

• 安全性评价 •

BALB/c 小鼠单次经口灌胃瑞格列汀的安全药理学研究

周晓冰¹, 刘晓萌¹, 张连山², 姜 华¹, 孟建华¹, 汪巨峰¹, 李 波^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222047

摘要: 目的 评价 ig 瑞格列汀对小鼠自主活动及协同睡眠的影响, 以发现潜在非期望药理作用。方法 将小鼠随机分为 4 组, 包括对照组和瑞格列汀 10、20、40 mg/kg 组, 单次 ig 给予溶媒或供试品, 进行小鼠自主活动次数测定和协同睡眠影响分析。结果 ig 给药后, 各组动物均未见异常, 未出现行动迟缓、活动不协调等反应。不同剂量组之间动物自主活动次数无明显差异。在接受戊巴比妥钠注射后, 与对照组动物相比较, 供试品给药组动物的入睡率无显著性差异。结论 ig 瑞格列汀在 40 mg/kg 及其剂量以下对小鼠自主活动无显著性影响, 与阈下催眠剂量的戊巴比妥钠合用无明显协同催眠作用。研究结果为临床进一步评价其安全性奠定了基础。

关键词: 瑞格列汀; 自主活动次数; 协同催眠; 安全性**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)01-0080-03**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.014

Safety pharmacology studies on single ig administration of retaglipatin in BALB/c mice

ZHOU Xiao-bing¹, LIU Xiao-meng¹, ZHANG Lian-shan², JIANG Hua¹, MENG Jian-hua¹,
Wang Ju-feng¹, LI Bo^{1*}

1. National center for safety evaluation of drugs, National Institutes for food and drug control, Beijing 100176, China

2. Jiang su heng rui medicine Co. LTD, Lianyungang 222047, China

Abstract: Objective To investigate the effects of retaglipatin on autonomic activities and synergy sleep of mice and its potential unexpected pharmacology. **Methods** Mice were randomly divided into control, 10, 20, and 40 mg/kg retaglipatin groups. The animals were ig administered with vehicle control or test article. Then the number of mouse autonomic activities was detected and the effect on animal synergy sleep was analyzed. **Results** No abnormal reactions, such as slow behavior and discordant activity, were found in animals of all groups after treatment. There were no significant differences on autonomic activities of mice from different groups. Following injection with sodium pentobarbital, the sleeping rates of mice from test article-treated group was not different from the control group. **Conclusion** Our study indicates that the administration with 40 mg/kg or less retaglipatin has no significant effect on autonomic activity and synergy sleep of mice against subthreshold hypnotic dose of sodium pentobarbital. These results will facilitate the further clinical safety study of retaglipatin.

Key words: retaglipatin; autonomic activity; synergy sleep; safety

2 型糖尿病为目前最常见的慢性非传染病之一, 其患病率呈急速上升趋势, 按照世界糖尿病联盟 (IDF) 统计, 2013 年全球糖尿病患者高达 3.8 亿, 已成为严重的全球性健康问题。其中 80% 患者

来自中低收入国家, 且多数患者控制不佳, 因此, 糖尿病的治疗仍面临巨大挑战^[1]。近些年, 随着对 2 型糖尿病发病机制和治疗的深入研究, 以肠促胰素为基础的治疗方案成为 2 型糖尿病研究领域的热

收稿日期: 2015-11-19

基金项目: 十二五“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09302001)

作者简介: 周晓冰, 副研究员, 博士, 研究方向为临床前药物安全性评价。

*通信作者: 李 波, 研究员, 博士生导师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Email: libo@nicpbp.org.cn

点方向之一,其不同于传统降糖药的独特机制和获益为糖尿病治疗开辟了新的途径。目前临床基于胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 的研发药物包括 GLP-1 受体激动剂及二肽基肽酶 4 (DPP-4) 抑制剂,二者的临床疗效已在临床得到证实^[2,3]。

瑞格列汀为 DPP-4 抑制剂类的新型降糖药物,其化学结构与西格列汀相似,是由江苏恒瑞医药股份有限公司自主研发的国家 1.1 类新药。在本研究中,通过给 BALB/c 小鼠单次 ig 给予瑞格列汀,进行安全药理学研究,以观察供试品对小鼠自主活动及协同睡眠的影响,从而发现供试品有无可能的非期望药理作用。

1 材料与方法

1.1 供试品

瑞格列汀(批号 20080228)由江苏恒瑞医药股份有限公司提供,放置 2~8℃ 保存。采用超纯水作为溶媒。

1.2 实验动物

6 周龄 SPF 级小鼠 120 只(雌雄各半),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-京-2007-0001);采用动物金属笼饲养,每笼 2~3 只。饲养房间温度为 20~24℃;湿度为 43%~70%,换气次数 10~20 次/h, 12 h 照明,自由摄食。

1.3 研究设计

参照“化学药物一般药理学研究技术指导原则”的要求,通过给小鼠单次 ig 供试品,观察供试品对小鼠自主活动和协同睡眠的影响。

将检疫期检定合格的小鼠按体重随机分成 4 组,每组 30 只,雌雄各半,包括对照组和瑞格列汀低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)组,ig 给药,给药体积为 2 μL/g。其中每组 10 只用于小鼠自主活动次数测定,另外 20 只用于协同睡眠影响的研究。

1.4 小鼠自主活动次数测定

根据已有的药动学资料显示,不同剂量供试品 ig 给药后,小鼠血药浓度达峰时间为 1.25~5 h,血浆消除半衰期为 3.4~7.3 h,根据药物代谢的这一特点,应用自主活动监测系统分别依次记录各组动物于给药前、给药后 30 min、1、2、4、6 h 在 5 min 内的自发活动次数。

1.5 对阈下剂量戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响

通过预实验确定戊巴比妥钠阈下催眠剂量

(80%~90%小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大阈下剂量)为 33 mg/kg。同时选择接近药物达峰浓度的平均时间,即给动物 ig 超纯水或不同浓度的供试品后 2.5 h ip 戊巴比妥钠,记录 30 min 内入睡动物数(翻正反射消失达 1 min 以上者),进行协同睡眠测定。比较对照组与不同剂量给药实验组入睡动物数之间的差异,如入睡动物发生率增加有显著差异,则实验结果阳性。

1.6 统计学分析

对于自发活动次数按照以下方法统计:(1)首先用 Bartlett 检验方法进行数据均一性检验,如果数据均一(检验 $P>0.05$),则进行方差分析检验(F 检验);如果 Bartlett 检验的结果显著($P<0.05$),则进行 Kruskal-wallis 检验。(2)如果方差分析检验结果显著($P<0.05$),则进一步用 Dunett 参数检验法进行多重比较检验;如果方差分析结果不显著($P>0.05$),则统计结束。(3)如果 Kruskal-wallis 检验结果显著($P<0.05$),则进一步用 Dunett 非参数检验法进行多重比较检验;如果 Kruskal-wallis 检验结果不显著($P>0.05$),则统计结束。对于协同睡眠实验入睡动物数的半定量数据,采用多组群的 Ridit 法检验,如果结果显著($P<0.05$),则继续用两组群的 Ridit 检验做进一步的统计。

2 结果

2.1 对小鼠自主活动次数的影响

ig 给药后,所有小鼠活动均未见异常,未出现行动迟缓、活动不协调等反应。小鼠自主活动次数测定结果显示:不同性别小鼠之间动物自主活动次数无明显差异,但不同个体小鼠之间的活动数差异甚大;ig 给药后 2 h,与对照组相比较,10 mg/kg 组动物自主活动次数显著性降低($P<0.05$),而其他剂量组动物在多个不同时间点测定自主活动次数均未出现显著性改变。此外,不同剂量供试品给药组小鼠在给药 1 h 后自主活动次数呈逐渐增加趋势。见表 1。

2.2 对戊巴比妥钠致小鼠睡眠的影响

观察 ip 戊巴比妥钠后 30 min 内各组入睡动物数,结果显示,对照组和瑞格列汀 10 mg/kg 组中各有 2 只动物进入睡眠,而 20 mg/kg 组有 5 只进入睡眠,40 mg/kg 组无动物进入睡眠。尽管 20 mg/kg 组与对照组相比睡眠率略有增加,但是无统计学意义上的差异。见表 2。

表1 给药后小鼠自主活动次数测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Numbers of independent activity of mice after administration ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	自主活动次数/次					
		给药前	给药后 15 min	给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 6 h
对照	0	796±357	767±363	801±391	1083±220	1135±276	1250±174
瑞格列汀	10	816±286	551±295	664±344	610±432*	1012±250	1041±302
	20	701±135	408±183	410±221	899±310	913±388	898±352
	40	856±112	547±238	639±347	773±422	932±312	1106±240

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

表2 给药后小鼠协同睡眠分析结果

Table 2 Coordinated sleep analysis on mice after administration

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数	睡眠动物数	睡眠率/%
对照	0	20	2	10
瑞格列汀	10	20	2	10
	20	19*	5	26
	40	20	0	0

*有一只小鼠在注射戊巴比妥钠时意外死亡。

3 讨论

本供试品前期小鼠药效学研究有效剂量为 3~10 mg/kg, 临床试验拟用剂量为 100 mg/d (约 1.7 mg/kg)。根据上述相关信息, 本实验设定供试品给药组的 3 个剂量分别为 10、20、40 mg/kg。上述剂量分别相当于人临床拟用单位体重剂量 (1.7 mg/kg) 的 6、12、24 倍, 单位体表面积剂量 (61.6 mg/m²) 的 0.5、1.1、2.1 倍, 分别为小鼠药效学剂量 (10 mg/kg) 的 1、2、4 倍。

小鼠自主活动实验是安全药理学研究中最常用方法之一, 在评价药物对中枢神经系统的影响有重要意义^[4]。本研究结果发现, 与对照组相比, 3 个不同剂量给药组在给药后几乎所有时间点测定的动物自主活动次数均无显著性差异。仅 10 mg/kg 组动物在给药 2 h 后表现出自主活动次数减少, 该变化无明显剂量相关性, 且仅出现在给药后 2 h 这一个时间点, 因此认为该统计学差异是由动物个体差异造成, 与供试品作用不相关。此外, 也发现对照组和给药组动物在给药 1 h 后小鼠自主活动呈现逐渐增加趋势, 推测这可能与在 ig 给药过程中给小鼠带来精神上的惊吓和生理上的刺激有关, 导致小鼠短时间内无法消除这种外界的干扰, 自主活动相对减少。然后随着时间推移, 各组动物逐渐恢复和适应, 从而相应的自主活动次数逐渐增多^[5]。

在本研究中, 采用预实验摸索确定戊巴比妥钠阈下催眠剂量 (即 80%~90% 小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大阈下剂量) 为 33 mg/kg。然而在小鼠协同睡眠分析过程中, 有一只小鼠注射戊巴比妥钠后死亡, 可能原因是由于不同小鼠个体对戊巴比妥钠耐受性的差异所致。尽管 20 mg/kg 给药组动物在注射戊巴比妥钠后, 入睡动物数略增多, 但不具有统计学差异, 且 10 mg/kg 组及 40 mg/kg 均未表现出睡眠率增加的趋势, 因此认为供试品在 40 mg/kg 及其剂量以下对戊巴比妥钠阈下催眠剂量的小鼠无显著的催眠作用, 与阈下催眠剂量的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用。

综上所述, 小鼠分别单次 ig 给予 10、20、40 mg/kg 瑞格列汀实验结果表明, 在 40 mg/kg 及其剂量以下对小鼠自主活动无显著影响, 与阈下催眠剂量 (33 mg/kg) 的戊巴比妥钠无明显协同催眠作用。这些研究结果为进一步临床评价瑞格列汀的安全性奠定了基础。

参考文献

- [1] IDF. 2013 Annual Report. [EB/OL] [2015-09-14]. <http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/IDF-AR-2013-final-rv.pdf>.
- [2] Pan C Y, Yang W, Tou C, et al. Efficacy and safety of saxagliptin in drug-naive Asian patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(3): 268-275.
- [3] Mohan V, Yang W, Son H Y, et al. Efficacy and safety of sitagliptin in the treatment of patients with type 2 diabetes in China, India, and Korea [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 83(1): 106-116.
- [4] 买文丽, 王 琼, 刘新民, 等. 小鼠自主活动实验中的评价指标 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(3): 172-175.
- [5] 魏凤环, 莫志贤, 王 永. 灌胃刺激对小鼠自主活动计数的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(3): 356-357.