

单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定复方对大鼠的长期毒性研究

牟丽丽, 赵 涛, 曹政霞, 孙敬侠, 李 欣*

鲁南制药集团股份有限公司新药安评中心, 山东 临沂 273400

摘要: 目的 观察 SD 大鼠重复 ig 给予单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定(单硝伊伐)复方产生的毒性反应, 比较单硝酸异山梨酯、盐酸伊伐布雷定两药合用后, 毒性是否增加或产生新的毒性。方法 SPF 级 SD 大鼠 120 只, 随机分为空白组, 单硝酸异山梨酯组, 盐酸伊伐布雷定组, 复方低、中、高剂量(35、128、465 mg/kg)组, 每组 20 只, 雌雄各半。按照 10 mL/kg 的给药体积连续 ig 给药 1 个月, 停药观察 2 周, 试验期间进行一般体征观察、体质量、摄食量、血压、心率、血液学、生化学及组织病理学检查。结果 给药组与空白对照组比较外观体征、行为活动、体质量、摄食量、血液学均未见明显异常。复方药物可使大鼠心率呈剂量相关性的降低, 停药后恢复正常。给药末期复方高剂量组收缩压(SBP)、舒张压(DBP)比空白组略低, 恢复期结束后出现反弹性升高。生化检测中给药末期复方高剂量组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和中剂量组 ALT 与空白组、单硝酸异山梨酯组、盐酸伊伐布雷定组比较虽具有统计学差异($P < 0.05$), 但无生物学意义, 恢复期后恢复正常。病理学检查发现: 盐酸伊伐布雷定组、复方组雄性大鼠均可见不同程度的心肌病变动物数量增加或病变程度加重, 单硝酸异山梨酯组、复方组均可见个别雌性大鼠脾脏内含铁血黄素的沉积, 且以上病变动物数量随复方低、中、高剂量的增加有依次递增现象, 停药后未见良好的可恢复性。结论 本试验条件下 SD 大鼠重复 ig 给予复方药物, 毒性靶器官为心脏、脾脏并有一定的性别差异, 同各成分单独使用相比, 未见毒性增加或产生新的毒性。

关键词: 单硝酸异山梨酯; 盐酸伊伐布雷定; 长期毒性

中图分类号: R994.22

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)04-0333-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.04.009

Study on long-term toxicity of isosorbide 5-mononitrate Ivabradine Compound in rats

MOU Li-li, ZHAO Tao, CAO Zheng-xia, SUN Jing-xia, LI Xin

Center for New Drug Safety Evaluation of Lunan Pharmaceutical, Linyi 273400, China

Abstract: Objective To evaluate the toxicity of isosorbide 5-mononitrate (ISMN) and Ivabradine (ISMN-I) Compound on SD rats by continuous ig administration and to compare whether the toxicity increased or new toxicity generated after the combination of the two drugs. **Methods** SPF SD rats (120) were randomly divided into control, ISMN, Ivabradine, low-, mid-, and high-dose [35, 128, and 465 mg/kg] compound groups, 20 in each group, half male and half female. The rats were consecutively drenched at 10 mg/kg for 1 months and observed for 2 weeks after stopping drug administration. General condition, body weight, food consumption, blood pressure, heart rate, haematology, biochemical tests, and histopathology were performed during the experiment. **Results** The treated groups compared with the control group, there were no significant changes on appearance of the signs, behavior, body weight, food consumption, and haematology. Compound drugs could make the heart rate decreased in a dose dependent manner, but returned to normal after drug withdrawal. SBP and DBP in the high-dose group slightly lower than those in the control group during delivery stage, but increased reboundly after recovery period. Compared with the control group, ISMN and Ivabradine groups, ALT and ALP in the high-dose group and ALT in the mid-dose group had statistically difference, but no biological significance ($P < 0.05$), and returned to normal after recovery period. Obvious pathological changes were observed: different degrees of the increase in the number of animal disease or myocardial lesions were observed in Ivabradine and Compound groups of male rats, deposition of hemosiderin in the spleen was observed in ISMN and Compound groups of individual female rats, with the increasing dose of compound, the number of disease animal had the increasing order of phenomena, no good recovery after stopping drug administration. **Conclusion** By continuous ig compound to SD rats, there are the toxic target organs of heart and spleen and some sex differences. The toxicity is not increased or generated compared with the ingredients used alone.

Key words: ISMN; Ivabradine; long-term toxicity

收稿日期: 2014-02-28

作者简介: 牟丽丽(1984—), 女, 学士, 主要从事药理毒理实验研究。E-mail: mlzh686@163.com

*通信作者 李 欣 E-mail: 15953993769@163.com

单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定复方(单硝酸伊伐复方)临床拟用于预防血管痉挛型和混合型心绞痛,并适用于心肌梗死后的治疗及慢性心衰的长期治疗。硝酸酯类药物是治疗冠心病、心绞痛可靠的重要药物。其中单硝酸异山梨酯进入体内后释放NO,松弛血管平滑肌细胞,使外周动脉和静脉扩张,降低心脏的前后负荷,扩张冠状动脉,增加心肌的灌注,减轻心肌缺血症状,但其扩张血管后会反射性的引起心率升高,不利于心肌的血液供应。 β 受体阻滞剂是目前最常用的减慢心率的药物,但其临床应用存在气道阻塞、房室传导阻滞等许多禁忌证。因此特异性降低心率的药物,如窦房结 I_f 电流抑制剂越来越受到研究者的重视。伊伐布雷定是目前惟一用于临床的 I_f 抑制剂,无论是动物实验还是人体试验均显示其能够降低静息心率和运动心率^[1],弥补单硝酸异山梨酯的副作用。本研究即针对山东新时代药业研发的单硝酸伊伐复方进行大鼠长期毒性实验,观察连续给药后机体产生的毒性反应、靶器官、损害的可逆性等^[2-3],为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 受试药物及试剂

单硝酸伊伐复方成人临床拟用量为 50 mg/d,复方成分:单硝酸异山梨酯(批号 1011018,质量分数 100.01%)、盐酸伊伐布雷定(批号 101001,质量分数 99.5%)由山东新时代药业有限公司提供,两种药物根据不同配比以纯化水配制相应浓度的溶液,遮光、密封保存。检测试剂均为市售,由美国雅培及深圳越华科技有限公司提供。

1.2 仪器

BP—2006A 智能无创血压计,北京软隆生物技术有限公司;Cell-Dyn3700 型血液分析仪,美国雅培公司;BS—200 型全自动生化分析仪,深圳迈瑞生物医疗股份有限公司。

1.3 动物分组及给药

SD 大鼠 120 只,雌雄各半,体质量 180~300 g,购自山东新时代药业有限公司实验动物中心,生产许可证 SCXK(鲁) 2006-0019,合格证号 NO.0008070。饲养于屏障环境,温度 20~26℃,日温差 $\leq 3^\circ\text{C}$,相对湿度 40%~70%,饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供。动物适应 3 d 后,随机分为空白组(纯化水)和复方低、中、高(35、128、465 mg/kg)剂量组,并根据复方高剂量组中单硝酸异山梨酯、盐酸伊伐布雷定的用量,另设单

硝酸异山梨酯组(372 mg/kg)、盐酸伊伐布雷定组(93 mg/kg),共 6 组,每组 20 只,雌雄各半。所有动物每日 ig 给药 1 次,给药体积为 10 mL/kg,连续给药 1 个月,停药观察 2 周。

1.4 指标检测

(1) 每日进行一般状态观察,观察动物行为活动、饮食饮水、排便等。(2) 给药开始后每 4 天测定 1 次体质量,并根据体质量及时调整动物给药量,每 5 天测定 1 次摄食量。(3) 给药前、每次解剖前进行血压、心率(HR)检查,给药期和恢复期结束后第 2 天解剖并进行病理学、血液学、生化学检查。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理,定量指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示,定性指标使用频数计数描述。若数据符合正态分布,则进行单因素方差分析。如果方差分析结果不显著则统计结束,若方差分析结果显著($P \leq 0.05$)则考察方差齐性,若方差齐,则用 LSD 参数检验法进行多重比较检验,若方差不齐($P \leq 0.05$),则用 Dunnett-T3 参数检验法进行多重比较检验。

2 结果

2.1 一般状态、体质量、摄食量

给药动物的一般行为、活动、粪便等与空白组比较在给药期及恢复期均未见明显差异。体质量、摄食量各组之间无明显差异。

2.2 血压、HR

与空白组比较,给药末期盐酸伊伐布雷定组及复方低、中、高剂量组 HR 减慢($P < 0.05$);复方高剂量组与单硝酸异山梨酯组比较 HR 减慢($P < 0.05$),与盐酸伊伐布雷定组比较虽略有降低但无统计学差异;恢复期后各组之间无明显差异。给药末期高剂量组收缩压(SBP)与单硝酸异山梨酯组比较降低($P < 0.05$),与盐酸伊伐布雷定组比较虽略有降低但无统计学差异;复方高剂量组舒张压(DBP)与空白组、单硝酸异山梨酯组、盐酸伊伐布雷定组比较降低($P < 0.05$);恢复期复方高剂量组 SBP、DBP 与空白组、单硝酸异山梨酯组、盐酸伊伐布雷定组比较升高($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 血液学指标

各组动物给药期及恢复期末,血液学未见有生物学意义上的差异。

2.4 生化学指标

给药末期高剂量组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和中剂量组 ALT 与空白对照组、

单硝酸异山梨酯组、盐酸伊伐布雷定组比较明显升高 ($P<0.05$), 恢复期后无明显差异。见表2。

2.5 病理组织学检查

病理学检查未发现药物对肝脏、肺脏、肾脏、脑及胃肠道组织等器官有显著的毒性作用。但本试

验发现在雄性大鼠心脏方面, 与空白组和单硝酸异山梨酯组比较, 盐酸伊伐布雷定组及复方低、中、高剂量组内均可见不同程度的病变动物数量增加或心肌病变程度加重, 且复方低、中、高剂量组病变动物数量有依次递增现象, 复方高剂量组病变程度

表1 单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定复方对大鼠血压、心率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of ISMN-I Compound on blood pressure and heart rate indexes of SD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药前 (n=20)			给药末期 (n=20)			恢复期 (n=10)		
		HR/(次·min ⁻¹)	SBP/mmHg	DBP/mmHg	HR/(次·min ⁻¹)	SBP/mmHg	DBP/mmHg	HR/(次·min ⁻¹)	SBP/mmHg	DBP/mmHg
空白	—	379±32	151±10	112±10	392±29	135±12	107±13	392±23	130±9	103±10
单硝酸异山梨酯	372	373±22	155±9	118±12	384±32	142±9	113±12	382±34	136±12	100±11
盐酸伊伐布雷定	93	389±36	156±11	118±12	252±54*	138±16	103±14	369±38	134±11	106±10
单硝伊伐复方	35	378±28	154±13	120±11	347±31*	141±16	109±18	361±21	135±6	108±4
	128	369±20	152±11	116±10	288±48*	132±15	98±16	383±39	140±15	110±13
	465	372±18	159±14	119±14	204±49 [#]	125±18 [#]	90±15 ^{*#Δ}	383±47	149±10 ^{*#Δ}	121±9 ^{*#Δ}

与空白组比较: * $P<0.05$; 与单硝酸异山梨酯组比较: [#] $P<0.05$; 与盐酸伊伐布雷定组比较: ^Δ $P<0.05$ (1 mmHg=0.133 kPa)

* $P<0.05$ vs blank group; [#] $P<0.05$ vs ISMN group; ^Δ $P<0.05$ vs Ivabradine group (1 mmHg=0.133 kPa)

表2 单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定复方对大鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of ISMN-I Compound on blood biochemical indexes of SD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	时间	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	γ-GT/(U·L ⁻¹)
空白	—	给药末期	0.52±0.19	1.66±0.22	41.00±4.97	69.89±8.40	51.71±2.77	32.01±1.31	0.22±0.44
		恢复期末	0.70±0.24	1.86±0.22	39.80±8.39	96.20±13.75	56.32±2.09	34.22±1.25	0.40±0.52
单硝酸异山梨酯	372	给药末期	0.48±0.10	1.89±0.30	39.22±5.36	71.11±6.31	52.40±3.34	32.97±1.40	0.33±0.50
		恢复期末	0.52±0.15	1.73±0.17	38.00±6.86	99.10±16.83	55.16±2.82	33.03±1.43	0.60±0.70
盐酸伊伐布雷定	93	给药末期	0.62±0.11	1.54±0.13	43.67±5.87	80.67±11.35	51.17±2.64	31.76±1.44	0.44±0.53
		恢复期末	0.64±0.23	1.82±0.27	37.50±6.35	98.70±15.67	56.25±1.83	33.80±1.14	0.70±0.48
单硝伊伐复方	35	给药末期	0.43±0.09	1.65±0.18	44.20±7.63	75.50±14.14	52.50±3.54	32.40±1.66	0.60±0.52
		恢复期末	0.59±0.15	1.68±0.19	32.90±6.64	94.70±15.20	54.32±2.49	32.03±1.19	0.80±0.63
	128	给药末期	0.40±0.06	1.63±0.11	50.70±9.72 ^{*#Δ}	76.40±12.34	51.51±3.28	31.96±1.57	0.40±0.52
		恢复期末	0.59±0.21	1.75±0.14	35.90±5.38	92.50±13.42	54.47±1.95	32.38±0.92	0.80±0.42
	465	给药末期	0.57±0.12	1.84±0.46	55.90±9.30 ^{*#Δ}	77.40±14.40	53.23±2.17	32.25±1.32	0.60±0.52
		恢复期末	0.57±0.16	1.63±0.19	35.11±6.13	104.22±14.26	54.10±2.64	32.28±1.25	0.56±0.53
组别	剂量	时间	ALP/(U·L ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	UREA/(mol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)	T-Bil/(μmol·L ⁻¹)	
空白	—	给药末期	127.67±16.47	522.56±218.72	7.35±1.32	55.40±8.66	7.55±0.99	2.01±0.38	
		恢复期末	129.90±28.80	857.90±249.26	6.85±1.36	54.45±5.89	6.86±0.36	1.78±0.78	
单硝酸异山梨酯	372	给药末期	133.33±20.71	756.33±219.25	7.23±0.83	48.77±4.93	6.67±0.49	1.90±0.62	
		恢复期末	114.30±13.08	875.60±496.20	6.09±0.94	53.16±4.61	6.22±0.55	2.46±0.89	
盐酸伊伐布雷定	93	给药末期	144.22±37.72	795.13±212.37	7.62±1.37	50.13±5.65	6.21±0.79	2.34±2.24	
		恢复期末	130.40±16.16	817.80±465.54	6.46±0.46	58.18±5.53	6.79±0.54	1.82±0.65	
单硝伊伐复方	35	给药末期	129.10±24.81	680.70±274.35	6.35±0.47	50.98±10.34	7.27±1.83	2.49±0.68	
		恢复期末	114.90±25.44	771.70±426.22	5.63±0.68	54.85±7.24	6.32±0.63	2.37±0.76	
	128	给药末期	140.50±22.22	626.40±313.05	6.19±0.36	52.48±5.72	7.02±0.76	2.22±0.66	
		恢复期末	121.70±19.42	650.40±391.71	5.88±0.66	53.75±5.00	6.68±0.28	2.09±0.49	
	465	给药末期	171.20±40.89 ^{*#Δ}	730.80±323.17	6.39±0.94	50.63±6.05	6.13±0.47	2.36±0.46	
		恢复期末	118.44±18.53	981.89±314.89	5.06±0.55	51.41±4.63	5.93±0.40	1.96±0.60	

与空白组比较: * $P<0.05$; 与单硝酸异山梨酯组比较: [#] $P<0.05$; 与盐酸伊伐布雷定组比较: ^Δ $P<0.05$

* $P<0.05$ vs blank group; [#] $P<0.05$ vs ISMN group; ^Δ $P<0.05$ vs Ivabradine group

与盐酸伊伐布雷定组大致相当, 停药 2 周心肌病变程度有所减轻, 但雌性大鼠心脏无明显心肌病变; 在脾脏方面, 单硝酸异山梨酯组、复方组均可见个

别动物脾脏内含铁血黄素的沉积, 复方各组随着剂量的增加, 病变动物的数量逐渐增加, 且病变动物主要体现在雌性大鼠。见表 3。

表 3 单硝酸异山梨酯盐酸伊伐布雷定复方对大鼠心脏和脾脏的影响 ($n=10$)

Table 3 Effect of ISMN-I Compound on heart and spleen of SD rats ($n=10$)

组别	剂量 /(mg·kg ⁻¹)	性别	心肌损伤/例							脾内含铁血黄素颗粒沉着/例		
			病变	给药末期			恢复期末			病变	给药末期	恢复期末
				轻	中	重	轻	中	重			
空白	—	雄	4	2	0	0	2	0	0	0	0	0
		雌	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
单硝酸异山梨酯	372	雄	4	2	0	0	2	0	0	1	0	1
		雌	1	0	0	0	1	0	0	5	2	3
盐酸伊伐布雷定	93	雄	9	1	2	2	3	1	0	0	0	0
		雌	6	4	1	0	1	0	0	0	0	0
单硝伊伐复方	35	雄	6	1	0	2	3	0	0	0	0	0
		雌	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2
	128	雄	7	1	1	1	2	2	0	3	1	2
		雌	4	3	0	0	1	0	0	6	3	3
	465	雄	10	1	3	1	3	2	0	0	0	0
		雌	2	1	1	0	0	0	0	9	4	5

3 讨论

本次实验中给药末期进行的血压心率测定, 复方药物随着剂量的增加心率逐渐越低, 呈现剂量相关性, 这是伊伐布雷定加入后能够很好地降低心率的药理作用的结果^[4]。结合单硝酸异山梨酯、盐酸伊伐布雷定药动学特性: 单硝酸异山梨酯口服吸收迅速, 无肝脏首关效应, 生物利用度 100%, 且不引起药物蓄积, 但长期用药可出现耐受性; 伊伐布雷定在血浆中的消除半衰期短, 连续给药后母药体内无蓄积现象, 但其代谢产物存在一定的蓄积^[5]。给药末期高剂量组 SBP、DBP 的降低可能与两药合用后作用放大有关, 大剂量给予单硝酸异山梨酯能扩张血管降低心脏的前后负荷, 伊伐布雷定能显著的降低大鼠心率, 两方面共同作用使得 SBP、DBP 下降, 恢复期结束后出现反弹性升高。

给药末期复方中、高剂量组 ALT 指标升高, 但仍在正常值 (28.0~60.0 U/L) 范围内^[6], 其他指标无明显差异, 且病理组织学上除心脏、脾脏外未见其他器官器质性明显改变, 亦未见单硝酸异山梨酯、盐酸伊伐布雷定关于肝脏损伤的相关文献报道, 因此认为该差异虽具有统计学差异, 但无生物学意义。高剂量组 ALP 因个别数据较大, 引起数据升高, 但其他生化指标未见生物学意义改变, 分析该差异虽

具有统计学差异, 但不具有生物学意义。

病理学检查方面, 空白组与单硝酸异山梨酯组心肌病变程度较轻, 数量较少且雄性多于雌性, 符合啮齿类动物心肌自发性病变病理形态学改变^[7], 且单硝酸异山梨酯组与空白组镜下病理形态学改变一致, 考虑为啮齿类动物心肌自发性病变范畴。与空白组和单硝酸异山梨酯组比较, 盐酸伊伐布雷定组及复方低、中、高剂量组内均可见不同程度的心肌病变动物数量增加或病变程度加重, 且有依次递增现象, 表明心肌毒性作用可能与盐酸伊伐布雷定的加入有关, 本实验结果与文献中报道的盐酸伊伐布雷定可引起局灶性的心肌损害这一结果一致^[8], 且有性别差异, 主要体现在雄性动物。在脾脏方面, 除空白组和盐酸伊伐布雷定组外, 其他各组均可见个别动物脾内有少量含铁血黄素颗粒沉着, 且雌性动物例数较雄性多, 考虑复方组中该病变的发生可能与单硝酸异山梨酯的加入有关, 此实验结果与文献中报道的单硝酸异山梨酯可使脾内含铁血黄素颗粒沉着这一实验结果相一致^[9]。

由上可见, 本实验中, SD 大鼠 ig 给予单硝伊伐复方 35、128、465 mg/kg, 毒性靶器官为心脏、脾脏且有一定的性别差异, 复方药物与单硝酸异山梨酯、盐酸伊伐布雷定单方比较未见毒性增加、未

见有新的毒性。

参考文献

- [1] Borer J S, Fox K, Jaillon P, *et al.* Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an I(f) inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial [J]. *Circulation*, 2003, 107(6): 817-823.
- [2] 化学药物长期毒性试验技术指导原则 [S]. 2008.
- [3] 袁伯俊, 廖明阳, 李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2007: 213-214.
- [4] 高 照, 李法琦. 伊伐布雷定减慢心率的研究现状 [J]. *心血管病学进展*, 2009, 30(6): 995-998.
- [5] 郑丽云, 郭 歆, 余 鹏, 等. 盐酸伊伐布雷定片人体药动学研究 [J]. *临床药理学*, 2013, 18(1): 55-62.
- [6] 齐 云, 蔡润兰, 刘 彬, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之五——SPF级SD大鼠血液生化参考值的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(4): 193-196.
- [7] 张丽丽, 陈 浩, 陈云祥, 等. 不同年龄段正常 SD 大鼠组织病理学变化 [J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(4): 338.
- [8] EMEA. European Public Assessment Report (EPAR): *Scientific Discussion for Procoralan* [M]. London: EMEA, 2005..
- [9] 刘兆平, 刘亚玲, 吴葆杰. 新一代硝酸酯类药单硝酸异山梨酯 [J]. *国外医药: 合成药、生化药、制剂分册*, 1990, 11(4): 220.