

小儿消积止咳口服液临床用量4个疗程给药对幼龄小鼠的安全性评价

卢佳宝^{1, 2}, 李建超^{2, 3}, 钟颖², 朱晓敏², 沈显辉², 黄娜娜², 孙蓉^{2, 4*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

3. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

4. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要: 目的 参考小儿消积止咳口服液的临床用量, 探讨4个临床疗程(20 d)下, 该品对幼龄小鼠潜在的毒性表现和受累的毒靶器官; 以探索方中槟榔和槟榔碱对儿童临床用药风险的影响。方法 根据产品说明书、临床应用情况和槟榔及槟榔碱毒理学研究报道, 选择幼龄小鼠分别给予小儿消积止咳口服液(4.29、17.16 g·kg⁻¹)、槟榔浸膏(0.24、0.96 g·kg⁻¹)、槟榔碱(0.49、5.46 mg·kg⁻¹) ig给药20 d后, 观察小鼠一般情况及体质量变化, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)水平, 病理学观察肝、肾、心、脾组织病理变化, 用免疫组化方法分析心肌细胞凋亡蛋白的表达情况。结果 小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱各剂量组对小鼠体质量增长没有显著影响; 与对照组相比, 肝、肾功能相关的血液生化学指标无显著差异, 大体解剖及苏木精-伊红(HE)染色显示各给药组肝、肾、心、脾等脏器未见明显的组织病理学改变, 心肌细胞凋亡相关蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)、消皮素D(GSDMD)表达量均未见显著升高。结论 小儿消积止咳口服液、组方中的槟榔及所含成分槟榔碱对幼龄小鼠在临床用量范围内、经4倍给药疗程连续给药, 均未造成明确的毒性, 表明小儿消积止咳口服液临床应用风险可控。

关键词: 小儿消积止咳口服液; 槟榔; 槟榔碱; 幼龄小鼠; 安全性评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)08-1838-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.017

Study on adverse reaction of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral liquid on juvenile mice under a long-term clinical dosage

LU Jiabao^{1, 2}, LI Jianchao^{2, 3}, ZHONG Ying², ZHU Xiaomin², SHEN Xianhui², HUANG Nana², SUN Rong^{2, 4}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

4. Shandong University, Institute of Advanced Medical Sciences, Jinan 250012, China

Abstract: Objective Based on the administration of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid under four clinical procedures (20 d), to investigate its potential toxicity and target organs of toxicity in juvenile mice. Further to anticipate the clinical risks of *Arecae Semen* and arecoline in children. **Methods** According to the instructions and available studies, juvenile mice were ig given Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid (4.29, 17.16 g·kg⁻¹), Bing Lang Jin Gao (0.24, 0.96 g·kg⁻¹), and arecoline (0.49, 5.46 mg·kg⁻¹) for 20 d. The body weight of mice, serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) were observed. Histopathology of the liver, kidney, heart, and spleen detected by HE staining. Finally, cardiomyocyte apoptosis proteins were detected by immunohistochemistry. **Results** The body weight of mice was not significantly affected after the administration of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid, Bing Lang Jin Gao and arecoline. There were

收稿日期: 2024-03-01

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC3502100); 高等医学研究院前沿学科发展基金项目(GYY2023QY01); 小儿消积止咳口服液上市后再评价研究项目(1520019015)

第一作者: 卢佳宝, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学与毒理学。E-mail: 18928895015@163.com

*通信作者: 孙蓉, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药药理学与毒理学。E-mail: sunrong107@163.com

no remarkable differences in blood biochemical indices related to liver and kidney function compared to the control group. No obvious histopathological changes were observed in organs such as liver, kidney, heart and spleen. Bcl-2-related X protein (Bax), caspase-8, and gasdermin D (GSDMD) were not significantly altered. **Conclusion** Within the clinical dosage range and after a four-fold administration course, neither of Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid, and it contained arecae semen and arecoline have posed toxic side effects in juvenile mice, demonstrating that the risk of the clinical application of Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid is controlled.

Key words: Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid; *Arecae Semen*; arecoline; juvenile mice; safety evaluation

小儿消积止咳口服液收载于《中国药典》(2020年版一部),由炒山楂、槟榔、枳实、蜜枇杷叶、瓜蒌、炒莱菔子、炒葶苈子、桔梗、连翘、蝉蜕共10味中药组成。具有清热肃肺、消积止咳的功效,用于小儿饮食积滞、痰热蕴肺所致的咳嗽、夜间加重、喉间痰鸣、腹胀、口臭^[1]。临床常用于治疗小儿急性上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎、慢性咳嗽、食积、便秘等病症^[2-7]。目前不良反应尚不明确,临床报道中指出,与化学药(阿奇霉素、炎琥宁)联合应用可引起个别患儿轻度胃肠道不适、皮疹、头晕、头痛等不良反应^[8-9]。

槟榔为棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子,具有杀虫、消积、行气、利水、截疟的功效^[1]。古籍文献中对于槟榔的毒性鲜有明确记载,但现代研究中指出,槟榔具有一定的肝、肾及生殖毒性,并被世界卫生组织国际癌症研究机构列为1类致癌物^[10]。槟榔碱是槟榔促进胃动力的主要有效成分,研究表明槟榔碱是M受体激动剂,具有神经毒性,可诱导神经元凋亡,并能显著增加致癌、致畸、致突变的风险^[11-12]。四磨汤曾因含有槟榔而引发国内外广泛关注,目前槟榔的毒性报道多集中于咀嚼食用方面,药用槟榔并未发现造成严重不良反应的临床药物相关报道^[13]。

小儿消积止咳口服液作为儿科常用药,其组方及所含槟榔的安全性有待进一步评估。目前药物急毒、长毒评价方法在评价儿科用药的安全性方面,因儿童的发育特征会出现一定的假阳性或假阴性的结果,不能全面真实反映儿科用药临床风险,本研究借鉴课题组前期构建的“药效伴随毒性、量-时-效/毒关系”评价技术^[14-15],选择小儿消积止咳口服液临床用量范围、4倍临床疗程(20 d)下对幼龄小鼠潜在的影响,以期明确小儿消积止咳口服液及方中所含槟榔和槟榔碱的潜在毒性。为进一步完善中成药说明书,提高品种安全标准,确保临床用药安全,提供基于临床剂量范围和用药疗程的毒理学研究数据。

1 材料

1.1 动物

SPF级C57BL/6J小鼠(体质量10~14 g),21~27日龄,购自浙江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(浙)2019-0001。动物饲养于屏障系统中,自由摄取标准饲料及无菌水,控制温度(22±1)°C和湿度50%~60%,12 h光暗循环。所有动物实验均经山东大学第二医院研究伦理委员会批准(KYLL-2022A188),并严格按照《关于善待实验动物的指导性意见》(国科发财字[2006]398号)有关实验动物的伦理和福利相关规定进行。

1.2 药物

小儿消积止咳口服液浸膏按照《中国药典》(2020年版一部)中制法规定工艺规程制备,槟榔浸膏按照相同工艺规程单独制备,受试药均由鲁南厚普制药有限公司制备提供,批号为3011P126C。槟榔碱(HPLC测得质量分数≥98%,货号B74705)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 试剂

丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)测试盒(货号C009-2-1、C010-2-1、A020-2-2、C013-2-1、C011-2-1;购自南京建成生物工程研究所);4%多聚甲醛(货号BL539A;北京Biosharp公司);Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)抗体(货号5023T、4790T;购自美国Cell Signaling Technology公司);消皮素D(GSDMD)抗体(货号A22523;武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.4 实验仪器

AL104精密电子天平(上海梅特勒·托利多科技有限公司);Multiskan Go-1510全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific公司);R500小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);S60数字病理切片扫描仪(日本HAMAMATSU公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将70只小鼠随机分为7组,分别为对照组,小儿消积止咳口服液低、高剂量(4.29 、 $17.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),槟榔浸膏低、高剂量(0.24 、 $0.96\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和槟榔碱低、高剂量(0.49 、 $5.46\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组10只,雌雄各半,对照组按照 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 双蒸水,各给药组采用双蒸水稀释药物至相应浓度后ig给药20 d。基于小儿消积止咳口服液5岁儿童(20 kg)日用量为 60 mL , 1 g 小儿消积止咳口服液浸膏相当于 6.36 mL 小儿消积止咳口服液,根据体表面积换算可得小儿消积止咳口服液浸膏临床等效剂量为 $4.29\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (低剂量),4倍临床等效剂量为 $17.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (高剂量)。 1 g 槟榔浸膏可用于制备 114.38 mL 小儿消积止咳口服液,根据体表面积换算可得槟榔浸膏低、高剂量分别为 0.24 、 $0.96\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。有研究表明,小儿消积止咳口服液中槟榔碱的平均质量浓度为 $0.018\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,根据体表面积换算可得槟榔碱低剂量组给药量为 $0.49\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。《中国药典》规定槟榔干燥品中槟榔碱的含量不得少于 0.20% ,根据制备工艺, 100 g 槟榔可制备 1 000 mL 小儿消积止咳口服液,由此计算得槟榔碱高剂量组给药量为 $5.46\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 标本采集及处理

给药结束后,使用异氟烷麻醉,收集血液置于 1.5 mL 离心管中,静置2 h后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 000 rpm ,离心 15 min 收集血清。剖取脑、心、肝、脾、肾等脏器称重并计算脏器指数及脏脑比(脏器质量/脑质量),心、肝、脾、肾等脏器分装至 4% 多聚甲醛中固定,剩余部分放入液氮中冷冻备用。

2.3 血清生化指标检测

每组随机选取3只小鼠的血清样本,参考试剂盒说明书要求检测小鼠血清中ALT、AST、LDH、

BUN、Cr水平。

2.4 组织病理学检查

组织在 4% 多聚甲醛中固定5 d,乙醇脱水,石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)染色,进行组织病理学观察。使用NanoZoomer S60a对所有切片进行拍照及形态观察。

2.5 免疫组化实验

将固定好的心脏组织进行石蜡包埋切片,经抗原修复,内源性过氧化物酶阻断及非特异染色阻断剂孵育后,加入一抗在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。使用山羊抗兔IgG聚合物室温孵育,用DAB辣根过氧化物酶显色试剂避光显色 15 min ,苏木素复染后采用NanoZoomer S60a对所有切片进行观察并采集图像。

2.6 统计学分析

统计分析采用GraphPad Prism 8统计软件,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,至少独立重复3次。对符合正态分布的两组数据进行非配对双尾 t 检验。

3 结果

3.1 小鼠一般情况观察及药物对体质量的影响

选取幼龄小鼠($21\sim 27$ 日龄),给药期间观察幼鼠被毛、饮食饮水、精神状态及活动情况等,每2天记录幼鼠体质量,结果如图1所示。给药过程中,各组小鼠均被毛光滑,体态正常,食欲旺盛,精神状态良好,反应敏捷,活动有力。给药前10 d,幼鼠体质量增长迅速,之后趋势放缓,符合幼龄小鼠自然生长规律。各给药组与对照组相比,小鼠体质量无显著差异。

3.2 对脏器指数的影响

与对照组相比,小儿消积止咳口服液低、高剂量组,槟榔浸膏低、高剂量组,槟榔碱低、高剂量组小鼠肝脏指数、心脏指数、脾脏指数、肾脏指数差异

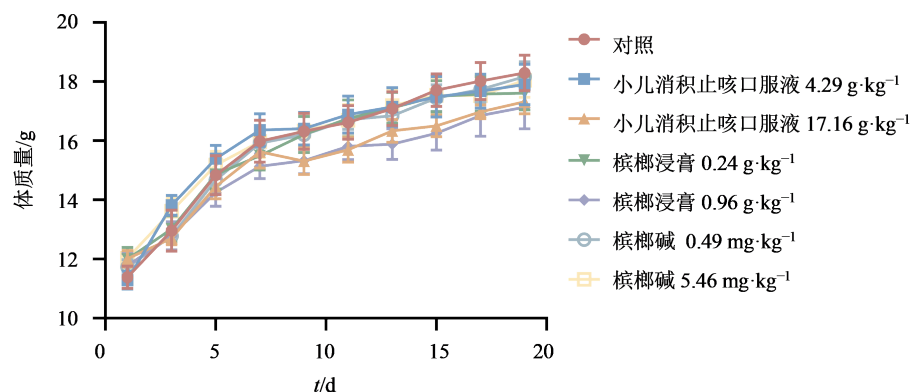


图1 小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱对小鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effect of Xiaojiao Zhike Oral Liquid, Bing Lang Jin Gao, and arecoline on body weight of mice($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

均无统计学意义。为排除体质量影响,进一步分析脏脑比发现,各给药组小鼠脏脑质量无显著差异,脏脑比差异无统计学意义,结果如图2所示。

3.3 对组织病理学的影响

对小鼠进行大体解剖,发现小鼠各脏器体积、颜色、质地均未发生明显改变,未出现肉眼可见的组织病变。进一步对小鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏进行组织病理学检查,结果如下。

3.3.1 对心脏组织病理学的影响 各组小鼠心脏均未出现显著肥大,心腔及心壁结构正常,心肌细胞排列整齐,细胞间隙正常,细胞质染色均匀,细胞核形态无明显差异,未见水肿淤血及炎症细胞浸润等现象。说明在当前给药剂量下,小鼠心脏没有出现显著的病理损伤(图3)。

3.3.2 对肝脏组织病理学的影响 对照组肝小叶结构清晰,中央静脉周围可见肝细胞呈放射状排列,大小均匀,形态完整,细胞核结构形态正常,核膜清楚。各给药组均未见明显病理损伤,肝细胞未见明显变性、坏死,肝窦未见明显淤血扩张,未出现大量炎症细胞浸润现象(图4)。

3.3.3 对脾脏组织病理学的影响 与对照组相同,

各给药组脾脏组织被膜完整,白髓与红髓分界清晰,白髓区域正常,结构正常,动脉周围淋巴鞘未见明显增厚,脾小体未见大量增多,红髓区域未见明显淋巴细胞浸润(图5)。

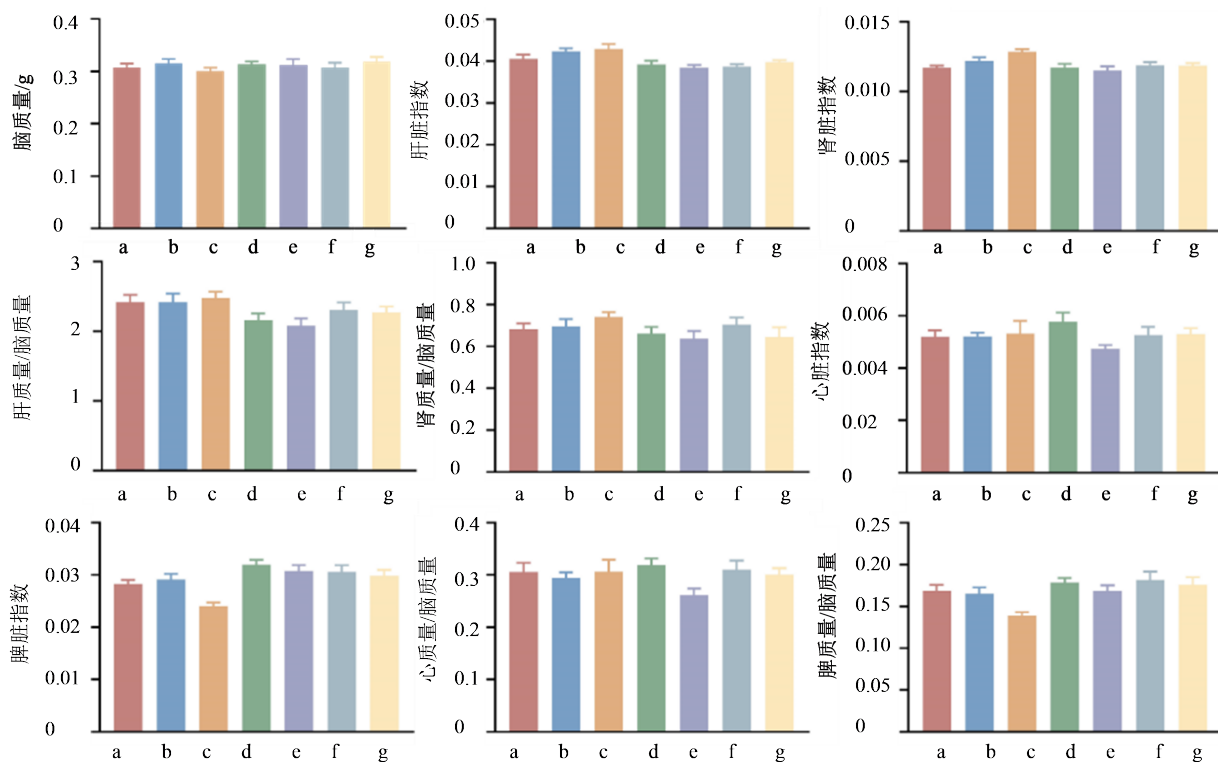
3.3.4 对肾脏组织病理学的影响 肾脏组织的皮质、髓质分界清晰,肾小球结构完整,毛细血管袢开放良好,肾小管上皮细胞形态正常,未见内皮细胞增生及间质水肿(图6)。

3.4 对血液生化指标的影响

如表1所示,对照组小鼠各血清肝肾功能指标水平均在正常范围内。小儿消积止咳口服液高剂量组ALT、LDH活性有不同程度的升高($P>0.05$),Cr含量降低($P>0.05$),提示高剂量的药物对肝肾代谢造成一定影响,但不构成毒性损伤。槟榔浸膏及槟榔碱对小鼠血清ALT、AST、LDH、BUN、Cr含量影响较小,与对照组相比均无统计学差异($P>0.05$)。

3.5 对心肌细胞凋亡的影响

为进一步确认小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱对心脏的毒性,利用免疫组化技术对心肌细胞中凋亡相关蛋白的表达情况进行评价。与对



a-对照组;b~c-小儿消积止咳口服液(4.29、17.16 g·kg⁻¹);d~e-槟榔浸膏(0.24、0.96 g·kg⁻¹);f~g-槟榔碱(0.49、5.46 mg·kg⁻¹)。
a-control group; b~c- Xiaer Xiaoji Zhike Oral Liquid groups (4.29, 17.16 g·kg⁻¹); d~e-Bing Lang Jin Gao groups (0.24, 0.96 g·kg⁻¹); f~g-arecoline groups (0.49, 5.46 mg·kg⁻¹).

图2 小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱对小鼠脏器指数和脏脑比的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Effect of Xiaer Xiaoji Zhike Oral Liquid, Bing Lang Jin Gao, and arecoline on organ coefficient of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

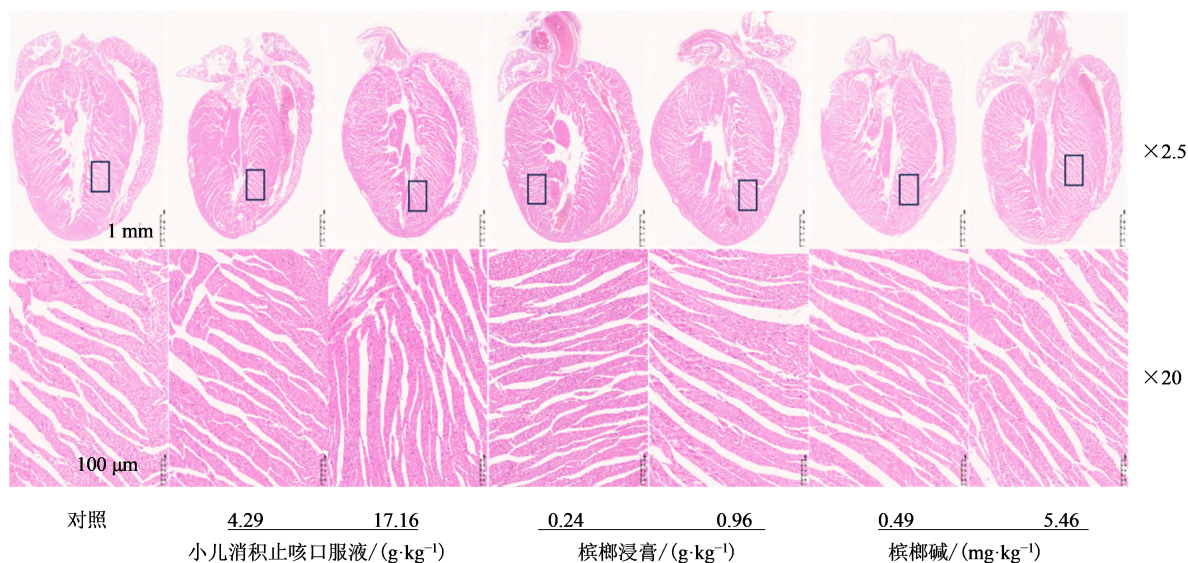


图3 心脏病理情况

Fig. 3 Histopathological heart condition

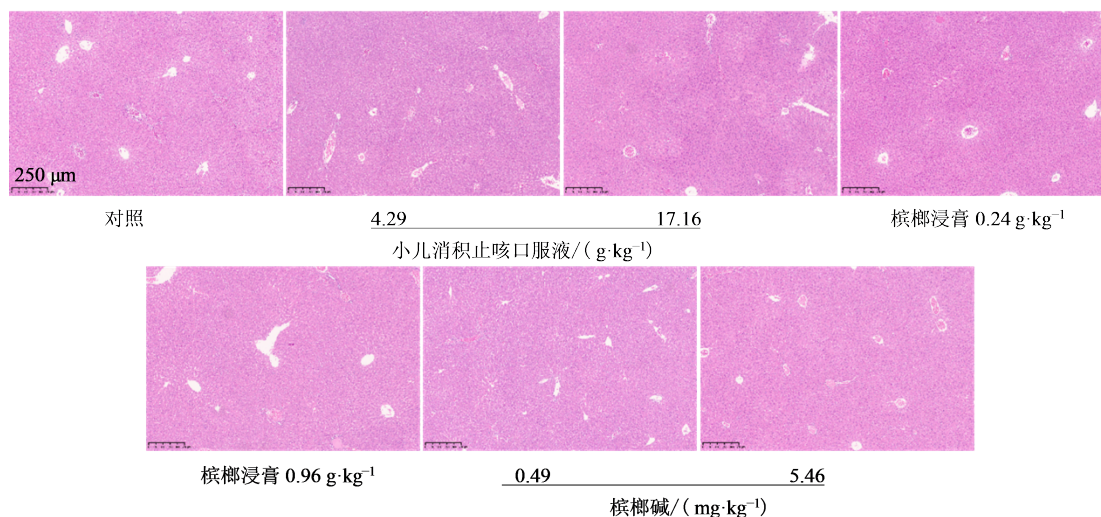


图4 肝脏病理情况($\times 100$)

Fig. 4 Histopathological liver condition ($\times 100$)

照组相比,各给药组心肌细胞中Bax、Caspase-8、GSDMD的蛋白表达量未见显著升高,见图7。

4 讨论

小儿消积止咳口服液是儿科临床用于治疗急性上呼吸道感染(风热夹痰证)、急性支气管炎(痰热壅肺证)、肺炎(痰热闭肺证)、慢性咳嗽(痰热证)等病证的常用中成药,已纳入《中成药临床应用指南-儿科疾病分册》;在《中药大品种科技竞争力研究报告(2019版)》—儿科用药中药大品种科技竞争力榜中位列第5位^[17]。小儿消积止咳口服液由炒山楂、槟榔、枳实、蜜枇杷叶、瓜蒌、炒莱菔子、炒葶苈子、桔梗、连翘、蝉蜕共10味中药组成。其中,槟榔被世界卫生组织国际癌症研究机构列为1类致癌

物,相关致癌报道多针对嚼食槟榔,在新加坡、加拿大和澳大利亚等国家被认定为毒品而禁止销售。槟榔药入药部位是其干燥成熟种子,药用历史悠久,始见于汉代《金匱要略》,临床应用过程中鲜有毒性报道^[13]。既往研究认为,这与嚼食槟榔与药用槟榔在服食部位、习惯以及槟榔碱摄入量方面存在较大差异有关^[18-19]。葶苈子并非传统有毒药物,一项急性毒性试验结果显示,南葶苈子生品有一定不良反应,但毒性较低,可以耐受,并且炒制过程可以降低毒性^[20]。连翘苷是连翘中的主要活性成分。一些研究指出,高剂量的连翘苷($\geq 500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)可能增加小鼠嗜多染红细胞微核率和雄性小鼠精子的畸形率,这暗示了其潜在的遗传毒性风险^[21]。辛

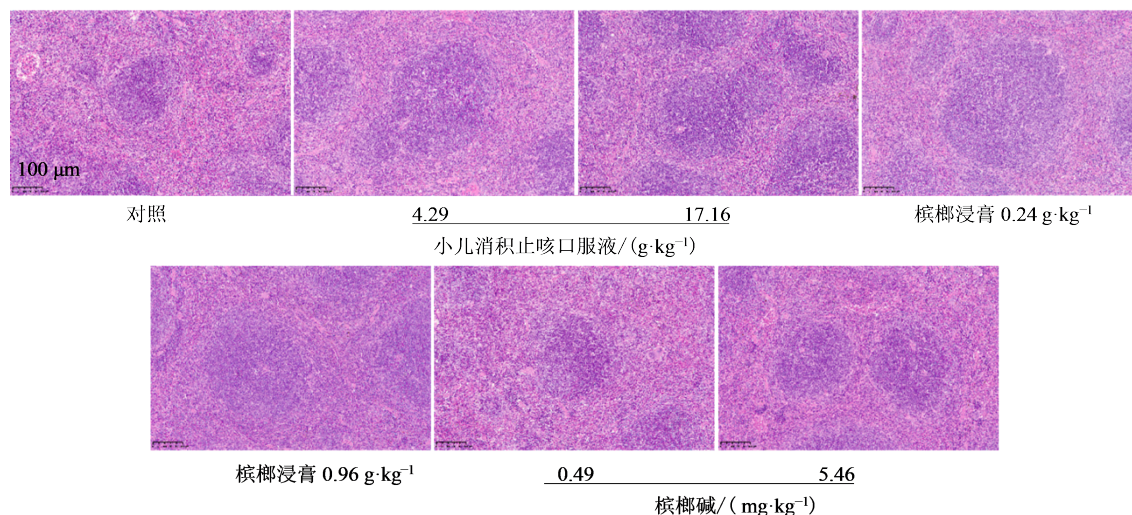


图5 脾脏病理情况(HE, ×200)

Fig. 5 Histopathological spleen condition (HE, ×200)

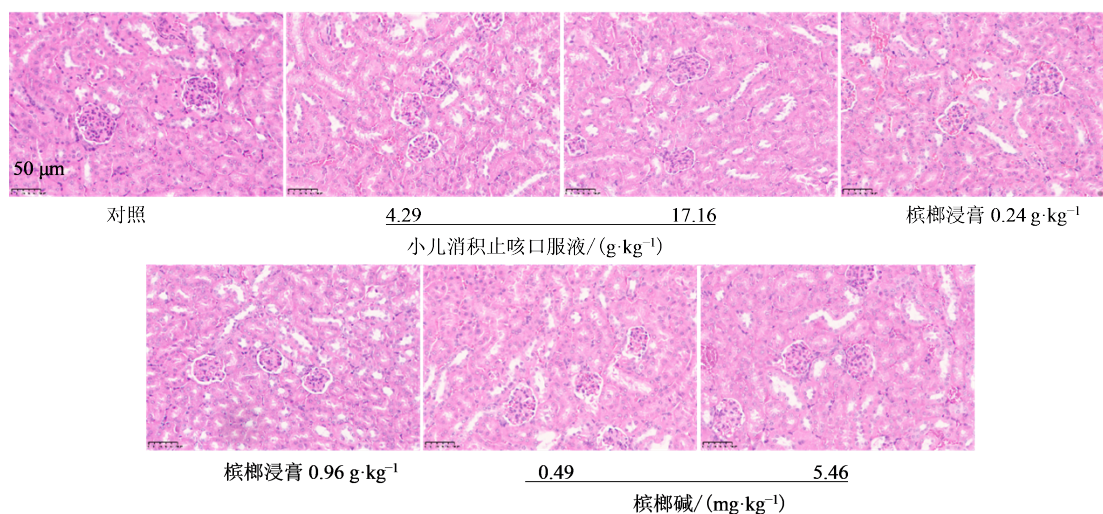


图6 肾脏病理情况(HE, ×400)

Fig. 6 Histopathological kidney condition (HE, ×400)

表1 小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱对小鼠血清肝肾功能指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 1 Effect of hepatorenal function indexes in serum of Xiaoe'r Xiaojizhi Ke Oral Liquid, Bing Lang Jin Gao, and arecoline to mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	BUN/(μmol·L ⁻¹)	Cr/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	22.86±3.35	55.75±7.91	5 093.83±259.36	9.15±4.02	446.27±260.05
小儿消积止咳	4.29	21.39±4.34	40.25±6.56	4 671.45±311.36	9.98±2.20	303.65±132.63
	17.16	27.68±5.02	50.53±10.21	5 457.47±281.96	7.75±0.40	198.07±62.98
槟榔浸膏	0.24	21.72±1.12	52.49±5.61	4 728.07±371.88	10.47±0.26	314.55±125.21
	0.96	18.82±1.15	51.84±4.95	4 630.78±253.45	9.11±1.23	358.16±250.36
槟榔碱	0.49	22.74±2.04	51.70±8.39	4 654.44±293.33	9.31±1.22	391.37±165.22
	5.46	19.66±1.79	49.98±7.44	4 367.62±186.23	8.70±0.93	308.38±83.46

弗林是枳实中的一种生物活性成分,它具有刺激肾上腺素能受体的作用。尽管辛弗林在适量使用时通常被认为是安全的,但过量摄入可能会对心脏功

能产生不良影响,包括心律不齐或血压升高^[22]。到目前为止,关于炒山楂、蜜枇杷叶、瓜蒌、炒莱菔子、桔梗和蝉蜕的毒性,尚未发现广泛认可的科学报道

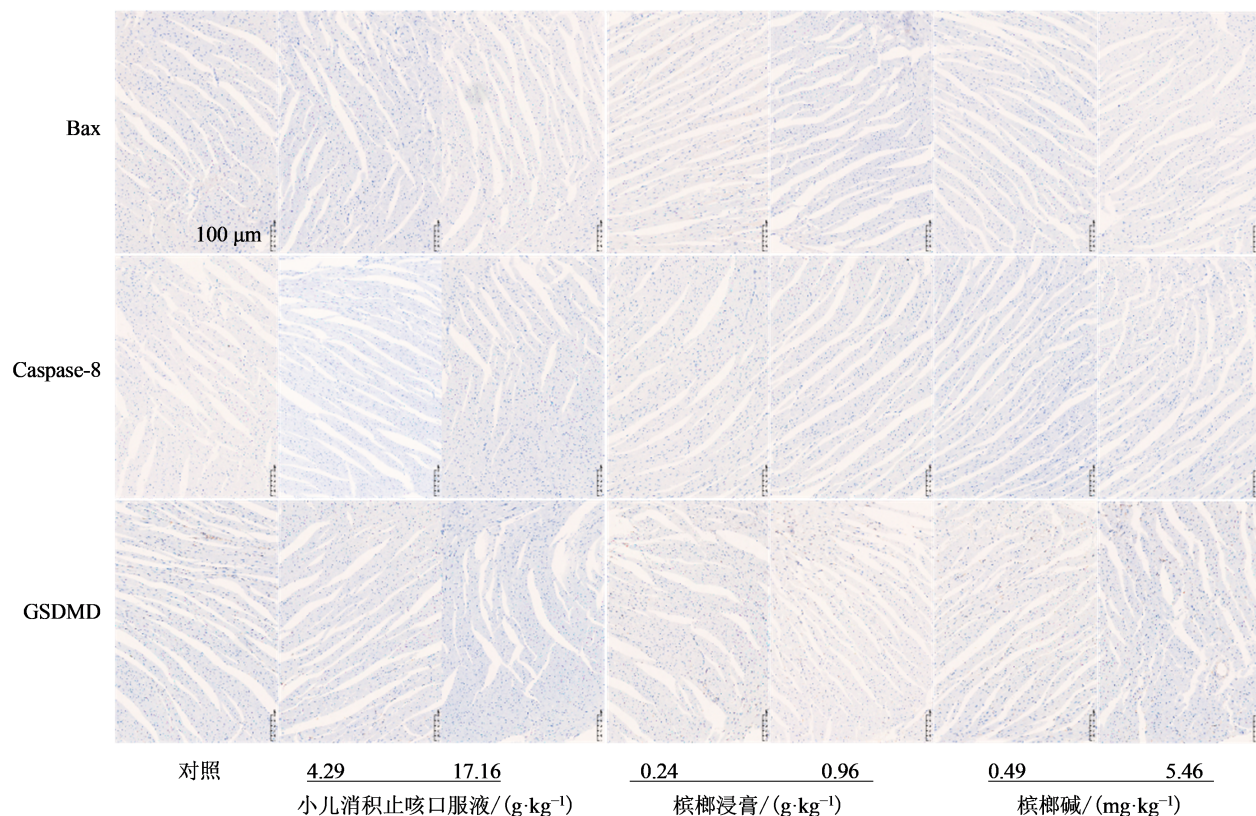


图7 小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱对小鼠心肌细胞凋亡蛋白的影响($\times 200$)

Fig. 7 Effect of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid, Bing Lang Jin Gao, and arecoline on apoptosis protein in cardiomyocytes of mice($\times 200$)

或研究文献。除槟榔外,其余药材在传统用法和用量下通常被认为是安全的。临床应用研究中针对小儿消积止咳口服液的不良反应报道较少,Meta分析结果显示,在阿奇霉素基础上联用小儿消积止咳口服液治疗小儿支原体肺炎不增加不良反应的发生率,甚至能够减少阿奇霉素治疗产生的恶心、呕吐、腹泻等不良反应,安全性较高^[23-25]。单独使用小儿消积止咳口服液治疗小儿支气管炎,腹泻、恶心、皮疹等不良反应发生率显著低于参考组^[26]。婴幼儿期组织器官处于发育完善阶段,对药物毒性敏感度较高,需进一步加强用药安全性评价研究^[27];在临床应用剂量和疗程范围内,有无安全性风险也亟需进一步研究证实。因此,本实验选择小儿消积止咳口服液临床用量范围、4倍临床疗程(20 d)下对幼龄小鼠潜在的毒性表现进行研究,以期明确小儿消积止咳口服液及方中所含槟榔和槟榔碱的潜在毒性。

有研究表明,槟榔提取物对小鼠有明显的毒性作用,槟榔的半数致死量(LD_{50})为:3.67 g·kg⁻¹,大约为5岁儿童临床小儿消积止咳口服液日用量所含槟榔的90倍以上^[28]。槟榔碱对实验小鼠的 LD_{50} 为174.71 mg·kg⁻¹,其95%可信区间为145.22~210.14 mg·kg⁻¹,现有毒性报

道与临床用量差距较大^[29]。本实验结果表明,在临床用量范围、4倍临床疗程下,与对照组相比,各给药组小鼠体质量增长情况正常,各脏器指数、脏脑比均无显著差异,说明小儿消积止咳口服液及所含槟榔和槟榔碱对幼龄小鼠的生长发育无显著毒性。HE染色显示,各给药组脾脏结构完整,白髓与红髓分界清晰,未见明显淋巴细胞浸润,小鼠免疫功能没有显著变化。

有研究发现,咀嚼槟榔会增加患肝细胞癌、肝硬化及慢性肾脏疾病的风险^[30-31]。曾薇等^[32]使用5 mg·kg⁻¹氢溴酸槟榔碱ig小鼠28 d,诱发小鼠血清Cr、BUN含量的显著升高。本实验结果显示,小鼠肝、肾细胞结构正常,不存在明显病理损伤,与对照组相比,ALT、AST、LDH、BUN、Cr等肝肾血清生化指标含量没有显著性差异,说明在当前给药剂量下,小鼠肝肾功能未出现有毒理意义的指标变化,对小鼠肝脏、肾脏没有明显的毒性损伤。

药物通过诱发心肌结构或代谢性损伤,促进细胞凋亡,抑制心肌的收缩性是引发心脏毒性的重要因素,心肌损伤是对心脏毒性进行风险评估和早期诊断的重要依据^[33-34]。本实验发现,给药后小鼠心

腔形态正常,心室壁未见明显变薄,心肌细胞排列整齐,细胞核无显著增大。通过免疫组化技术进一步研究心肌细胞凋亡相关蛋白的表达情况,与对照组相比,各给药组心肌细胞中 Bax、Caspase-8、GSDMD 的蛋白表达量未见显著升高,说明在当前给药剂量下,小鼠心肌细胞凋亡过程没有显著激活,心肌没有明显损伤,未表现出心脏毒性。

综上所述,小儿消积止咳口服液、槟榔浸膏及槟榔碱各剂量组在一般观察,饮食饮水状况及幼鼠体质量增长方面未见与给药相关的明显异常变化。HE 染色显示各给药组肝、肾、心、脾等脏器未见明显与给药相关的组织病理学改变。与对照组相比,肝肾功能相关的血液生化学指标无显著差异,心肌细胞凋亡相关蛋白表达量未见显著升高。在本研究所确定条件下,幼龄小鼠经4倍给药疗程(20 d)连续给予小儿消积止咳口服液($4.29、17.16\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、槟榔浸膏($0.24、0.96\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、槟榔碱($0.49、5.46\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),未发现明确的毒性作用和毒性靶器官,表明小儿消积止咳口服液临床应用风险可控。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020
- [2] 谢国栋,赵静,彭晨娜,等.小儿消积止咳颗粒治疗小儿痰热咳嗽兼食积证的疗效观察[J].中国合理用药探索,2023,20(1):56-59.
Xie G D, Zhao J, Peng C N, et al. Observation on efficacy of Xiaoe Xiaoji Zhike Granule in treating children with phlegm-heat cough and indigestion [J]. Chin J Ration Drug Use, 2023, 20(1): 56-59.
- [3] 袁斌.小儿消积止咳口服液治疗小儿急性支气管炎118例疗效观察[J].江苏中医,2001,33(12):16.
Yuan B. Observation on therapeutic effect of Xiaoe Xiaoji Zhike oral liquid on 118 cases of acute bronchitis in children [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2001, 33(12): 16.
- [4] 王文金,钟日荣.小儿消积止咳口服液对小儿支气管肺炎症状消失时间及血清细胞因子水平的影响[J].中国医药指南,2023,21(25):53-56.
Wang W J, Zhong R R. Effect of Xiao'er Xiaoji Zhike oral liquid on the disappearance time of symptoms and serum cytokine levels in children with bronchopneumonia [J]. Guide China Med, 2023, 21(25): 53-56.
- [5] 周虹.小儿消积止咳口服液治疗儿童功能性便秘30例临床观察[J].现代诊断与治疗,2014,25(22):5088-5089.
Zhou H. Clinical observation on treating 30 cases of functional constipation in children with Xiaoe Xiaoji Zhike oral liquid [J]. Mod Diagn Treat, 2014, 25(22): 5088-5089.
- [6] 雷璇,汪芸兰,魏玄,等.基于特征图谱的小儿消积止咳口服液量质传递相关性研究[J].中草药,2023,54(16):5182-5195.
Lei X, Wang Y L, Wei X, et al. Correlation between quantity and quality transfer of Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid for children based on characteristic chromatogram [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16): 5182-5195.
- [7] 罗倩微,姚璐,杨倬,等.小儿消积止咳口服液抗肠炎靶点与作用机制研究[J].中草药,2022,53(8):2368-2375.
Luo Q W, Yao L, Yang Z, et al. Anti-enteritis targets and mechanism of Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(8): 2368-2375.
- [8] 陈丹,韩斌,王静,等.小儿消积止咳口服液联合注射用炎琥宁治疗儿童支原体肺炎的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(2):278-281.
Chen D, Han B, Wang J, et al. Clinical study on Xiaoe Xiaoji Zhike Oral Liquid combined with Potassium Sodium Pehydroandrographolide Succinate for injection in treatment of children with mycoplasma pneumonia [J]. Drugs Clin, 2018, 33(2): 278-281.
- [9] 王艳茹,章樱,周琴,等.小儿消积止咳口服液联合阿奇霉素治疗支原体肺炎及对患儿体液免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(5):1168-1171.
Wang Y R, Zhang Y, Zhou Q, et al. Effect of Xiaoe Xiaoji Zhike oral liquid combined with azithromycin on *Mycoplasma* immune function in children with *Mycoplasma pneumonia* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(5): 1168-1171.
- [10] 刘书伟,张田田,王燕,等.槟榔化学成分及其生物活性研究进展[J].现代食品科技,2024,40(6):1-10.
Liu S W, Zhang T T, Wang Y, et al. Research progress on chemical constituents and biological activity of Areca-nut [J]. Mod Food Sci and Technol, 2024, 40(6): 1-10.
- [11] Shih Y T, Chen P S, Wu C H, et al. Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(10): 1471-1479.
- [12] Oliveira N G, Ramos D L, Dinis-Oliveira R J. Genetic toxicology and toxicokinetics of arecoline and related areca nut compounds: An updated review [J]. Arch Toxicol, 2021, 95(2): 375-393.

- [13] 梁焕宴, 冀沛然, 弓宝, 等. 槟榔的药用历史及其应用现状 [J]. 中草药, 2024, 55(2): 678-687.
Liang H Y, Ji P R, Gong B, et al. Medicinal history and current application status of *Arecae Semen* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(2): 678-687.
- [14] 赵庆华, 孙蓉. 雷公藤片对迟发型超敏反应小鼠的药效与肝脏伴随毒副作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(03): 156-159.
Zhao Q H, Sun R. Toxic and side effects of Leigongteng Tablet in mice with delayed type hypersensitivity [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(3): 156-159.
- [15] 孙蓉, 李晓宇, 王亮, 等. 基于"效-毒"相关的Q-marker合理辨识与科学控制 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(8): 1224-1231.
Sun R, Li X Y, Wang L, et al. A Research on reasonable identification and scientific control of quality marker (Q-marker) based on efficacy-toxicity correlation [J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Techn, 2016, 18(8): 1224-1231.
- [16] 康四和, 周锐, 聂晶. HPLC法测定小儿消积止咳口服液 中槟榔碱的含量 [J]. 中国药师, 2011, 14(1): 65-66.
Kang S H, Zhou R, Nie J. Determination of arecoline in Xiaoji Zhike oral liquids for children by HPLC [J]. China Pharm, 2011, 14(1): 65-66.
- [17] 李耿, 郭宇博, 李文姗, 等. 中药大品种科技竞争力报告 (2019版)概要 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(1): 1-20.
Li G, Guo Y B, Li W S, et al. Summary of competitiveness report on science and technology of big brand traditional Chinese medicine (2019 edition) [J]. Mod Chin Med, 2020, 22(1): 1-20.
- [18] 朱文静. 槟榔单体成分毒性与其复方制剂不良反应的相关性研究 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36(6): 1034-1038.
Zhu W J. Study on the correlation between the compound toxicity of *Areca catechu* L. and the adverse reactions of preparations containing *Areca catechu* L [J]. Northwest Pharm J, 2021, 36(6): 1034-1038.
- [19] 刘小靖, 王鹏龙, 项嘉伟, 等. 以中医药思维理解"食用槟榔"与"药用槟榔" [J]. 中草药, 2021, 52(1): 248-254.
Liu X J, Wang P L, Xiang J W, et al. Dispute between "edible *Areca catechu*" and "medicinal *Areca catechu*" under thinking of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(1): 248-254.
- [20] 马梅芳, 吕文海, 李洁. 南葶苈子不同炮制品药效学与急性毒性实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(8): 1825-1827.
Ma M F, Lv W H, Li J. Experimental research on pharmacology and acute toxicology of *Descurainia sophia* (L.) Webb ex prantl processed [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2008, 26(8): 1825-1827.
- [21] 赵咏梅, 张思琪. 连翘苷对小鼠遗传物质的损伤作用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(10): 35-39.
Zhao Y M, Zhang S Q. Damage of phillyrin to genetic material of mice [J]. J Northwest A F Univ Nat Sci Ed, 2014, 42(10): 35-39.
- [22] Rossato L G, Costa V M, Limberger R P, et al. Synephrine: From trace concentrations to massive consumption in weight-loss [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(1): 8-16.
- [23] 李天力, 蒲凤兰, 吴洋, 等. 小儿消积止咳口服液联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的系统评价与Meta分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9): 2193-2202.
Li T L, Pu F L, Wu Y, et al. Meta-analysis of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid combined with azithromycin in treatment of mycoplasma pneumonia in children [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(9): 2193-2202.
- [24] 李锦田, 张凯楠, 周婧, 等. 基于网状Meta分析的6种口服中成药联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的有效性、安全性及经济性评价 [J]. 中国药物经济学, 2022, 17(8): 22-31.
Li J T, Zhang K N, Zhou J, et al. Efficacy, safety and pharmacoeconomic evaluation of six oral Chinese patent medicines combined with azithromycin in the treatment of *Mycoplasma pneumonia* in children based on network Meta-analysis [J]. China J Pharm Econ, 2022, 17(8): 22-31.
- [25] Zhang G M, Huang Z Y, Sun R, et al. Xiao'er Xiaoji Zhike oral liquid combined with azithromycin for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: A systematic review and Meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9740841.
- [26] 林晓洁, 赵亚文, 林晓彤. 小儿消积止咳口服液在小儿支气管炎中的治疗作用分析 [J]. 世界复合医学, 2023, 9(10): 164-166, 170.
Lin X J, Zhao Y W, Lin X T. Analysis of the therapeutic role of Xiaoer Xiaoji Zhike oral liquid in pediatric bronchitis [J]. World J Complex Med, 2023, 9(10): 164-166, 170.
- [27] 卫生健康委办公厅. 国家卫生健康委办公厅关于进一步加强儿童临床用药管理工作的通知 [EB/OL]. (2023-01-16) [2024-01-31]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/20/content_5738134.htm
General Office of Health Commission. Notice of the General Office of the National Health Commission on Further Strengthening the Management of Clinical Drug Use in Children [EB/OL]. (2023-01-16) [2024-01-31]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2023-01/20/content_5738134.htm

- [28] 邹霞辉, 李超, 韩丽萍, 等. 槟榔与青蒿配伍增毒的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(11): 2608-2609.
Zou X H, Li C, Han L P, et al. Experimental Study on Increasing Toxicity of *Areca catechu* and *Artemisia annua* together [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(11): 2608-2609.
- [29] 赵成莹, 张继瑜, 周绪正, 等. 槟榔碱、氢溴酸槟榔碱的急性毒性研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2007, 26(1): 33-34.
Zhao C Y, Zhang J Y, Zhou X Z, et al. Acute toxicity of arecoline and arecoline hydrobromide in mice [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2007, 26(1): 33-34.
- [30] Chou C Y, Cheng S Y, Liu J H, et al. Association between betel-nut chewing and chronic kidney disease in men [J]. Public Health Nutr, 2009, 12(5): 723-727.
- [31] Wu G H, Boucher B J, Chiu Y H, et al. Impact of chewing betel-nut (*Areca catechu*) on liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma: A population-based study from an area with a high prevalence of hepatitis B and C infections [J]. Public Health Nutr, 2009, 12(1): 129-135.
- [32] 曾薇, 古桂花, 李建新, 等. 槟榔碱的肾毒性实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(6): 6-8, 73.
Zeng W, Gu G H, Li J X, et al. Study of renal toxicity on arecoline [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2015, 35(6): 6-8, 73.
- [33] 王建枝, 钱睿哲. 病理生理学 [M]. 第9版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
Wang J Z, Qian R Z. *Pathophysiology* [M]. 9th Edition. Beijing: People's Health Publishing House, 2018.
- [34] López-Sendón J, Álvarez-Ortega C, Zamora Auñón P, et al. Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: The Cardiotox registry [J]. Eur Heart J, 2020, 41(18): 1720-1729.

[责任编辑 齐静雯]