

氢溴酸樟柳碱注射液大鼠单次和重复给药毒性试验研究

李 勇¹, 曾菊芳¹, 陈祥燕¹, 谢晓娟¹, 万 峰²

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所, 四川 成都 610212

2. 成都第一制药有限公司, 四川 成都 611930

摘要: 目的 通过SD大鼠的单次和重复静脉给药毒性试验, 评价氢溴酸樟柳碱注射液的安全性。方法 单次给药毒性试验采用最大耐受量法, 观察大鼠的死亡情况和毒性反应。重复给药毒性试验: 将大鼠随机分为溶媒对照组和氢溴酸樟柳碱10、50、200 mg/kg剂量组, 每组30只, 尾iv给药, 连续13周, 停药恢复4周。进行各项毒理学指标检测。结果 急性毒性试验: 氢溴酸樟柳碱注射液在364.5~504.5 mg/kg对大鼠产生明显毒性, 症状有给药时尖叫、俯卧、后肢无力、颤抖、抽搐、惊厥、瞳孔散大、尾部发绀等, 甚至造成个别动物死亡。重复给药毒性试验: 50、200 mg/kg剂量组出现体质量增长减缓, 摄食下降, 给药后尖叫, 鼻端、眼周异常分泌物增多, 皮肤脱毛、结痂, 耳廓溃疡、缺损, 瞳孔散大, 尾部发绀, 血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、Cl⁻浓度升高等症状, 200 mg/kg剂量组还出现给药后肌张力减退、颤抖、抽搐、呼吸困难、皮下炎性包块等表现。溶媒对照组和200 mg/kg剂量组动物注射部位均出现静脉炎及静脉周围炎, 严重程度无差异, 停药4周后病变减轻。结论 氢溴酸樟柳碱注射液SD大鼠静脉单次给药的最大耐受量(MTD)为428.8 mg/kg, 约相当于临床剂量的2 573倍; 重复给药毒性试验未见明显毒性反应剂量(NOEL)为10 mg/kg, 约相当于临床剂量的60倍。

关键词: 氢溴酸樟柳碱; 大鼠; 单次给药毒性试验; 重复给药毒性试验

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)08-1523-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.08.007

Single dose and repeat doses toxicity studies of Anisodine Hydrobromide Injection in rats

LI Yong¹, ZENG Jufang¹, CHENG Xiangyan¹, XIE Xiaojuan¹, WAN Feng²

1. Institute of Laboratory Animal of Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, China

2. Chengdu First Pharmaceutical Co. Ltd., Chengdu 611930, China

Abstract: Objective To evaluate the safety of anisodine hydrobromide injection for SD rats by single and repeat administration toxicity studies. **Methods** In single dose toxicity study, maximum tolerance dose (MTD) method was applied to observe the death and toxic reaction of rats. In repeat doses toxicity study, rats were randomly divided into vehicle control, anisodine hydrobromide injection 10, 50 and 200 mg/kg groups, and each group had 30 rats. All animals were intravenously given vehicle or anisodine hydrobromide injection for 13 weeks followed by 4-week recovery. Toxicology parameters were determined. **Results** In single dose toxicity study, anisodine hydrobromide injection induced obvious toxicity in rats at 364.5—504.5 mg/kg, such as screaming during administration, face lying, muscular hypotonus of hindlimb, tremor, spasm, convulsion, mydriasis, tail cyanosis, even some rats died. In repeat doses toxicity study, following adverse effects were observed in rats at 50 and 200 mg/kg groups: body weight increasing slowly, food consumption decreasing, screaming during administration, abnormal secretions increasing at the end of nose and around eyes, depilation and scab of skin, ulcer and defect of auricle, mydriasis, tail cyanosis, HGB, HCT and Cl⁻ increasing. At 200 mg/kg group, muscular hypotonus, tremor, spasm, dyspnea, subcutaneous inflammatory lumps were also observed. Phlebitis and periphlebitis were found at injection site in rats at both vehicle control and 200mg/kg groups, with no obvious difference between the two groups, and alleviated after 4-week recovery. **Conclusion** The maximum tolerance dose (MTD) of anisodine hydrobromide injection in SD rats by single dose intravenous injection was 428.8 mg/kg, about 2573 times of clinical dose. The no observed

收稿日期: 2019-03-04

基金项目: 四川省科技支撑项目(2016sz0027)

第一作者: 李 勇(1975—),男,副研究员,研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: tennisli@163.com

adverse effect level (NOAEL) in repeat doses toxicity study was 10 mg/kg, about 60 times of clinical dose.

Key words: anisodine hydrobromide; rats; single dose toxicity study; repeat doses toxicity study

氢溴酸樟柳碱是从植物唐古特山莨菪 *Scopolia tangutica* Maxim. 的根中提出的一种生物碱,为M胆碱受体阻断药,其化学结构与东莨菪碱相似^[1],具有较强的中枢和外周抗胆碱作用,如解痉、扩瞳、抑制腺体分泌、解除血管痉挛改善微循环、对抗有机磷中毒等,适用于血管性头痛、视网膜血管痉挛、缺血性视神经病变、急性瘫痪、帕金森病等,亦可用于有机磷酸酯类农药中毒的解毒。氢溴酸樟柳碱注射液用于治疗缺血性脑卒中患者能改善大脑侧支循环和能量代谢,促进神经功能的恢复,从而改善预后^[2],治疗急性脑梗死患者能明显改善神经功能缺损症状,且安全有效^[3]。其对抗急性脑缺血/再灌注损伤大鼠的作用机制与抗氧化损伤及提高p-Akt的表达有关^[4],并且能提高双侧颈总动脉结扎所致慢性脑缺血模型大鼠的抗氧化能力,减少神经细胞凋亡,其作用机制与减少p53蛋白的表达有关^[5]。文献报道氢溴酸樟柳碱毒性较其他托品类药物小,如阿托品、山莨菪碱等^[6]。目前关于氢溴酸樟柳碱的毒理学研究报道很少,因此本研究评价氢溴酸樟柳碱注射液对SD大鼠单次和重复静脉注射给药的安全性,以便为临床用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 药物

氢溴酸樟柳碱注射液,由成都第一制药有限公司提供,规格2 mL:100.9 mg,批号161101,为无色澄明液体,pH=4.0。给药前用0.9%氯化钠注射液在无菌条件下稀释至相应浓度,并经HPLC分析其浓度在理论浓度的90%~110%。

1.2 动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半。其中单次给药毒性试验40只,体质量:雌性(166.9±10.1)g,雄性(184.1±23.0)g,质量合格证编号:11400700244733;重复给药毒性试验120只,体质量:雌性(168.1±8.6)g,雄性(193.3±8.5)g,质量合格证编号:11400700249601,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2016-0011。动物饲养于屏障系统中[使用许可证号SYXK(川)2013-058],温度20~26℃,相对湿度40%~70%,昼夜明暗交替时间12 h/12 h。大小鼠全价颗粒维持饲料由四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所提供,生产许可证号

SCXK(川)2015-01,符合中华人民共和国国家标准GB14924.3-2010。饮用水为自来水经高温高压消毒,自由饮用。垫料为玉米芯,⁶⁰Co辐照消毒,由四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所提供。

1.3 试剂与仪器

血清生化检测试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子有限公司。血凝检测试剂盒均购自武汉中太生物技术有限公司。电解质检测试剂购自深圳凯特生物医疗电子科技有限公司。

1260高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),BC-6800全自动血液细胞分析仪、BS-420型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),CA-550全自动血凝分析仪(日本希森美康公司),XI-921D电解质分析仪(深圳凯特生物医疗电子科技有限公司),TSJ-QD型全自动封闭式组织脱水机、BMJ-B型包埋机(常州市中威电子仪器有限公司),MICRO HM340E切片机、GEMINI AS全自动染色机(美国赛默飞公司),TEC-2500型病理组织漂烘仪(常州郝思琳医用仪器有限公司),ECLIPSE Ni-U型显微镜(日本尼康公司)。

1.4 方法

1.4.1 单次给药毒性试验 采用最大耐受量法进行试验^[7]。选用SPF级的大鼠40只,雌雄各半,检疫7 d,按给药当天给药前体质量随机分为4组,即溶媒对照组(0.9%氯化钠注射液)和氢溴酸樟柳碱注射液低、中、高剂量组(364.5、428.8、504.5 mg/kg),每组雌雄各5只。缓慢尾静脉推注,时间30~60 s,单次给药,给药体积为10 mL/kg。

给药后4 h内详细观察,以后每天上下午各观察1次,连续观察14 d。观察动物外观、行为、饮食、对刺激的反应、分泌物、排泄物等,记录动物毒性反应情况,包括中毒症状、症状的起始时间、严重程度、持续时间以及死亡情况(死亡时间、濒死前反应等)。给药后第2、3、4、7、14天测定动物体质量。死亡动物及时进行大体解剖,存活动物于第15天安乐死后进行大体解剖,若发现异常则进行组织病理学检查。

1.4.2 重复给药毒性试验^[8] 选用120只SPF级SD大鼠,雌雄各半,检疫7 d,按检疫期最后1 d体质量随机分为4组,即溶媒对照组(0.9%氯化钠注射液),氢溴酸樟柳碱注射液低、中、高剂量组(10、50、

200 mg/kg), 每组雌雄各 15 只。缓慢尾静脉推注, 时间 30~60 s, 给药体积为 5 mL/kg, 每周给药 6 d, 每天 1 次, 连续 13 周, 恢复期 4 周。

每日观察动物临床症状, 包括外观体征、行为活动、精神状况、注射部位以及死亡或濒死情况等, 每周进行 1 次系统的健康检查。前 4 周每周测 2 次体质量, 以后每周测 1 次, 根据体质量调整给药量。每周测摄食量 1 次。分组前、给药期结束(D91)和恢复期结束(D119)时, 各进行 1 次眼科检查。给药期结束(D92)和恢复期结束(D120)时, 进行血液学[红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)、网织红细胞(RET)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、白细胞(WBC)及分类、血小板(PLT)]、血凝[血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)]、血清生化[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)、总胆红素(TBIL)、尿酸(UREA)、肌酐(CREA)、肌酸激酶(CK)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿糖(GLU)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)]及电解质(K^+ 、 Na^+ 、 Cl^-)指标检测。死亡或濒死动物及时进行大体解剖, 计划安乐死动物于给药期结束(D92)和恢复期结束(D120)进行大体解剖、骨髓涂片、脏器质量/系数(脑、心、肝、脾、肾、胸腺、肾上腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢)和组织病理学等检查。

1.4.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 雌雄分开统计。对计量资料采用如下统计方法^[9]: (1) 首先用 Levene 检验方法进行数据均一性检验, 如果数据均一 ($P > 0.05$), 则进行方差分析检验 (F 检验); 如果 Levene 检验的结果显著 ($P \leq 0.05$), 则进行 Kruskal-Wallis H 检

验。(2) 如果方差分析检验结果显著 ($P \leq 0.05$), 则进一步用 Dunnett 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 H 检验结果显著 ($P \leq 0.05$), 则进一步用 Mann-Whitney U 检验法进行多重比较检验; 如果 Kruskal-Wallis H 检验结果不显著 ($P > 0.05$), 则统计结束。

2 结果

2.1 单次给药毒性试验

氢溴酸樟柳碱注射液给药时动物有尖叫声发出; 给药后即刻出现后肢无力、俯卧、呼吸困难, 甚至抽搐、惊厥、竖尾、颤抖等反应, 剂量越大越明显, 10~20 min 恢复正常; 给药后即刻出现瞳孔散大, 多数动物于第 4 天瞳孔恢复正常大小。给药后 0~30 min 出现尾部发绀, 持续 40~90 min。个别动物第 3 天鼻端异常分泌物增多。给药当天高剂量组有 2 雌 1 雄共 3 只大鼠在给药后 10 min 内死亡, 死亡前的症状主要有抽搐、惊厥、竖尾、颤抖、翻正反射消失、呼吸骤停或减慢等, 其他各组无动物死亡。各给药组存活动物体质量在给药第 2 天较给药前有下降趋势, 第 3 天起逐渐恢复增长(图 1)。对死亡动物和观察期结束存活动物进行大体解剖, 均未发现心、肝、脾、肺、肾等各脏器组织有明显异常。SD 大鼠单次尾 iv 给予氢溴酸樟柳碱的最大耐受量为 428.8 mg/kg, 约为临床剂量(最大每日 10 mg)的 2 573 倍。

2.2 重复给药毒性试验

2.2.1 临床症状 给药期间溶媒对照组 3 只雄鼠意外死亡, 但各给药组无动物死亡。给药后高、中剂量组动物出现的症状主要有: 给药时尖叫, 俯卧、后肢无力、颤抖、抽搐, 呼吸困难, 鼻端和眼周红褐色异常分泌物增多, 皮肤脱毛、结痂, 耳廓溃疡、缺损, 瞳孔散大, 尾部发绀等。高剂量组发生率更高, 程

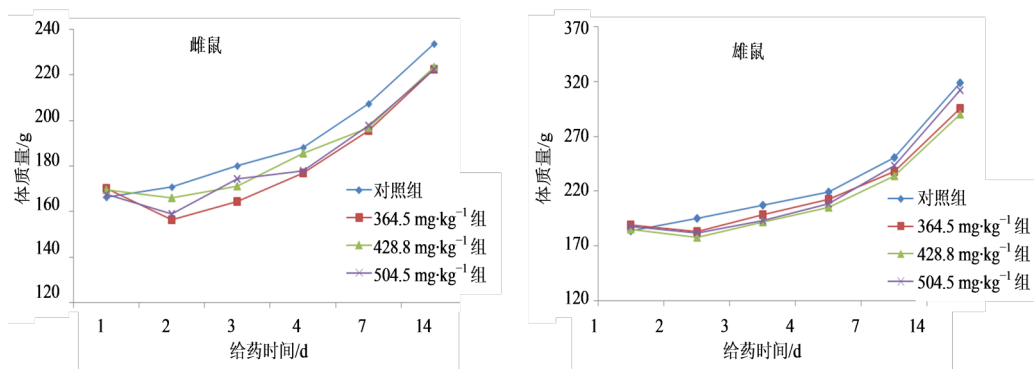


图1 氢溴酸樟柳碱注射液单次给药对大鼠体质量的影响

Fig. 1 Effect of anisodine hydrobromide injection on body weight of rats in single dose toxicity study

度也更明显,其中俯卧、后肢无力、颤抖、抽搐、呼吸困难仅发生于高剂量组。停药恢复期,脱毛、结痂逐渐好转。

2.2.2 体质量 给药期间高剂量组雌鼠和中、高剂

量组雄鼠体质量增长慢于其他各组,恢复期各组动物体质量增长速度有所增加(图2)。提示氢溴酸樟柳碱注射液对大鼠体质量增长的抑制作用有一定的性别差异,对雄鼠更加明显。

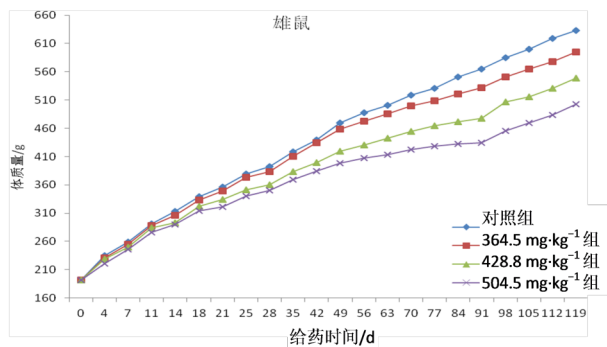
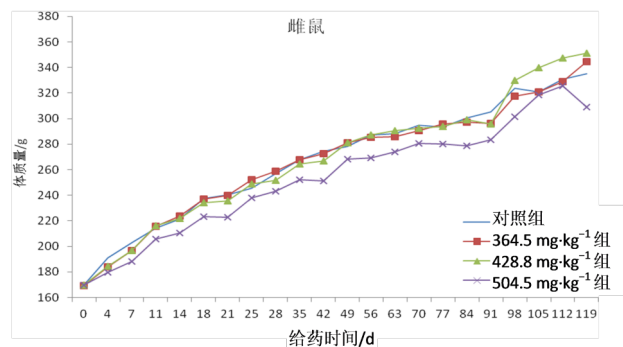


图2 氢溴酸樟柳碱注射液重复给药对大鼠体质量的影响

Fig.2 Effect of anisidine hydrobromide injection on body weight of rats in repeat doses toxicity study

2.2.3 摄食量 中、高剂量组雄鼠给药期间摄食量低于溶媒对照组,而雌鼠仅在第1周低于溶媒对照组。恢复期各给药组摄食量较给药期有所增加,中、高剂量组更明显(图3)。提示氢溴酸樟柳碱注射液对大鼠摄食量的影响也有一定的性别差异,对雄鼠更加明显。

2.2.4 血液学和血凝指标 给药期结束时,高剂量

组雌鼠WBC、Neu显著高于对照组,恢复期结束时Neu仍较其余各组偏高;溶媒对照组雄鼠WBC、Neu也较其他组偏高。白细胞升高的原因可能是动物皮肤外伤、结痂所致。给药期结束时,中、高剂量组雄鼠HGB、HCT及低、中、高剂量组MCV、MCH均较溶媒对照组显著升高,恢复期结束时高剂量组雄鼠HGB、HCT较给药结束时有降低,但仍高于溶媒对照组。恢复期结束时,高剂量组雄鼠PLT较溶媒对照组显著升高,但仍在正常范围内,没有毒理学意义。其余指标未见有毒理学意义的改变,见表1。

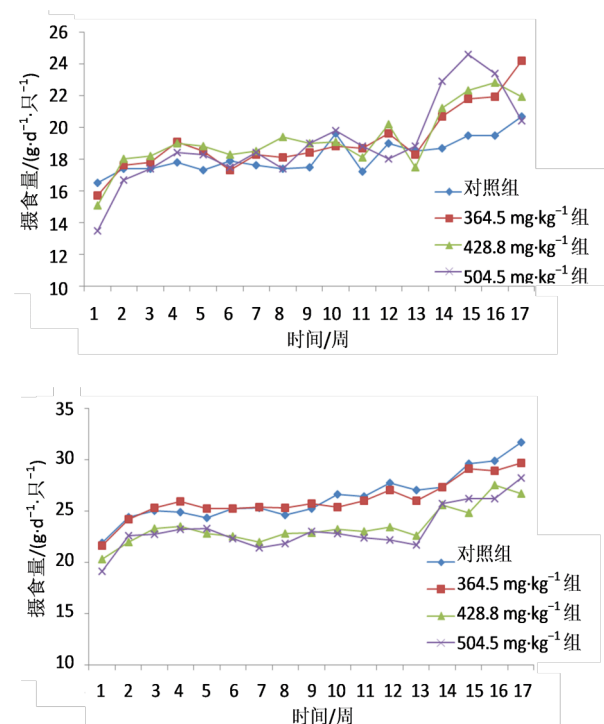


图3 氢溴酸樟柳碱注射液重复给药对大鼠摄食量的影响

Fig.3 Effect of anisidine hydrobromide injection on food consumption of rats in repeat doses toxicity study

2.2.5 血清生化和电解质指标 给药期结束时,中、高剂量组雌鼠ALT较溶媒对照组显著降低,但都在正常范围内,没有毒理学意义;恢复期结束时,溶媒对照组和中剂量组雌鼠ALT、AST均值和标准差均异常偏高,该两组各有1只雌鼠ALT、AST偏高,分别为186.4、527.7 U/L和80.0、432.3 U/L,因已停药恢复4周,对照组也有发生,应为动物个体差异,与药物无关。给药期结束时,高剂量组雄鼠UREA较对照组偏高,低、中、高剂量组雄鼠CREA较对照组偏低,但都在正常范围内,差异没有毒理学意义。给药期结束时,中、高剂量组雌雄动物Cl⁻浓度均显著高于溶媒对照组,其中高剂量组又明显高于中剂量组;低剂量组雄鼠也高于溶媒对照组,但在正常范围内。恢复期结束时中、高剂量组Cl⁻浓度明显下降,仍然显著高于溶媒对照组。其余指标未见有毒理学意义的改变,见表2。

2.2.6 眼科检查、骨髓涂片检查 均未见明显异常。

表1 氢溴酸樟柳碱注射液重复给药对大鼠血液学指标的影响($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of anisodine hydrobromide injection on the hematologic indexes of rats in repeat doses toxicity study($\bar{x} \pm s$)

时间	动物	剂量/(mg ·kg ⁻¹)	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)	HGB/ (g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	WBC/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	Neu/%	PLT/ (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
给药期	雌鼠	0	7.59±0.28	148±8	42.1±2.5	55.5±2.2	19.5±0.6	4.21±1.57	14.05±4.00	1189±150
		10	7.69±0.23	151±6	42.7±1.7	55.5±1.7	19.6±0.5	5.70±1.84	15.61±8.34	1124±85
		50	7.73±0.47	154±8	43.6±2.3	56.4±1.3	19.9±0.6	6.95±3.57	15.56±3.89	1110±102
		200	7.76±0.20	154±4	44.0±1.2	56.6±1.2	19.9±0.4	8.47±3.75*	21.69±7.59*	1113±106
	雄鼠	0	8.61±0.31	155±5	44.9±1.8	52.2±1.0	18.0±0.2	10.82±2.91	25.47±12.95	1171±93
		10	8.41±0.70	157±12	45.5±3.1	54.2±1.9**	18.7±0.5**	9.13±3.13	16.90±8.89	1130±72
		50	8.67±0.41	166±7*	48.0±2.2*	55.4±1.1**	19.2±0.5**	7.52±2.80	16.28±3.59	1106±85
		200	8.83±0.34	170±7**	48.9±2.3**	55.4±0.8**	19.2±0.3**	6.74±3.90	24.14±5.40	1081±94
恢复期	雌鼠	0	7.79±0.39	152±5	43.0±0.9	55.3±2.7	19.5±0.7	3.31±0.90	15.14±8.84	1136±149
		10	7.69±0.38	148±6	42.3±1.3	55.1±2.8	19.3±0.9	3.34±1.44	16.44±7.37	1101±78
		50	7.72±0.23	150±4	42.9±1.0	55.6±0.7	19.4±0.3	3.80±2.78	14.80±7.49	992±76
		200	8.13±0.49	160±11	45.2±2.8	55.7±1.4	19.7±0.5	3.31±1.21	20.16±10.94	1106±172
	雄鼠	0	8.29±0.51	153±7	43.6±1.5	52.7±1.6	18.5±0.5	8.06±0.81	15.76±4.01	1022±53
		10	8.62±0.19	157±3	44.7±0.6	51.8±1.7	18.2±0.7	6.42±1.64	25.88±10.23	1017±110
		50	8.32±0.25	156±3	44.6±0.9	53.6±1.9	18.8±0.8	6.40±2.02	26.40±10.61	1023±46
		200	8.77±0.47	164±6**	47.4±1.7**	54.1±1.3	18.7±0.9	7.50±1.65	24.00±7.31	1196±128*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group表2 氢溴酸樟柳碱注射液重复给药对大鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of anisodine hydrobromide injection on the serum biochemical indexes of rats in repeat doses toxicity study($\bar{x} \pm s$)

时间	动物	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U· L ⁻¹)	AST/(U· L ⁻¹)	ALP/(U· L ⁻¹)	TBIL/(μmol· L ⁻¹)	UREA/(m mol·L ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)	K ⁺ /(mmol ·L ⁻¹)	Na ⁺ /(mmo l·L ⁻¹)	Cl ⁻ /(mmol· L ⁻¹)
给药期	雌鼠	0	34.2±9.9	117.0±32.4	40.4±12.2	1.9±1.2	4.97±0.91	39.1±3.5	4.04±0.39	146.7±1.5	120.5±1.9
		10	27.0±7.9	108.3±36.9	50.8±16.3	1.7±0.8	5.39±0.41	41.2±4.7	3.88±0.45	145.9±1.2	124.3±1.6
		50	21.6±3.9**	104.1±24.0	49.2±11.9	1.7±1.1	5.82±0.97	38.2±2.4	4.10±0.55	144.8±2.3	152.3±22.0**
		200	20.9±3.1**	94.1±12.0	53.4±18.3	1.5±0.9	5.74±0.59	37.5±4.4	3.86±0.35	145.2±1.4	224.4±25.5**
	雄鼠	0	42.4±8.1	131.0±33.6	87.5±20.7	1.5±0.8	5.08±0.48	39.7±4.6	4.18±0.60	145.3±0.7	118.1±1.9
		10	48.5±14.5	137.2±37.5	86.0±17.2	1.7±0.7	5.22±0.60	32.6±5.6*	4.70±0.49	145.7±1.4	124.8±2.2**
		50	39.1±10.7	117.2±19.1	88.4±9.1	1.8±0.9	5.82±0.68	33.1±3.7*	4.63±0.44	145.6±1.2	151.1±4.5**
		200	40.2±11.1	135.2±30.1	85.7±14.5	1.7±0.9	5.85±0.71*	32.4±4.7*	4.57±0.33	145.3±1.5	247.0±12.9**
恢复期	雌鼠	0	66.7±67.6	195.6±186.5	32.7±7.8	2.0±0.5	5.01±1.13	40.5±4.6	3.97±0.45	147.9±2.5	127.3±3.8
		10	35.7±9.8	125.1±30.1	29.9±9.2	2.0±0.3	5.02±0.50	38.7±3.4	3.96±0.32	147.9±2.0	128.9±4.5
		50	47.7±21.9	178.3±145.1	37.4±10.5	1.8±0.2	4.23±0.62	40.3±5.4	4.03±0.13	148.0±1.0	137.9±5.0**
		200	32.8±9.8	103.6±13.9	34.6±9.2	1.9±0.2	6.24±0.81	41.8±2.1	3.69±0.31	147.8±1.6	151.2±2.9**
	雄鼠	0	36.1±3.6	116.6±23.2	77.9±18.2	2.0±0.3	4.42±0.36	34.6±4.3	4.05±0.32	147.4±0.4	126.3±2.6
		10	43.6±6.9	140.6±35.5	72.4±7.6	2.0±0.2	5.40±1.10	42.1±4.2	4.17±0.26	147.1±1.0	128.8±3.8
		50	43.0±11.3	136.8±21.4	90.4±23.6	2.1±0.2	4.95±0.95	40.5±7.0	4.56±0.67	147.6±0.8	137.7±2.5**
		200	40.3±6.6	115.5±15.7	84.7±14.3	1.9±0.1	4.66±0.86	32.5±3.0	4.05±0.40	147.9±1.2	170.6±4.6**

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

2.2.7 脏器质量/系数 给药期结束时,高剂量组雌鼠肾体比与溶媒对照组比较显著升高。给药期结束时,中、高剂量组雄鼠肝脏质量、肝脑比与溶媒对照组比较显著降低,恢复期结束时仍偏低。给药末期时,低、中、高剂量组雄鼠肾体比与溶媒对照组比

较显著升高,恢复期结束时,高剂量组仍明显偏高。各组动物肝、肾等脏器经组织病理学检查并未发现有明显异常,提示以上脏器质量/系数变化为动物体质量增长速度不一致而产生的波动,无明显毒理学意义。其余脏器均未见有毒理学意义的改变,见表3。

表3 氢溴酸樟柳碱注射液重复给药对大鼠脏器质量/系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of anisodine hydrobromide injection on the organ weight/coefficients of rats in repeat doses toxicity study($\bar{x} \pm s$)

时间	动物	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g	脑质量/g	肝脏质量/g	肾脏质量/g	肝体比/%	肝脑比/%	肾体比/%	肾脑比/%
给药期 结束	雌鼠	0	280.0±19.2	2.138±0.135	6.966±0.704	1.805±0.151	2.489±0.211	326.3±31.4	0.645±0.041	84.4±3.5
		10	273.7±15.6	2.050±0.100	7.145±0.404	1.820±0.119	2.616±0.190	349.2±25.2	0.666±0.051	88.8±4.7
		50	268.9±20.8	2.063±0.071	6.796±0.475	1.840±0.129	2.532±0.142	329.7±23.7	0.686±0.049	89.2±6.3
		200	253.5±19.6**	2.008±0.127	6.697±0.575	1.813±0.217	2.645±0.185	333.8±23.1	0.715±0.072*	90.3±9.4
	雄鼠	0	532.6±61.8	2.274±0.068	12.658±1.623	3.256±0.327	2.375±0.084	557.1±72.8	0.614±0.045	143.4±15.5
		10	501.0±52.9	2.236±0.072	11.321±1.290	3.324±0.324	2.260±0.101	506.3±54.3	0.665±0.037*	148.6±12.3
		50	447.6±58.2**	2.182±0.094	9.627±1.352**	3.000±0.405	2.150±0.087*	440.5±51.5**	0.671±0.033*	137.3±15.6
		200	409.9±33.6**	2.068±0.111**	9.240±1.105**	2.833±0.343	2.251±0.148	447.8±57.6**	0.690±0.050**	137.4±18.9
恢复期 结束	雌鼠	0	312.4±34.1	2.184±0.082	8.276±1.073	2.157±0.254	2.650±0.210	378.2±38.0	0.691±0.042	98.6±8.5
		10	318.3±19.8	2.138±0.114	8.411±0.611	2.091±0.122	2.646±0.177	394.2±34.6	0.658±0.026	97.9±4.5
		50	327.5±17.0	2.177±0.111	8.557±0.440	2.125±0.090	2.614±0.102	393.5±22.0	0.651±0.058	97.9±8.7
		200	295.9±15.0	2.132±0.110	7.560±0.634	2.075±0.134	2.561±0.265	354.5±21.2	0.702±0.052	97.4±7.0
	雄鼠	0	597.2±63.2	2.312±0.117	13.616±1.712	3.467±0.279	2.279±0.121	592.2±99.2	0.582±0.023	150.5±16.9
		10	557.6±88.4	2.363±0.103	12.621±3.405	3.442±0.463	2.236±0.224	531.1±123.1	0.620±0.043	145.2±13.6
		50	517.2±13.8	2.320±0.088	10.980±0.964	3.360±0.297	2.120±0.131	474.7±55.6	0.649±0.053	145.0±14.5
		200	473.7±50.4*	2.220±0.037*	10.212±1.416	3.154±0.384	2.153±0.121	459.6±60.0	0.666±0.048*	142.0±16.2

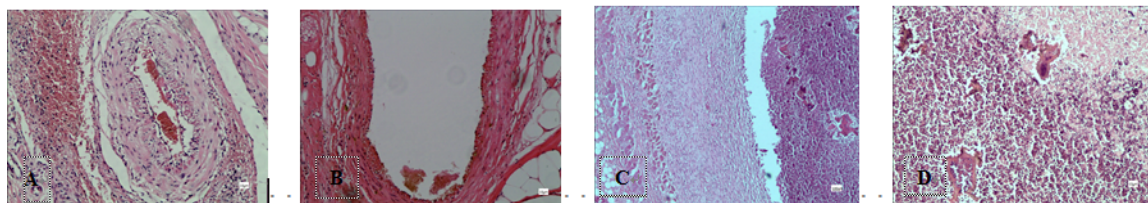
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

2.2.8 大体解剖检查 仅高剂量组发现皮下包块4例,其中眼睑1例,尾部1例,颈部2例,其余未发现与药物相关的异常。

2.2.9 组织病理学检查 给药期结束时,溶媒对照组和高剂量组动物注射部位均见静脉炎及静脉周围炎,恢复期结束时,病变程度减轻(图4A、B)。两

组间严重程度、发生率均无差别,为长期反复静脉注射操作引起,与药物无关。给药结束时,高剂量组发现4例皮下炎性包块,为结节状炎性灶,灶内有大量淋巴细胞及坏死组织,被纤维组织包裹(图4C、D),不能排除与药物的关系。其余组织器官未见与药物有关的病理改变。



A-给药结束时注射部位(尾静脉)($\times 100$); B-恢复期结束时注射部位(尾静脉)($\times 100$); C-皮下炎性包块($\times 40$); D-皮下炎性包块($\times 100$)

A- injection site at the end of administration (tail vein) ($\times 100$); B- injection site at the end of recovery period (tail vein) ($\times 100$); C- subcutaneous inflammatory mass ($\times 40$); D- subcutaneous inflammatory mass ($\times 100$)

图4 重复给药毒性试验大鼠组织病理学检查结果

Fig.4 Histopathological results of rats in repeat doses toxicity study

3 讨论

氢溴酸樟柳碱注射液为成都第一制药有限公司的独家上市品种,其临床不良反应可有口干、头昏、面红、瞳孔散大、尿失禁、疲乏等,偶见暂时性黄疸、意识模糊,减药或停药后可自行消失。课题组前期以氢溴酸樟柳碱注射液给家兔耳缘静脉连续给药7 d,发现0.2 mg/kg剂量单次和多次给药均能散大家兔瞳孔,减弱对光反射;1、5 mg/kg剂量能散大家兔瞳孔、减弱对光反射、升高眼压;上述作用具有一定的剂量相关性;多次给药对瞳孔的改变影响不大,眼压的改变有逐渐减轻和耐受的趋势。提示氢溴酸樟柳碱注射液在1 mg/kg剂量以上时可能对家兔的瞳孔和眼压产生不良作用^[10]。本次研究则从一般毒性的角度对氢溴酸樟柳碱注射液进行评价。

单次和重复给药毒性试验中观察到动物在给药后出现俯卧、后肢无力、颤抖、抽搐、呼吸困难等症状,应为药物中枢抑制作用的表现,且只出现在200 mg/kg及以上剂量。单次给药毒性试验中,死亡动物在死亡前出现呼吸骤停,提示呼吸抑制可能是动物急性死亡的原因。文献也报道氢溴酸樟柳碱随着剂量加大,对家兔中枢抑制程度加深,40 mg/kg只可使家兔呼吸严重抑制,半数动物死亡,并提示其中枢抑制作用与抗胆碱作用有关^[11]。

给药时动物发出尖叫声则是因为药物溶液为酸性,对动物产生了刺激性。鼻端、眼周异常分泌物增多可能是因为药物扩张局部黏膜毛细血管导致局部充血肿胀出血所致。尾部发绀也可能是因为药物扩张局部毛细血管,且尾尖部血流较慢所致。瞳孔散大则为药物阻断虹膜M胆碱受体的药理作用体现。

重复给药毒性试验中,氢溴酸樟柳碱注射液在50、200 mg/kg剂量下可能对雄鼠红细胞生长有一定的促进作用,可升高血红蛋白含量,增大红细胞体积,剂量越大作用越明显,停药4周末完全恢复。50、200 mg/kg剂量组动物血清Cl水平增高,加之药物溶液为酸性,推测长期反复静脉大剂量给药导致动物发生了高氯血症酸中毒。酸中毒可引起机体代谢紊乱及多个系统病变,如恶心、呕吐、纳差,心律失常、心肌收缩力下降、血压降低甚至休克,乏力、嗜睡甚至昏迷,蛋白营养不良,发育障碍,免疫功能下降、易于感染等^[12]。结合本次研究中发现的动物摄食减少、体质量下降,皮肤脱毛、结痂或出现炎性包块,耳廓溃疡、缺损等表现,推测这些症状可

能为药物溶液所致酸中毒的继发效应,但仍需进一步研究。

重复给药毒性试验中,对照组有3只雄鼠分别在给药第24、60、65天发现死亡或濒死,死亡前精神萎靡、俯卧不动、被毛蓬松、体温偏低、体质量下降,其中1只死亡动物鼻周见红褐色分泌物,组织病理学检查发现其组织已自溶,固未能确定死因;1只濒死动物见血尿,解剖发现膀胱高度充盈扩张,腔内充满血凝块,组织病理学检查发现膀胱移行上皮被红细胞附着,全层组织结构破坏,推测死亡原因为膀胱出血;另1只濒死动物见口周有血迹,解剖发现左右肺叶均有暗红色区域,组织病理学检查发现肺实变,肺泡腔内充满渗出物及少量红细胞和淋巴细胞,肺泡壁血管明显充血扩张,部分肺泡壁破坏,推测死亡原因为肺炎。本次试验在屏障系统中进行,各项环境指标、饲料垫料等均符合国家相关标准,试验期间也未出现明显异常,因此可以排除环境和饲养的因素。死亡仅发生在对照组雄鼠,可能与动物互相争斗有关,而且给药组动物未发生死亡,提示动物死亡与氢溴酸樟柳碱无关,不影响对其安全性的评价。

重复给药毒性试验中,恢复期第4周时,200 mg/kg剂量组雌鼠体质量和摄食量较之前有所下降。静脉注射樟柳碱在大鼠体内的半衰期仅为0.58 h^[1],此时已停药4周,动物体内药物早已洗脱干净,可以排除药物导致的迟发效应。推测体质量和摄食的下降应为饲养管理方面的原因导致。

综上所述,在本次试验条件下,氢溴酸樟柳碱注射液重复给药毒性试验中未见明显毒性反应剂量(NOEL)为10 mg/kg,约为临床剂量(最大每日10 mg)的60倍,折算成临床等效剂量为1.67 mg/kg,约每人100 mg/d,远高于临床最大剂量,提示在临床剂量下用药安全性较高。鉴于阿托品类药物不良反应较多,本次试验也发现氢溴酸樟柳碱注射液出现多器官系统的不良反应,而且大鼠和人存在种属差异,因此提醒在临床应用过程中,必须注意可能发生的不良反应,如皮肤、黏膜反应,胃肠道反应,中枢神经系统反应,呼吸系统反应等,长期用药还应监测HGB、HCT和Cl水平,并注意对注射部位的保护。

参考文献

- [1] Tian F J, Li C Y, Wang X, et al. Comparative study on pharmacokinetics of a series of anticholinergics, atropine, anisodamine, anisodine, scopolamine and tiotropium in

- rats [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2015, 40(3): 245-253.
- [2] 刘春刚, 钟强. 氢溴酸樟柳碱注射液治疗缺血性脑卒中的分层诊断与病例报道 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(S2): 187-189.
- [3] 邹曰坤, 张燕, 费月海, 等. 氢溴酸樟柳碱注射液对急性脑梗死患者 NIHSS 评分、改良 Barthel 指数和 CTP 参数的影响 [J]. 卒中与神经疾病, 2018, 25(4): 385-388.
- [4] 陈丹丹, 彭成, 万峰, 等. 氢溴酸樟柳碱对抗大鼠急性脑缺血/再灌注损伤的作用机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(8): 1096-1102.
- [5] 陈丹丹, 谢晓芳, 李梦婷, 等. 氢溴酸樟柳碱对慢性脑缺血损伤大鼠氧化应激及细胞凋亡的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1242-1248.
- [6] 陈保健. 樟柳碱的药理与临床应用 [J]. 江苏医药, 1976, 2(2): 50-51, 14.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. 药物单次给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13)[2018-11-22]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=189>.
- [8] 国家食品药品监督管理总局. 药物重复给药毒性试验技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13)[2018-11-22]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=192>.
- [9] 李波, 袁伯俊, 廖明阳. 药物毒理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [10] 杨娜, 赵治龙, 唐红梅, 等. 氢溴酸樟柳碱注射液对家兔瞳孔和眼压的影响 [C]//第十三届中国实验动物科学年会论文集. 四川成都, 2017: 74-75.
- [11] 卞春甫, 段世明. 樟柳碱中枢药理作用的实验观察 [J]. 药理学学报, 1981, 16(11): 801-805.
- [12] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.