

幼龄大鼠重复 ig 肠炎宁颗粒 1 个月毒性试验

刘妍^{1,2}, 温和^{1,2}, 唐桂毅^{1,2}, 任萌^{1,2}, 张海娇^{1,2}, 张建军^{1,2}, 刘全国³, 张宗鹏^{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. 海南葫芦娃药业集团股份有限公司, 海南 海口 570100

摘要: **目的** 观察肠炎宁颗粒对幼龄大鼠可能引起的毒性反应和毒性靶器官, 为临床应用提供参考。**方法** 雌性大鼠与雄鼠交配、受孕并生存。从出生 12 d 的仔鼠中, 筛选出 128 只 (16 窝, 8 只/窝) 随机分入 4 组, 每组每性别 16 只。仔鼠出生第 13 天, 分别 ig 给予低、中、高剂量 (2、4、8 g/kg) 的肠炎宁颗粒, 对照组给予去离子水, 给药体积为 10 mL/kg, 连续给药 31 d, 分别于给药 31 d 和停药 28 d 次日剖杀。检测指标包括: 一般症状、体质量、摄食量、睁眼、腹部出毛、空中翻正、自主活动、尿液、股骨长度、血液学、血清生化学、T 淋巴细胞亚群、肉眼大体和镜下组织病理学检查。**结果** 与对照组比较, 给药 0~3 d, 肠炎宁颗粒低、中、高剂量组雄鼠和低、高剂量组雌鼠的体质量增长、及高剂量组雌雄大鼠给药第 3 天体质量均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给药 31 d, 中、高剂量组雄鼠平均股骨长度偏短 ($P < 0.01$), 高剂量组雌鼠红细胞 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞容积 (HCT) 轻度降低 ($P < 0.05$), 给药组脾脏髓外造血增多; 停药 28 d 后均恢复。未见与药物有关的其他不良反应。**结论** 本实验条件下, 肠炎宁颗粒大剂量长期给药可引起幼龄大鼠出现一些异常反应, 但程度轻微, 且可恢复。

关键词: 肠炎宁颗粒; 幼龄大鼠; 毒性;

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 08- 1456 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.017

Repeated dose one-month oral toxicity study of Changyanning granule in juvenile rats

LIU Yan^{1,2}, WEN He^{1,2}, TANG Guiyi^{1,2}, REN Meng^{1,2}, ZHANG Haijiao^{1,2}, ZHANG Jianjun^{1,2}, LIU Quanguo³, ZHANG Zongpeng^{1,2}, SHEN Xiuping^{1,2}

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

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

3. Hainan Huluwa Pharmaceutical Group Co. Ltd, Haikou 570100, China

Abstract: Objective To identify the major toxic effects and target organs of Changyanning granule in juvenile rats, and provide a reference for human clinical use. **Methods** The female rats were naturally bred by breeder male rats, and allowed to deliver their litters. At PND12, 128 pups from 16 litters (litters of eight pups each) were selected and randomly assigned to four groups (16 juvenile rats per sex per group). At PND13, the juvenile rats were gavaged with low, medium and high dose (2, 4 or 8 g/kg) of Changyanning granule or deionized water. The dose volume is 10 mL/kg. All animals were necropsied on the next day after a 31-day dose and a 28-day recovery respectively. Parameters evaluated included clinical observations, body weights, food consumption, eye opening, coat growth, air righting, locomotor activity, urinalysis, femur length, hematology, clinical chemistry, T lymphocyte subsets, gross pathology and microscopic pathology. **Results** compared with control group, the body weight gain of male rats in low, middle and high dose group and female rats in low, high dose group for 0 - 3 d, and the body weight of male and female rats in high dose group on the third day decreased significantly ($P < 0.05$ and 0.01). After a 31-day of treatment, a decrease in mean femur length were

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (16PTGCCX00090)

第一作者: 刘妍, 女, 副研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: liuy8@tjipr.com

*通信作者: 申秀萍, 女, 研究员, 主要从事新药临床前安全性评价研究。E-mail: shenxp@tjipr.com

noted in males of 4 and 8 g/kg groups ($P < 0.01$). RBC, HGB and HCT showed decreases in females of the 8 g/kg group ($P < 0.05$). Morphologic examination of the spleens revealed extramedullary hematopoietic proliferation in all treated groups. After a 28-day recovery period, these changes were reversed. **Conclusion** Under the experimental condition, a mild adverse reactions were induced by Changyanning granule large dose long term administration in juvenile rats, but were reversible.

Key words: Changyanning granule; Juvenile rat; toxicology

肠炎宁颗粒, 由地锦草、黄毛耳草、樟树根、香薷和枫树叶组成, 是治疗急、慢性胃肠炎, 腹泻细菌性痢疾, 小儿消化不良的中药复方制剂, 具有清热利湿、行气的作用^[1], 临床可单独或联合用药, 治疗效果较好。

肠炎宁颗粒虽有较长的临床应用史, 但其不良反应尚不明确。由于该药可用于婴幼儿和儿童, 而婴幼儿和儿童处于特殊的生长发育阶段, 其组织、器官和药物代谢过程均与成人不同^[2]。为了能够更好地了解肠炎宁颗粒对小儿生长发育的影响, 本研究采用与临床用药人群起始年龄相匹配的幼龄大鼠为研究对象, 进行为期 1 个月的重复给药毒性试验, 该给药期限所涵盖的大鼠发育周期能够完全覆盖临床用药人群 (1~5 岁儿童) 的发育周期^[3], 且远超过临床用药期限 (小儿临床用药不超过 3 d)。通过评价肠炎宁颗粒对幼龄动物在生长发育、神经发育和免疫系统发育等方面的影响, 为临床安全用药提供参考。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

肠炎宁颗粒, 海南葫芦娃制药有限公司提供, 批号 151103, 临床拟用量为 1~2 岁儿童 3 g/d; 3~5 岁儿童 5.3 g/d。

尿液检测专用试纸条 (桂林优利特医疗电子有限公司); 血液学检测相关试剂 (SIEMENS 公司); 血清生化学检测相关试剂 (中生北控生物科技股份有限公司); 电解质检测相关试剂 (日本常光株式会社); 凝血因子检测相关试剂 (美国实验室仪器公司); 免疫细胞检测相关试剂 (BD Biosciences 公司)。

1.2 实验动物及管理

出生后 13 d (Postnatal day 13, PND13) 幼龄大鼠 128 只 (雌雄各半), 均为通过购入成年雌雄大鼠交配繁殖后所得。所购入的用于繁育的雌雄大鼠为 SPF 级 CD (SD) 大鼠, 9 周龄, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

动物饲养于天津药物研究院新药评价有限公司动物实验楼 (屏障环境), 温度范围 20~26 °C, 湿度范围 40%~70%, 换气次数为 ≥ 15 次全新风/h, 12 h/12 h 明暗交替光照。

动物自由摄食和水 (禁食除外), 饲料为经 ^{60}Co 辐照的 SPF 大小鼠生长繁殖饲料, 由北京科澳协力饲料有限公司提供, 批号 16093113、16103123、16123123、17013133、17033123; 饮用由 1T/h 型多重微孔滤膜过滤系统制备的无菌水 (四级过滤紫外灭菌)。

1.3 主要仪器

ML203/02 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司); E3000-0.5 电子天平 (常熟市双杰测试仪器厂); ZH-YLS-1C 自主活动仪 (安徽正华生物仪器设备有限公司); URITEST-300 尿液分析仪 (桂林优利特电子集团有限公司); ADVIA2120 血液分析仪 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc); EX-180 全自动电解质分析仪 (日本常光株式会社); ACL9000 凝血分析仪 (Instrumentation Laboratory Co.); 7080 型全自动生化分析仪 (日立高新技术株式会社); FACS Aria II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); BX51 普通光学显微镜 (日本奥林巴斯光学株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组和标识

购入 9 周龄雌雄大鼠适应 1 周后合笼交配, 受孕雌鼠饲养至产仔。仔鼠出生后第 4 天, 将每窝仔鼠数量调整为 10 只, 并尽量保证雌雄各半。仔鼠于出生后第 12 天称体质量, 根据体质量和一般状态筛选出合格的雌雄各 72 只仔鼠进行分窝, 具体方法为: 将合格仔鼠从原窝中取出, 分入其他非亲生母鼠窝内, 且同一窝的仔鼠分入不同的非亲生母鼠窝内, 使新窝的母鼠和仔鼠及各仔鼠间均无亲缘关系, 最终所有仔鼠被重新分配为 18 窝, 每窝雌雄各 4 只。分窝完成后, 随机淘汰 2 窝, 并对剩余的 16 窝以窝为单位进行完全随机分组, 分为对照组和肠炎宁颗粒低、中、高 3 个给药组, 每组 4 窝共 32

只仔鼠(4雌4雄/窝)。

PND12 仔鼠称体质量后,先使用油性记号笔在背部进行临时标记;分组完成后,使用有色染液将同组同性别仔鼠进行1~16号标记,为了便于识别,同一窝内仔鼠的标记号均不相同。

2.2 给药

本研究采用肠炎宁颗粒临床制剂溶于去离子水后给药,高剂量设置为最大可给药剂量,低、中、高剂量分别为2、4和8 g/kg(按体质量折算,相当于儿童临床拟用剂量的6.5、12.9和25.8倍),对照组给予去离子水,给药体积为10 mL/kg。连续给药31 d次日每组剖杀10只幼龄大鼠,停药恢复28 d次日剖杀6只幼龄大鼠。

2.3 检测指标

每天进行一般症状观察,每周称量体质量和摄食量(离乳后进行),PND13和15进行睁眼检查,PND14进行腹部出毛检查,PND14和19进行空中翻正检查,PND37和65进行自主活动评价。给药期和停药恢复期进行尿液检测(包括:尿液外观、比重、pH值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞、抗坏血酸和亚硝酸盐)。给药期结束和恢复期结束进行股骨长度测量;血液学和凝血检测[包括白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞容积(HCT)、平均红细胞容积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)、网织红细胞数(Ret)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)];血清生化学和电解

质检测[包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、葡萄糖(GLU)、总胆固醇(TCHO)、总胆红素(TBIL)、三酰甘油(TG)、肌酸磷酸激酶(CK)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、乳酸脱氢酶(LDH)、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^-];血清T淋巴细胞亚群检测(包括 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$);肉眼大体和镜下组织病理学检查。

2.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料如方差齐,采用One-way ANOVA进行多组之间比较,如比较有差异,采用Dunnett-t检验进行给药组与对照组间的比较;如方差不齐,采用Kruskal-Wallis检验进行多组之间比较,如比较有差异,采用Mann-Whitney检验进行给药组与对照组间的比较。计数资料和等级资料采用 χ^2 检验或Kruskal-Wallis检验(两组以上比较)、Mann-Whitney检验(两组间比较)进行统计分析。

3 结果

3.1 一般观察

各给药组和对照组大鼠试验期内均未见明显异常表现,大鼠皮毛顺滑,行动自如,眼、口、鼻无异常分泌物,尿便正常。

3.2 体质量

如表1、2所示,给药0~3 d,肠炎宁颗粒低、中、高剂量组雄鼠和低、高剂量组雌鼠的体质量增长、及高剂量组雌雄大鼠给药第3天体质量均明显低于对照组($P<0.05$ 、 0.01),此后体质量和体质

表1 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=16$)

Table 1 Effects of Changyanning granule on body weights in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=16$)

性别	组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g									
			给药 0 d	给药 3 d	给药 7 d	给药 10 d	给药 14 d	给药 17 d	给药 21 d	给药 24 d	给药 28 d	给药 31 d
雄	对照	—	28.8±2.0	37.5±2.3	49.1±3.7	63.4±5.0	90.3±5.3	113.7±6.6	151.1±10.2	179.6±12.2	219.6±15.7	246.9±17.3
	肠炎宁	2	28.9±1.8	36.4±2.1	46.2±3.1	60.3±4.3	86.8±5.9	110.0±8.1	145.5±11.1	175.4±13.3	216.7±16.9	245.8±19.3
	颗粒	4	28.0±2.0	35.8±2.8	48.0±4.2	61.4±5.4	86.6±8.0	106.6±9.5	139.1±13.9	168.0±15.9	201.9±17.0 [*]	230.1±17.2
		8	28.5±2.5	33.6±4.6 ^{**}	44.9±6.6	58.8±8.1	83.9±10.2	106.8±13.2	141.6±16.1	172.1±19.3	210.4±23.3	239.1±25.8
雌	对照	—	27.0±1.6	36.0±2.0	46.7±2.9	58.6±4.3	82.2±5.1	97.1±8.1	128.1±9.6	146.0±9.6	166.1±8.6	176.9±10.9
	肠炎宁	2	27.1±2.0	34.5±2.4	44.7±3.0	57.4±4.4	80.5±6.2	97.9±7.0	126.1±8.1	146.1±8.8	168.9±10.5	183.0±12.5
	颗粒	4	28.4±1.9	36.7±2.5	48.2±3.0	61.9±4.4	83.9±5.1	102.3±6.1	130.1±8.6	151.3±10.1	173.2±11.7	188.0±13.3
		8	26.7±2.4	32.4±2.8 ^{**}	43.1±4.2 ^{**}	55.1±4.5	76.3±5.1 ^{**}	94.2±6.4	121.4±8.4	140.5±10.5	165.1±10.3	181.5±11.6

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

表2 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠体质量增长的影响($\bar{x} \pm s, n=16$)Table 2 Effects of Changyanning granule on body weight gains in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=16$)

性别	组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量增长/g								
			给药 0~ 3 d	给药 3~ 7 d	给药 7~ 10 d	给药 10~ 14 d	给药 14~ 17 d	给药 17~ 21 d	给药 21~ 24 d	给药 24~ 28 d	给药 28~ 31 d
雄	对照	—	8.7±1.3	11.6±2.0	14.3±2.2	26.8±2.6	23.4±2.2	37.4±4.3	28.5±3.6	40.0±5.4	27.3±3.1
	肠炎宁 颗粒	2	7.5±1.4 [*]	9.8±2.1	14.1±2.7	26.5±2.9	23.2±2.9	35.5±5.4	29.9±3.6	41.3±5.6	29.1±4.9
		4	7.8±1.5 [*]	12.2±2.2	13.5±1.9	25.1±3.7	20.1±2.4 ^{**}	32.5±6.8	28.9±3.8	33.9±5.9 [*]	28.2±5.8
		8	5.1±3.2 ^{**}	11.3±2.5	13.8±2.1	25.1±3.6	22.9±3.2	34.8±4.9	30.5±4.5	38.4±6.3	28.7±5.7
雌	对照	—	9.0±1.2	10.7±1.5	12.0±2.3	23.6±2.1	14.9±5.7	30.9±6.0	17.9±2.6	20.1±3.2	10.8±4.4
	肠炎宁 颗粒	2	7.4±1.1 ^{**}	10.2±1.1	12.7±2.5	23.1±2.9	17.4±1.7	28.2±2.2	20.1±3.6	22.8±5.8	14.1±4.1
		4	8.2±1.0	11.6±2.2	13.6±1.9	22.0±2.3	18.4±2.4	27.8±3.2	21.3±2.7	21.9±3.4	14.8±4.3 [*]
		8	5.7±2.0 ^{**}	10.7±2.3	12.0±1.1	21.2±1.9 [*]	17.9±2.9	27.3±3.7	19.1±5.0	24.6±3.7 ^{**}	16.4±2.9 ^{**}

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

量增长未见与药物有关的下降。

3.3 摄食量

各给药组大鼠摄食量与对照组比较无明显差异。

3.4 生理发育和神经功能发育指标

各给药组大鼠睁眼达标率、腹部出毛达标率、空中翻正达标率和自主活动次数与对照组比较均无明显差异。具体结果见表3、4。

表3 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠生理发育和神经功能发育指标的影响($\bar{x} \pm s, n=16$)Table 3 Effects of Changyanning granule on physical and neurofunction development in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=16$)

性别	组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	PND14 腹部出毛 达标率/%	睁眼达标率/%		空中翻正达标率/%	
				PND13	PND15	PND14	PND19
雄	对照	—	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0
	肠炎宁颗粒	2	100.0	12.5	93.8	100.0	100.0
		4	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0
		8	100.0	6.3	93.8	100.0	100.0
雌	对照	—	100.0	12.5	100.0	100.0	100.0
	肠炎宁颗粒	2	100.0	12.5	100.0	100.0	100.0
		4	100.0	12.5	100.0	100.0	100.0
		8	100.0	12.5	93.8	100.0	100.0

表4 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠自主活动的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Effects of Changyanning granule on locomotor activity in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	雄性/次		雌性/次	
		PND37	PND65	PND37	PND65
对照	—	73.5±37.5	114.0±14.3	92.8±16.3	114.7±8.8
肠炎宁颗粒	2	80.0±21.6	118.8±6.9	102.5±12.8	115.8±3.9
	4	106.5±12.3	120.5±6.2	103.3±7.1	118.0±7.3
	8	75.5±36.5	118.7±9.7	102.3±16.3	119.3±8.5

3.5 尿液指标

各给药组和对照组大鼠尿液呈无色或微黄色,外观澄明。中、高剂量组雄鼠给药期酮体偏高,但无其他相关指标的改变,因此分析认为单一尿酮体的升高无明显的生物学意义。给药期和停药恢复期各给药组大鼠尿液指标与对照组比较均无明显差异。

3.6 股骨长度

给药31 d,中、高剂量组雄鼠平均股骨长度较对照组分别短0.6和1.2 mm,差异显著($P<0.01$),

停药恢复28 d后与对照组无明显差别。见表5。

3.7 血液学和凝血因子指标

给药31 d,中和/或高剂量组RBC、HGB和HCT明显低于对照组($P<0.05$)。其中,中剂量组HGB和HCT降低幅度分别为4.3%和4.2%,高剂量组RBC、HGB和HCT降低幅度分别为6.0%、4.6%和4.2%。其他指标给药组与对照组比较未见明显异常。停药恢复28 d上述指标正常。给药期结束血液学和凝血因子指标的具体结果见表6。

表5 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠平均股骨长度的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effects of Changyanning granule on mean femur length in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给药期平均股骨长度/mm			恢复期给药期平均股骨长度/mm		
		n/只	雄性	雌性	n/只	雄性	雌性
对照	—	10	25.867±0.423	24.667±0.250	6	35.839±1.620	34.032±0.803
肠炎宁颗粒	2	10	25.450±0.725	24.822±0.610	6	36.955±1.040	33.397±0.982
	4	10	25.238±0.508**	24.780±0.495	6	35.272±1.738	33.369±0.728
	8	10	24.713±0.195**	24.156±0.728	6	35.399±0.726	33.247±1.187

与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group表6 给药期结束肠炎宁颗粒对幼龄大鼠血液学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 6 Effects of Changyanning granule on hematology in juvenile rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

性别	组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	WEC/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	RBC/(10 ¹² ·L ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/(g·L ⁻¹)	Ret/(10 ¹² ·L ⁻¹)	PLT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)
雄	对照	—	9.98±1.42	7.38±0.37	151.60±6.65	47.83±2.13	64.78±1.32	20.54±0.38	316.80±2.86	0.72±0.06	1 522.90±118.21
	肠炎宁	2	12.10±2.28	7.14±0.24	147.80±5.88	46.80±2.03	65.56±3.06	20.71±0.88	315.80±4.59	0.75±0.08	1 658.70±148.93
	颗粒	4	10.29±1.54	7.29±0.39	148.40±7.59	47.20±2.26	64.77±2.30	20.39±0.88	314.70±4.00	0.71±0.17	1 642.70±220.78
		8	11.70±2.41	7.23±0.35	146.00±9.27	46.49±2.33	64.37±3.56	20.21±1.40	313.70±7.04	0.76±0.04	1 689.90±125.12
雌	对照	—	7.87±1.86	7.86±0.44	154.60±7.03	47.68±2.12	60.67±1.75	19.69±0.69	324.40±5.15	0.47±0.06	1 764.20±244.22
	肠炎宁	2	9.15±2.14	7.59±0.43	151.40±5.34	46.58±1.51	61.50±1.85	19.97±0.54	324.60±4.22	0.53±0.09	1 685.10±149.71
	颗粒	4	8.74±2.37	7.49±0.33	147.90±2.69*	45.67±1.04*	61.00±1.67	19.77±0.63	323.90±3.48	0.48±0.06	1 732.60±183.79
		8	8.50±3.76	7.39±0.28*	147.50±6.42*	45.69±1.58*	61.87±1.98	19.96±0.67	322.40±4.45	0.53±0.08	1 733.00±243.02

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

3.8 血清生化和电解质指标

给药 31 d 和停药恢复 28 d, 给药组未见与受试药物有关的血清生化和电解质指标的改变。

3.9 T 淋巴细胞亚群

给药 31 d 和停药恢复 28 d, 各剂量受试药物对大鼠 T 淋巴细胞亚群无明显影响。结果见表 7。

表7 肠炎宁颗粒对幼龄大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 7 Effects of Changyanning granule on T lymphocyte subsets in juvenile rats ($\bar{x} \pm s$)

检测指标	组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	给药期/%		恢复期/%	
			雄性	雌性	雄性	雌性
CD3 ⁺	对照	—	38.35±4.90	43.69±6.77	38.38±4.11	39.75±8.68
	肠炎宁	2	38.72±4.18	42.92±8.13	35.48±3.11	42.58±11.02
	颗粒	4	43.61±7.19	45.44±3.71	36.57±5.96	40.57±2.03
		8	41.68±5.02	46.30±7.49	37.92±6.14	37.20±6.05
CD4 ⁺	对照	—	26.00±2.95	29.25±4.43	23.67±2.97	27.42±5.97
	肠炎宁	2	25.48±2.79	29.62±4.99	22.62±2.57	29.42±7.80
	颗粒	4	29.39±5.32	32.03±2.82	22.25±4.06	26.98±2.33
		8	27.23±4.09	32.29±5.36	24.15±4.32	25.02±3.47
CD8 ⁺	对照	—	11.17±1.97	13.16±2.40	13.87±1.91	11.33±3.73
	肠炎宁	2	11.93±1.97	11.94±3.19	12.03±2.56	12.37±3.28
	颗粒	4	13.04±2.37	12.15±1.90	13.47±3.60	12.68±2.24
		8	13.10±1.67	12.66±2.70	12.92±3.19	11.42±2.78
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	对照	—	2.36±0.28	2.25±0.26	1.73±0.29	2.55±0.60
	肠炎宁	2	2.19±0.41	2.56±0.43	1.96±0.49	2.39±0.36
	颗粒	4	2.29±0.38	2.69±0.43	1.79±0.63	2.21±0.59
		8	2.10±0.36	2.61±0.48	1.94±0.44	2.29±0.50

3.10 脏器质量和脏体系数

给药 31 d, 未见与受试药物有关的脏器重量和系数的改变。

3.11 大体解剖检查

给药 31 d 和停药恢复 28 d 存活剖检的各只动物毛顺, 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异常病理改变。

3.12 组织病理学检查

给药 31 d, 对照组全部雄鼠脾脏可见轻微至中度髓外造血增多, 给药组全部雄鼠轻微至重度髓外造血增多; 对照组少量雌鼠脾脏轻微髓外造血增多, 给药组大部分雌鼠轻微至中度髓外造血增多。

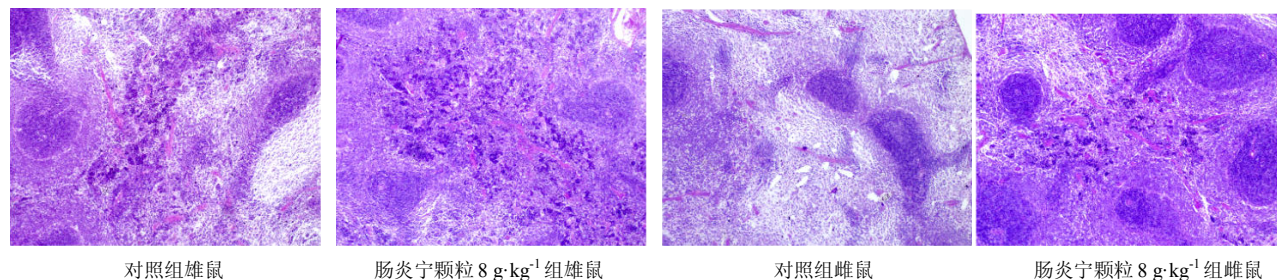


图 1 给药期结束脾脏镜下组织病理学改变 (×100)

Fig. 1 Histopathological changes of spleen for rats treated for 31 days (×100)

4 讨论

儿童和成人在脏器结构和生理功能成熟程度上有很大的差别, 药物的药动学特征存在明显的不同, 儿科的用药不应是在成人用量基础上简单的酌减外推^[1]。目前, 许多临床已使用多年的中药, 由于毒理学数据并不充分, 可能仅有成人的临床安全性数据, 当直接进行年龄较小的儿科人群的临床研究时, 会存在很大风险, 此时, 幼龄动物试验便成为主要支撑临床研究的依据。

肠炎宁颗粒为已上市中成药, 为了预测该药对幼龄儿童的影响, 进行了为期 1 个月的幼龄大鼠重复给药毒性试验研究。研究结果表明, 2、4、8 g/kg 剂量组雌雄幼龄大鼠给药前 3 d 的体质量增长明显减慢, 8 g/kg 剂量组体质量增长受影响更加明显, 导致第 3 天体质量也明显偏低, 但此后体质量和体质量增长未见与药物有关的减少。分析原因可能是初期给药时幼龄大鼠对受试药物的味道或给药方式的刺激等产生不适, 造成摄乳量减少影响体质量增长, 随着给药时间的延长, 动物逐渐适应, 进食正常, 体质量和体质量增长恢复正常, 通过对离乳后的摄食量测定, 进一步证实给药组大鼠摄食量与对照组无差别。

给药 1 个月, 4 和 8 g/kg 剂量组雄鼠股骨长度略短于对照组, 停药恢复 28 d 后, 股骨长度与对照组持平。除此之外, 幼龄大鼠睁眼时间、腹部出毛时间、空中翻正检查和自主活动测定均正常。

给药 1 个月, 8 g/kg 剂量组雌鼠 RBC 数量和 HGB 含量略低于对照组, 雄鼠降低不明显, 组织病理学检查结果显示, 给药组和对照组均有不同程度的脾脏髓外造血, 但在程度上给药组强于对照组, 且雄鼠髓外造血程度较雌鼠旺盛。正常情况下, 幼龄动物有髓外造血情况, 但本研究给药组强于对照组, 表明动物可能存在贫血, 从而代偿性的刺激脾脏髓外造血增强。而贫血的发生不排除是由于动物在较小日龄开始长期给药, 影响营养吸收所造成。由于雄鼠髓外造血程度更旺盛, 因此血液红细胞系相关指标下降不明显。停止恢复 28 d 后, 血液学指标恢复正常, 脾脏髓外造血现象消失。

肠炎宁颗粒引起的大鼠股骨长度和红细胞系的改变均轻微, 且可恢复。综合分析认为这些改变可能与幼龄动物给药时间较长、影响营养吸收有关, 而非药物的直接毒性。由于临床上该药使用期限很短, 仅为 3 d, 因此出现上述情况的可能性较小, 但仍需临床医生对上述指标予以关注。

参考文献

- [1] 潘丽, 申琳. 肠炎宁颗粒治疗小儿消化不良的临床观察 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2147-2151.
- [2] 黄芳华, 王庆利, Jim Ridings, 等. 对儿科药物开发的非临床安全性评价的考虑 [J]. 中国新药杂志, 2016, 2(18): 2052-2058.
- [3] US FDA. Guidance for industry nonclinical safety evaluation of pediatric drug products. [EB/OL].

- (2014-12-11) [2018-01-28]. www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079247.pdf.
- [4] EMA. Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications [EB/OL]. (2008-08-01) [2018-01-28]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003305.pdf.
- [5] ICH.M3 (R2) Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals [EB/OL]. (2009-06-11) [2018-01-28]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2_Guideline.pdf.