

【 安全性评价 】

冠心宁注射液对大鼠重复给药毒性试验研究

戴晓莉, 马玉奎, 胡建廷, 武复荣*

山东省药学院, 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101

摘要: **目的** 研究SD大鼠连续iv冠心宁注射液13周的毒性反应。**方法** 120只大鼠随机分为4组: 溶媒对照组和冠心宁注射液高、中、低剂量(3.40、1.70、0.85 g/kg)组, 雌雄各半。连续iv给药13周, 每周检测1次体质量和摄食量, 每天观察动物给药后外观体征变化, 分别于给药结束和停药4周时进行脏器相对质量(脏脑比)、血液学指标、血液生化学指标、组织病理学检查。**结果** 冠心宁注射液3.40、1.70 g/kg每次给药后即刻出现呼吸急促、步态不稳、俯卧不动、眼球突出等征状, 随给药时间的延长, 上述症状逐渐减轻, 恢复时间逐渐缩短; 0.85 g/kg剂量组动物未出现明显的异常反应。冠心宁注射液3.40 g/kg剂量下2只雄性动物给药约4周时死亡, 0.85、1.70 g/kg剂量组均未出现动物死亡。与溶媒对照组比较, 0.85、1.70 g/kg剂量组动物血液学、血液生化学、脏器相对质量、组织病理学检查均未见明显异常; 冠心宁注射液3.40 g/kg剂量下给药13周后可导致大鼠血液中尿素氮(BUN)水平明显升高、肾脏相对质量明显增加; 停药4周后, 上述各项指标均恢复正常, 其余检测指标未见明显异常。**结论** 重复大剂量iv冠心宁注射液对大鼠有肾脏毒性, 重复iv给予0.85 g/kg无毒性反应, 是临床等效剂量的12倍。

关键词: 冠心宁注射液; 大鼠; 重复给药; 毒性研究; 肾脏

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)02-0210-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.013

Experimental study on chronic toxicity of Guanxinling Injection in rats

DAI Xiao-li, Ma Yu-kui, HU Jian-ting, WU Fu-rong

Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, New Drug Evaluation Center of Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250101, China

Abstract: **Objective** To observe the repeat administration toxicity of Guanxinling Injection in rats. **Methods** Totally 120 rats (males and females) were randomly divided into vehicle control group and three Guanxinling Injection groups with different dosages (3.40, 1.70, and 0.85 g/kg). Rats were administered with Guanxinling Injection by consecutive intravenous injection for 13 weeks. Besides the general conditions were observed, the related indexes were detected, such as body weight, the routine control of blood, hepatic function, renal function, the metabolism condition of lipids, the glycometabolism indexes, and histopathology analysis were determined at 13 weeks of treatments and 4 weeks after the withdrawal, respectively. **Results** Rats in the Guanxinling Injection group at 3.40, 1.70 g/kg appearance shortness of breath, unsteady gait, lying motionless, and other symptoms. There was no obvious abnormal reaction in the 0.85 g/kg dose group. There were two male rats in the Guanxinling Injection group at 3.40 g/kg died at about week 4 of treatments, and there was no death in the 0.85 and 1.70 g/kg dose groups. Compared with vehicle control group, the related indexes of blood, blood biochemistry, organ relative quality, and histopathological showed no obvious abnormalities in Guanxinling Injection 0.85 and 1.70 g/kg group. The levels of urea nitrogen (BUN) and the relative weight of kidney in Guanxinling Injection 3.40 g/kg group were significantly higher than those in vehicle control group at 13 weeks. The change of these parameters regained to normal at 4 weeks after withdrawal and the rest of the detection index showed no obvious abnormality in 3.40 g/kg dose group. **Conclusion** Intravenous administration of Guanxinling Injection for 13 weeks at high dose could induce reversible damage to kidney.

Key words: Guanxinling Injection; rat; consecutive intravenous injection; toxicity study; kidney

收稿日期: 2016-07-15

作者简介: 戴晓莉(1982—), 女, 山东济南人, 硕士, 主管药师, 主要从事药物临床前安全性评价研究。E-mail: lily198206@163.com

*通信作者 武复荣, 女, 山东省药学院新药评价中心, 主任药师。E-mail: wufurong926@163.com

冠心宁注射液是由丹参、川芎经提取制成的复方中药注射剂,具有通脉养心、活血化瘀的功效,临床上广泛应用于冠心病、心绞痛等疾病的治疗^[1-4]。自冠心宁注射液上市以来,其疗效较为显著,临床应用广泛。但近年来穿琥宁注射液、鱼腥草注射液等中药注射液安全事故的发生,造成中药注射剂安全性受到社会的质疑^[5]。国家食品药品监督管理局(CFDA)于2012年颁布了冠心宁注射液新的质量标准(WS3-B-3267-98-2012),在原标准(WS3-B-3267-98)的基础上增加了指纹图谱及迷迭香酸、丹酚酸B等组分的测定,能更全面控制冠心宁注射液的质量^[1-2,4]。本试验对大鼠重复给药新标准冠心宁注射液可能导致的毒性反应进行研究,对其安全性进行再评价,以期为临床安全、有效地使用冠心宁注射液提供依据。

1 材料

1.1 供试品与主要试剂

冠心宁注射液浓缩液,购自山东省药科学院中药室,规格0.34 g冻干粉/mL,批号1021404051;5%葡萄糖注射液,购自辰欣药业股份有限公司,批号1401210821。

生化分析仪所用试剂盒(上海执诚生物技术有限公司);血液分析仪所用试剂(日本Sysmex Corporation公司);生化分析仪、血液分析仪所用质控液(英国RANDOX实验室有限公司);电解质分析所用试剂、质控液(苏州日立仪器有限公司);凝血酶原时间、凝血酶时间试剂(上海太阳生物技术有限公司);凝血质控血浆(德国SIEMENS公司)。

1.2 实验动物

SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠,120只,雌雄各半,体质量195~217 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号SCXK(京)2012-0001,动物合格证号11400700017029。动物摄入辐照鼠饲料,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,编号:沪饲审(2008)04002,动物饮用自制灭菌水。

1.3 主要仪器

SYSMEX XT-2000iv型全自动血球计数仪(日本Sysmex Corporation);CA1500全自动血凝分析仪(日本SYSMEX公司);日立7180全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术);TDL-5台式低速大容量离心机(江苏金坛市医疗仪器厂);

NP-B型生物组织包埋机(湖北诺普医疗器械有限公司);TK-218摊烤片机(湖北泰维医疗器械有限公司);樱花VIP-6型生物组织脱水机(日本樱花公司);RM2235切片机、DMLS2显微镜(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 剂量设置及分组给药

冠心宁注射液临床使用方法为静脉滴注,最大日剂量为4.2 g/d(以冻干粉计),按照人60 kg体质量计算日剂量为0.07 g/kg(以冻干粉计)。按照重复给药毒性试验剂量设计原则^[6-8]并结合预实验,设定冠心宁注射液高、中、低剂量分别为3.40、1.70、0.85 g/kg(以冻干粉计,约相当于人临床最大日剂量49、24、12倍),同时设5%葡萄糖注射液为溶媒对照组。取检疫合格的适龄SD大鼠120只,分为以上4组,每组30只,雌雄各半。iv给药,给药体积10 mL/kg,每天给药1次,每周根据动物体质量调整给药量,连续给药13周,停药恢复4周。

2.2 指标检测

每周称1次体质量并计算体质量增长率和摄食量,每天观察动物药后外观体征变化。取胸骨制成骨髓涂片进行检测。

体质量增长率=(实时体质量-药前体质量)/药前体质量

各组动物于给药13周时,冠心宁注射液3.40 g/kg剂量组雌性取10只动物、雄性取8只动物,其余每组取雌雄各10只动物,停药恢复4周时取各组剩余动物,1%戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉取血进行血液学和血液生化学检测,剖检取脏器进行脏器相对质量(脏脑比)检测,并进行病理组织学检查。

血清生化检测采用全自动生化分析仪,检测指标有:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(Crea)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血糖(GLU)、总胆固醇(TC)、总胆红素(TBIL)、三酯甘油(TG)、肌酸激酶(CK)、钠离子(Na⁺)、钾离子(K⁺)、氯离子(Cl⁻)。

血液学检测采用全自动血球计数仪,检测指标有:白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均压积体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血

红蛋白浓度 (MCHC)、血小板 (PLT)、网织红细胞比率 (RET%)、中性细胞比率 (NEUT%)、淋巴细胞比率 (LYMPH%)、嗜酸性粒细胞比率 (EO%)、嗜碱性粒细胞比率 (BA%)、单核细胞比率 (MONO%)。

血凝指标采用全自动血凝分析仪,检测指标有:凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血酶时间 (APTT)。

2.3 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 一般体征观察

冠心宁注射液 3.40、1.70 g/kg 组动物药后即出现呼吸急促、步态不稳、俯卧不动、眼球突出等征状,药后 1~2 min 逐渐缓解,约 5 min 后基本恢复正常,随给药时间的延长,所出现征状逐渐减轻,持续时间缩短。冠心宁注射液 0.85 g/kg 组动物与溶媒对照组给药期间所有动物均未出现明显的异常反应。

3.2 死亡率

冠心宁注射液 3.40 g/kg 组雄性动物给药第 4 周时 2 只动物死亡,死亡率约为 6.7%;其余各组给药期间均未见动物死亡,死亡率为 0%。上述 2 只动

物均在药后 2~5 min 内死亡,动物外观口鼻有分泌物,四肢紫绀,剖检:可见肝脏肿大,余未见明显异常。

3.3 体质量及摄食量

3.40、1.70 g/kg 剂量冠心宁注射液可延缓大鼠体质量的生长,其中对雄性大鼠体质量增长的抑制作用更为明显 ($P < 0.05$ 、 0.01),停药后各剂量对大鼠体质量增长的影响逐渐恢复 (表 1、2)。冠心宁注射液各剂量组大鼠摄食量与同期溶媒对照组比较均未见明显异常。

3.4 血液学、血液生化学

试验期间,冠心宁注射液各剂量组血液学指标未见药物相关性异常。

冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下连续给药 13 周,可导致雌性大鼠血清中 TG 水平显著降低 ($P < 0.05$)、雄性大鼠血清中 BUN 水平显著升高 ($P < 0.05$),停药 4 周后可恢复,结果见表 3。

3.5 脏器相对质量

给药 13 周后,冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下雌雄大鼠肾脏脏脑比明显增加 ($P < 0.05$),停药 4 周后未见差异。其他各组动物各脏器相对质量未见明显异常。停药恢复 4 周后,冠心宁注射液各剂量组动物各脏器与同期溶媒对照组比较均未见明显异常。见表 4。

表 1 冠心宁注射液重复给药 13 周对雌性大鼠体质量增长率的影响

Table 1 Effect of Guanxinling Injection on body weight change rate of female rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量增长率/%								
		1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周
溶媒对照	—	14.3±3.5	30.9±4.9	40.3±4.8	48.4±6.3	53.3±8.6	60.4±7.7	63.9±7.3	68.8±8.3	70.7±7.9
冠心宁注射液	0.85	15.3±4.7	29.3±7.3	39.3±7.8	46.7±8.3	52.1±11.0	57.5±12.3	60.6±14.4	65.3±12.6	67.8±12.6
	1.70	15.6±4.4	28.6±6.7	38.3±9.0	48.0±11.7	54.2±13.2	60.5±14.7	67.0±16.3	70.5±16.9	72.2±18.4
	3.40	14.8±4.6	28.5±8.5	38.0±8.5	43.9±8.8	51.6±10.1	58.3±10.6	63.5±9.6	65.4±10.5	69.4±12.7
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量增长率/%								
		10 周	11 周	12 周	13 周	14 周	15 周	16 周	17 周	
溶媒对照	—	74.3±6.8	76.2±7.1	77.3±6.8	81.3±8.5	83.1±5.8	83.6±8.2	87.3±11.0	86.9±10.5	
冠心宁注射液	0.85	71.9±13.3	75.5±14.5	77.2±13.7	81.2±13.4	76.2±11.0	78.0±12.8	82.8±11.6	83.5±11.7	
	1.70	76.3±19.9	79.1±18.8	81.5±20.2	86.4±19.4	80.4±16.8	82.9±16.4	88.5±16.3	88.8±19.7	
	3.40	73.0±11.4	76.0±14.5	76.9±14.0	81.7±14.8	73.2±9.9	75.2±10.4	76.7±13.4	80.0±14.9	

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs vehicle control group, same as below

表2 冠心宁注射液重复给药13周对雄性大鼠体质量增长率的影响
Table 2 Effect of Guanxinning Injection on body weight change rate of male rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量增长率/%								
		1周	2周	3周	4周	5周	6周	7周	8周	9周
溶媒对照	—	30.1±5.4	61.2±7.2	84.2±11.3	101.6±15.1	116.7±19.1	130.8±21.0	140.1±21.6	154.1±24.0	163.0±26.5
冠心宁注射液	0.85	31.5±3.0	61.8±6.0	82.8±8.1	100.1±9.0	114.6±12.4	127.4±12.8	138.2±14.7	151.6±16.3	161.8±17.4
	1.70	29.2±3.6	57.7±8.7	76.7±12.9	90.6±16.9*	101.3±18.7*	114.4±18.5*	122.3±24.3*	131.3±25.8**	140.4±26.9*
	3.40	29.1±3.7	55.2±6.7*	74.7±9.8*	89.5±12.5*	101.8±15.7*	112.5±16.8**	122.8±18.1*	129.8±19.6**	136.9±22.3**

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量增长率/%								
		10周	11周	12周	13周	14周	15周	16周	17周	
溶媒对照	—	172.0±27.4	176.3±28.0	183.3±29.6	189.0±30.1	196.9±22.8	204.8±22.5	209.9±22.6	213.7±23.9	
冠心宁注射液	0.85	172.7±18.6	179.5±21.5	185.4±19.3	192.2±20.7	206.2±11.4	214.4±12.3	222.4±12.5	228.5±10.6	
	1.70	149.1±28.6*	155.4±30.3*	161.0±31.6*	168.2±32.1	179.1±33.3	188.4±34.1	194.6±35.1	200.2±34.5	
	3.40	143.8±21.0**	150.9±22.0**	157.0±23.0**	164.4±23.5*	170.6±21.9	178.5±21.9	187.4±25.1	193.1±25.6	

表3 冠心宁注射液重复给药13周对大鼠血液生化参数的影响
Table 3 Effect of Guanxinning Injection on biochemical parameters of rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	雌性大鼠血清 TG 水平/(mmol·L ⁻¹)		雄性大鼠血清 BUN 水平/(mmol·L ⁻¹)	
		给药结束	恢复期结束	给药结束	恢复期结束
溶媒对照	—	0.36±0.09	0.37±0.11	5.93±0.85	7.10±0.88
冠心宁注射液	0.85	0.36±0.13	0.38±0.09	6.02±1.40	7.10±1.64
	1.70	0.37±0.13	0.39±0.14	6.91±1.22	7.02±0.81
	3.40	0.28±0.07*	0.37±0.12	8.27±1.28*	7.04±1.27

表4 冠心宁注射液重复对大鼠脏器相对质量(脏脑比)的影响
Table 4 Effect of Guanxinning Injection on main organ indexes of rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	雌性大鼠肾脏脏脑比/(g·g ⁻¹)		雄性大鼠肾脏脏脑比/(g·g ⁻¹)	
		给药结束	恢复期结束	给药结束	恢复期结束
溶媒对照	—	93.86±8.38	97.72±10.91	160.81±11.38	167.82±24.79
冠心宁注射液	0.85	97.42±7.37	104.21±14.49	171.52±17.44	169.98±9.85
	1.70	97.77±11.25	102.09±13.42	168.04±19.85	170.54±30.52
	3.40	111.09±15.24*	106.90±16.92	178.08±21.71*	174.12±23.60

3.6 组织病理学检查

冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下 2 只雄性死亡动物镜检可见: 肾小管上皮变性坏死, 间质炎性细胞浸润; 肝脏中央静脉周围肝细胞变性, 肝细胞体积

增大, 胞浆内充满细小空泡(图1)。

冠心宁注射液 3.40、1.70、0.85 g/kg 剂量下给药13周及停药恢复4周后正常剖检动物均未见药物相关性异常。

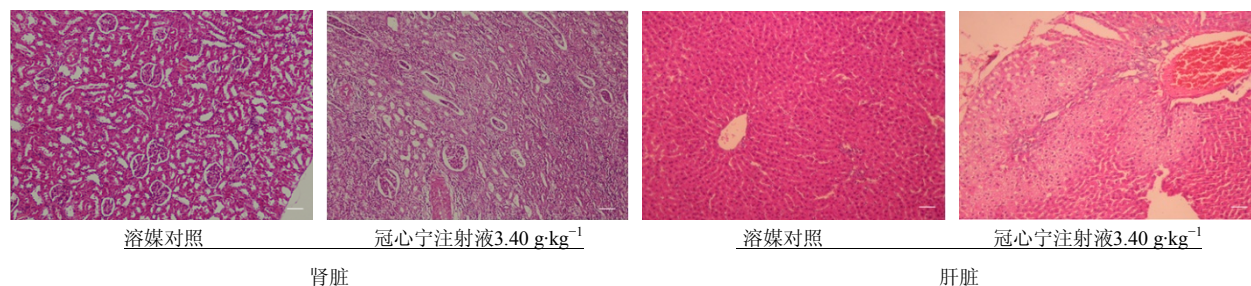


图1 给药4周时冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下雄性死亡动物典型病理切片

Fig. 1 Typical pathological sections of male dead rats at dose of 3.40 g/kg of Guanyinning Injection

4 讨论

重复性给药毒性试验是中药注射剂安全性再评价的重要项目之一, 可为临床安全使用剂量及药物不良反应监测提供参考依据。本试验研究表明, SD大鼠重复静脉注射 13 周冠心宁注射液 3.40、1.70 g/kg 后, 可出现明显的毒性反应, 动物主要表现为呼吸急促、步态不稳、俯卧不动、眼球突出等症状, 随给药周期的延长, 动物出现症状的程度有所减轻, 以上结果说明冠心宁注射液 3.40、1.70 g/kg 剂量下可对大鼠体征产生一过性影响, 并随用药时间的延长产生一定的耐受性, 提示临床试验中应密切关注给予供试品后导致的体征异常。

冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下 2 只死亡雄性动物可见口鼻分泌物、四肢紫绀, 提示临床试验中需密切关注敏感人群的特异质反应。

血液生化指标检测结果显示, 给药 13 周时, 冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下大鼠血液中 BUN 水平升高, 停药 4 周后, 恢复正常, 提示冠心宁注射液长期给药可导致肾脏功能的可逆性升高; 同时脏器相对质量结果显示, 给药 13 周时, 冠心宁注射液 3.40 g/kg 剂量下肾脏脏脑比明显增大; 异常死亡动物镜检结果提示肾小管上皮变性坏死, 间质炎性细胞浸润, 而正常剖检动物镜检中并未见此异常, 说

明供试品可影响肾脏的功能, 增大肾脏的相对质量, 所致影响停药后皆可恢复, 但在动物体内存在敏感性差异。

全部异常死亡动物中均发现肝脏的相关异常, 但正常剖检动物肝脏临检指标及病理检查均未见异常, 同样提示动物体内可能存在敏感性差异。本研究提示, 冠心宁注射液重复 iv 给药的无毒反应剂量为 0.85 g/kg, 是临床等效剂量的 12 倍, 重复大剂量 iv 给药主要的中毒靶器官为肾脏, 提示临床应用中应密切监测肾脏及肝脏的相关功能指标。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局标准 [S]. 2012.
- [2] 国家食品药品监督管理局标准 [S]. 1998.
- [3] 阮 鸣, 孔令义, 罗建光. 冠心宁注射液的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(13): 1838-1844.
- [4] 李响明, 冯玉康, 赵玉欣, 等. 不同厂家冠心宁注射液质量研究 [J]. 现代中医药, 2016, 36(2): 71-74.
- [5] 郭旭辉, 张 娜, 李林森. 中药注射剂不良反应原因分析及对策 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 216-219.
- [6] 药物重复给药毒性试验技术指导原则 [S]. 2014.
- [7] 袁伯俊, 廖明阳, 李 波. 药物毒理学实验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 212-217.
- [8] 周宗灿. 毒理学教程 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 156-157.