丹红注射液 600、200、60 mg/kg 剂量组,给药体积 10 mL/kg,对照组静脉给予等容积生理盐

水,每周给药 6 d,停药 1 d,连续给药 13 周,停药恢复 2 周。每周称量 1 次体质量,同时观察大鼠的临床表现、死亡情况等。末次给药及恢复期结束每组各取 10 只动物戊巴比妥钠安乐处死后,腹主动脉取血,行血液学、血液生化学检测,剖检摘取心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、附睾、子宫、卵巢、肾上腺、胸腺等主要脏器称量脏器质量,并计算脏器相对质量。肉眼观察各脏器外观,HE 染色 10 倍光镜下观察脏器病理组织学变化。

1.4 统计学方法处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包进行组间方差分析。

2 结果

2.1 一般体征观察

给药期间丹红注射液 600 mg/kg 剂量组所有大鼠均出现呼吸急促、俯卧不动、四肢无力、耳足尾严重充血、眼睑下垂等反应;200 mg/kg 剂量组所有大鼠均出现呼吸急促、耳足尾轻微充血等反应;60 mg/kg 剂量组大鼠未出现异常反应。

2.2 体质量变化

与对照组比较,雌性大鼠在第 5、7 周,雄性大鼠在第 3、7、9、11、13 周体质量的增长的差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示丹红注射液 600 mg/kg 剂量可明显地抑制大鼠体质量的生长;200、60 mg/kg 剂量对大鼠体质量的生长无明显的影响。见表 1。

表 1 丹红注射液对大鼠体质量变化率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Effects of Danhong Injection on growth of body weight of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	雌性大鼠体质量变化率/%							
		1 周	3 周	5 周	7 周	9 周	11 周	13 周	15 周
对照	—	30.0±7.4	76.7±13.2	104.7±18.2	128.1±19.9	140.1±23.5	150.3±23.8	158.3±28.1	186.8±26.4
丹红	60	30.5±4.6	71.7±10.3	95.9±12.4	125.9±16.9	129.5±15.4	141.6±15.3	150.1±19.4	163.1±14.0
注射	200	30.4±5.2	75.2±11.5	97.8±15.3	121.0±18.8	126.3±16.9	133.9±18.1	139.7±16.8	155.2±11.6
液	600	32.7±8.4	68.3±9.0	89.0±10.7*	112.4±13.2*	122.9±15.1	135.1±15.7	141.2±18.1	159.8±24.5
组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	雄性大鼠体质量变化率/%							
		1 周	3 周	5 周	7 周	9 周	11 周	13 周	15 周
对照	—	50.7±13.6	148.2±24.9	200.7±34.1	258.1±42.4	292.1±48.5	321.7±54.2	337.5±54.6	374.2±42.1
丹红	60	53.4±8.1	149.8±25.5	208.0±27.0	270.5±28.9	298.9±30.1	339.3±29.9	355.5±31.9	395.5±25.5
注射	200	53.9±9.9	144.5±20.2	199.9±23.1	240.5±33.0	263.7±47.1	292.4±43.4	314.1±41.2	328.6±56.1
液	600	40.5±10.0	123.7±21.1*	170.5±39.6	207.5±47.0*	234.4±54.1*	255.7±64.8*	266.1±69.0*	297.4±80.0

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 血液学、血液生化学

与对照组比较,丹红注射液 600、200、60 mg/kg 剂量组在给药 13 周及恢复 2 周时所有血常规指标基本一致;PT、TT 和 APTT 明显延长;600、200 mg/kg 剂量组血清中 BUN、Cr 显著增加,均具有统计学

意义 ($P<0.05$ 、 0.01);60 mg/kg 剂量组的血液生化学指标未见异常。停药 2 周后所有剂量组异常指标恢复正常。以上出现统计学意义的指标说明对大鼠的凝血功能和肝肾功能有较为明显的影响。给药 13 周时差异指标结果见表 2。

表 2 丹红注射液对大鼠血液学和血液生化学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 2 Effects of Danhong Injection on blood biochemistry and hematology of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	给药 13 周结束				
		PT/s	TT/s	APTT/s	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	13.94±1.41	31.59±3.29	22.37±1.27	4.42±0.44	36.70±6.65
丹红注射液	60	17.66±1.51**	35.39±3.02*	24.34±1.02**	4.46±0.72	37.30±4.45
	200	17.54±0.98**	37.11±1.73**	25.58±1.38**	6.06±1.40**	46.90±10.17*
	600	19.35±1.28**	39.99±1.33**	26.58±1.76**	6.59±2.19**	44.82±7.67*
组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	恢复 2 周结束				
		PT/s	TT/s	APTT/s	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	14.38±2.09	31.13±1.40	21.55±0.95	5.11±1.73	36.10±9.57
丹红注射液	60	14.27±1.49	31.39±1.81	21.84±1.46	5.17±1.92	38.20±5.75
	200	14.74±1.80	30.93±2.15	21.70±1.05	5.10±1.84	39.40±7.50
	600	14.79±2.00	29.89±3.11	21.35±0.67	5.84±2.17	39.10±8.82

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

2.4 脏器相对质量

与对照组比较,丹红注射液 600 mg/kg 剂量组雌性大鼠心脏、肝脏和肾脏相对体质量明显增大,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);但相对脑质量未

见明显差异。丹红注射液 200、60 mg/kg 剂量组脏器相对体质量均未见异常。丹红注射液 600 mg/kg 剂量组心脏、肝脏和肾脏等脏器相对体质量的增加于停药 2 周后恢复正常。结果见表 3。

表 3 丹红注射液对雌性大鼠脏器相对体质量和相对脑质量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 3 Effects of Danhong Injection on organ relative weight and relative brain weight of female rats ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	给药 13 周结束的脏器相对体质量/%			恢复 2 周结束的脏器相对体质量/%		
		心脏	肝脏	肾脏	心脏	肝脏	肾脏
对照	—	0.35±0.03	3.53±0.41	0.85±0.05	0.32±0.01	3.30±0.20	0.83±0.08
丹红注射液	60	0.36±0.05	3.82±0.45	0.91±0.09	0.32±0.03	3.92±0.85	0.89±0.12
	200	0.37±0.04	3.67±0.48	0.93±0.08	0.34±0.05	3.53±0.50	0.91±0.09
	600	0.39±0.02*	4.14±0.37*	0.94±0.04*	0.35±0.05	3.67±0.32	0.94±0.10
组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	给药 13 周结束的脏器相对脑质量			恢复 2 周结束的脏器相对脑质量		
		心脏	肝脏	肾脏	心脏	肝脏	肾脏
对照	—	0.50±0.03	5.14±0.79	1.23±0.10	0.47±0.06	4.95±0.71	1.14±0.11
丹红注射液	60	0.51±0.07	5.42±0.72	1.29±0.16	0.50±0.05	5.12±0.49	1.17±0.14
	200	0.51±0.06	5.02±0.41	1.27±0.10	0.48±0.04	4.89±0.32	1.16±0.12
	600	0.53±0.03	5.59±0.73	1.32±0.10	0.50±0.05	5.02±0.51	1.25±0.12

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

2.5 大体病理和组织形态学检查

给药结束时,大鼠各脏器大体解剖未见明显异常。病理组织学检查结果示,对照组和丹红注射液 200、60 mg/kg 剂量组大鼠所有脏器均未见药物相关性病理组织学病变;600 mg/kg 剂量组 20%动物

出现肾脏的病理组织学病变,主要表现为肾小球旁间质内炎细胞浸润,部分肾小管破坏,管腔扩张,肾小管上皮细胞核消失,为间质性肾炎。恢复期结束所有动物的所有脏器均未见明显的药物相关性病理组织学病变。肾脏病理组织切片见图 1。

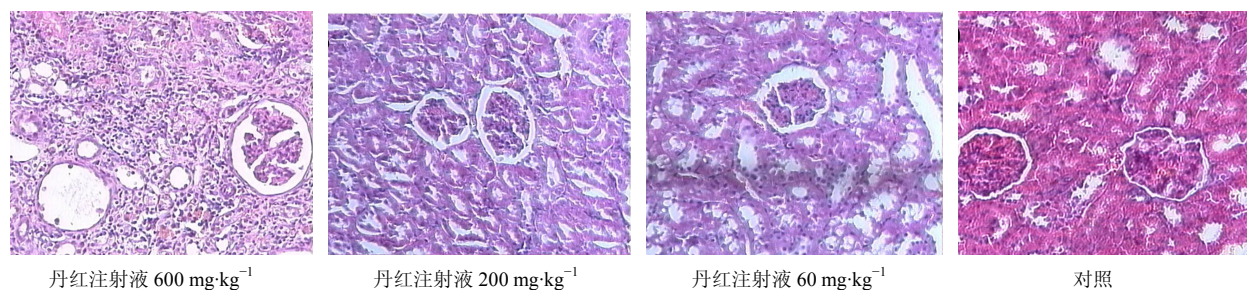


图 1 大鼠肾脏组织切片 HE 染色图

Fig. 1 HE staining of kidney tissue sections in rats

3 讨论

给药期间丹红注射液 600 mg/kg 组所有大鼠均出现呼吸急促、俯卧不动、四肢无力、耳足尾严重充血、眼睑下垂等反应;200 mg/kg 组所有大鼠均出现呼吸急促、耳足尾轻微充血等反应;60 mg/kg 组未见明显反应,具有明显的剂量相关性。出现以上反应的原因分析为丹红注射液具有较强的血管扩张作用,短时间内大剂量丹红注射液进入大鼠体内后,可引起全身血管扩张,血压下降,且丹红注射液为中药注射剂,成分较复杂,可能具有一定的免疫反应,可引起动物出现过敏反应。体质量统计结果显示,丹红注射液 600 mg/kg 剂量可引起雌雄大鼠体质量增长延缓,但对雄性的影响大于雌性,分析为雄性大鼠较雌性大鼠体质量增长较快所致。

肾脏是人体主要的排泄器官,大部分物质均通过肾脏排泄,故对药物比较敏感,药物及其代谢产物可直接损伤肾脏、阻塞肾小管或产生免疫反应损伤肾脏。BUN、Cr 是反映肾功能最直接的指标^[6]。丹红注射液 600、200 mg/kg 大鼠血清中 BUN、Cr 明显升高,病理学检查可见间质性肾炎等,表明丹红注射液 600、200 mg/kg 有明显的肾脏毒性,可能是丹红注射液为丹参、红花提取物灭菌水溶液,为中药注射剂,经过肾脏排泄,且因其成分较复杂,存在一定的免疫毒性,产生免疫反应损伤肾脏。

血凝检测结果显示,TT、PT、APTT 3 项指标与对照组比较明显延长,原因为丹红注射液具有明显的抗凝血作用,此为供试品药效作用的放大,非

药物毒性作用。

脏器相对质量统计结果显示,与对照组比较,丹红注射液 600 mg/kg 组雌性大鼠心脏、肝脏和肾脏相对体质量明显增大,但相对脑质量未见明显增大。主要原因为丹红注射液 600 mg/kg 可明显延缓大鼠体质量增长,而体质量增长的延缓同时脑质量不会受到明显的影响。故脏器与脑的相对质量更能准确反映药物对脏器质量的影响。同时,血液生化学和病理学检查结果显示,心脏和肝脏相关指标未见明显异常,故综合分析可排除药物对心脏和肝脏的影响,而对肾脏的影响主要体现在血液生化学和病理组织学的影响。

长期毒性研究是新药临床前安全性评价的重要内容之一,本研究提示,丹红注射液 iv 给药无毒反应剂量为 60 mg/kg,主要的中毒靶器官为肾脏,提示临床应用中应密切监测患者肾脏的功能。

参考文献

- [1] 姚 郑, 陆 帅. 丹红注射液的临床应用研究进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2011, 19 (11): 1833-1834.
- [2] 韩素环. 丹红注射液治疗脑卒中恢复期瘀血闭阻证的疗效观察 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 461-462.
- [3] 唐进法, 李学林. 丹红注射液不良反应的文献研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(3): 261-263.
- [4] 中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则 [S]. 2005.
- [5] 袁伯俊, 廖明阳, 李 波. 药物毒理学试验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 212-231.
- [6] 周宗灿. 毒理学教程 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 425-427.