

苏苏小儿止咳颗粒对幼龄大鼠的长期毒性试验研究

田义超¹, 蔡雪洲¹, 杨旭¹, 刘梦杰¹, 周文¹, 杨芸¹, 高晶¹, 陈少军², 潘经媛¹, 李继洪^{1*}

1. 湖北天勤生物科技有限公司武汉分公司, 湖北 武汉 430075

2. 武汉药谷科技开发有限公司, 湖北 武汉 430075

摘要: **目的** 对苏苏小儿止咳颗粒进行幼龄SD大鼠长期毒性试验研究, 为其提供临床前安全性评价。**方法** 苏苏小儿止咳颗粒高、中、低剂量(以生药计30、15、5 g/kg)连续ig给药30 d。观察指标包括一般观察、体质量、摄食量、行为学测试、雌二醇、睾酮、胫骨长度、尿液、血液学、凝血指标、血液生化、电解质、脏器质量、脏器系数及组织病理学检查等。**结果** 30 g/kg剂量组雄鼠给药期间出现体质量增长缓慢, 恢复期可恢复正常。其余动物未见明显药物相关毒性反应, 停药后未见迟发毒性发生。**结论** 在本试验条件下, 苏苏小儿止咳颗粒对幼龄大鼠的无毒反应剂量为15 g/kg, 相当于临床拟用剂量的22倍。

关键词: 苏苏小儿止咳颗粒; 长期毒性; 幼龄大鼠; 安全性; 儿科

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)01-0096-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.014

Research of long-term toxicity of Susu Xiao'er Zhike Granules in juvenile rats

TIAN Yichao¹, CAI Xuezhou², YANG Xu¹, LIU Mengjie¹, ZHOU Wen¹, YANG Yun¹, GAO Jing¹, CHEN Shaojun², PAN Jingyuan¹, LI Jihong¹

1. Wuhan Branch of Hubei Topgene Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, China

2. Wuhan Medicine Valley Science and Technology Development Co., Ltd., Wuhan 430075, China

Abstract: **Objective** Preclinical safety study was conducted to assess the long-term toxicity effects of Susu Xiao'er Zhike (SSXEZK) Granules in juvenile rats, and provide preclinical safety evaluation for clinic. **Methods** Daily ig administration of SSXEZK Granules at 30, 15, and 5 g/kg for 30 d was used in high, medium, and low dose groups, respectively. The long-term toxicity effects of SSXEZK Granules was determined by general observation of the animals, and monitoring the changes of their body weight, food intake, behavioral test, estradiol, testosterone, tibial length, urine, faeces, hematology, blood coagulation, blood biochemistry, electrolyte, organ weight and organ index. Histopathological examination was conducted after sacrifice. **Results** All animals had no significant toxicity and no delayed toxicity occurred after treatment with various doses, except that the body weight growth of male rats was retarded treated with 30 g/kg dose. **Conclusion** In the situation of this experiment, the NOAEL of SSXEZK Granules in rats was 15 g/kg, which was equivalent to 22 times of the suggested dose in clinical use.

Key words: Susu Xiao'er Zhike Granules; long-term toxicity; juvenile rats; safety; pediatric department

目前临床上儿科用药缺乏来源于儿科人群安全性和有效性的信息,多半是基于成年动物或成人临床试验的安全性数据,因此全面而深入地开展非临床阶段儿科用药发育毒性研究就愈显重要^[1-2]。苏苏小儿止咳颗粒来源于鄂东中医名医周容华主任医师临床经验方,为中药复方制剂,临床拟用于小儿风寒咳嗽症,临床应用近50年。小儿风寒咳嗽是临床发病率比较高的疾病,主要表现为咳嗽咳

痰,鼻塞流涕,或伴有恶寒,无汗,头身疼痛等,严重影响了小儿的健康^[3]。为了充分考察苏苏小儿止咳颗粒的临床前安全性,本研究选取幼龄SD大鼠为研究对象,并遵照药物非临床研究质量管理规范(GLP)进行实验,为其临床安全用药提供参考依据。

收稿日期: 2018-04-27

第一作者: 田义超,男,硕士,助理研究员,研究方向为新药临床前安全性评价。E-mail: tianyichao@topgenebio.com

*通信作者: 李继洪,男,研究员。研究方向为新药临床前安全性评价。E-mail: lijihong @ topgenebio.com

1 材料

1.1 药物与主要试剂

苏苏小儿止咳颗粒,批号161104,由武汉药谷科技开发有限公司提供,1 g干膏粉相当于5 g生药,方中主要药材组成为化橘红(君药)、鞘蕊苏、桔梗、紫苏叶、甘草等,1 g干膏粉含化橘红以柚皮苷计,不得少于22.0 mg。

血清生化与血液学分析相关试剂,希森美康生物科技有限公司;凝血因子分析相关试剂,美国Instrumentation Laboratory公司;电解质分析相关试剂,梅州康利高科技有限公司;尿液检测相关试剂,长春迪瑞医疗科技股份有限公司;激素相关试剂,上海源叶生物科技有限公司;戊巴比妥钠,德国Merck公司。

1.2 主要仪器

BX-3010全自动生化分析仪、XN-1000IV全自动模块式血液体液分析仪,日本SYSMEX公司;Klite8G多参数电解质分析仪,梅州康利高科技有限公司;ACL TOP300 CTS全自动凝血分析仪,西班牙沃芬公司;H800干化学尿液分析仪,长春迪瑞医疗科技股份有限公司;ASP300S全自动脱水仪、RM2235轮转切片机,德国Leica公司;MB-II全自动包埋仪,武汉赛尔思科技有限公司;BX53生物显微镜,日本Olympus公司;iMark酶标仪,美国Bio-RAD公司;JLBehv-LAG-4自发活动分析系统,上海吉量软件科技有限公司。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,体质量50~70 g,雌雄各半,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)2016-0011,实验动物使用许可证号SYXK(鄂)2016-0090。

2 方法

2.1 长期毒性试验方法

128只大鼠,按体质量随机均分为苏苏小儿止咳颗粒高、中、低剂量(生药剂量30、15、5 g/kg,相当于临床拟用剂量的45、22、7倍)组,对照组(给予等体积超纯水),每组32只,雌雄各半。给药体积为10 mL/kg,每天给药1次,连续给药30 d,停药恢复28 d。试验期间观察大鼠临床症状、摄食量和体质量等。分别在给药结束前后(每组20只)与恢复期结束前后(每组12只)检测大鼠行为学能力、胫骨长度、雌二醇(E₂)、睾酮(T)、尿液学、血液学、凝血时间、血清生化与电解质、脏器质量及系数,并进行组织病理学检查。

2.2 检测指标

①每日进行呼吸、运动、惊厥、反射、眼、皮毛、反应性、分泌物以及其他观察。②每周测定2次体质量。③每周测定1次摄食量。④行为学测试指标:将大鼠放入自主活动记录仪中测试记录10 min内活动次数;观察动物翻正反射落地时姿势是否正常。⑤取左侧胫骨,测量其长度。⑥取血清于酶标仪上检测E₂、T含量。⑦收集新鲜尿液观察颜色与浊度,并于尿液分析仪上检测比重、pH值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、潜血、白细胞、亚硝酸盐。⑧取血于血细胞分析仪上测定血液学指标:白细胞计数(WBC)及分类百分比(N%、L%、M%、E%、B%)、红细胞计数(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)、网织红细胞计数百分比(RET%)、血小板计数(PLT)。⑨于血凝分析仪上测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)。⑩取血分离血清于全自动生化分析仪和电解质分析仪上测定血清生化学和电解质指标:丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆红素(TBIL)、血糖(GLU)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TCH)、肌酸磷酸激酶(CK)、钠离子(Na⁺)、钾离子(K⁺)、氯离子(Cl⁻)。⑪大鼠ip 0.4%戊巴比妥钠(10 mL/kg)麻醉,放血处死后进行全面尸检,肉眼观察各组织脏器有无异常情况,称量脑、心、肝、肾、肾上腺、胸腺、脾、睾丸、附睾、卵巢、子宫,计算脏器系数,并取其脏器进行组织病理学检查。

2.3 统计学分析

使用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,然后根据方差分析结果,进行Dunnett-t检验,比较各给药组与对照组数据的差异显著性。等级资料采用非参数检验(Kruskal-Wallis H检验),总体差异有统计学显著意义时用Mann-Whitney U检验进行组间差异的比较。

3 结果

3.1 一般观察结果

给药d19中剂量组死亡1只雄性大鼠,口鼻周围可见棕褐色药液,无其他异常。其余大鼠一般状况良好,眼、口鼻和肛门等未见异常分泌物,无竖毛、尿外观异常、稀便和软便等现象出现,动物精

表1 苏苏小儿止咳颗粒对雄性大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of SSXEZK Granules on body weight of male rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		分组日	给药 d1	给药 d3	给药 d6	给药 d10	给药 d13	给药 d17
对照	—	110.0±7.1	135.4±7.9	151.8±11.8	183.1±12.4	222.9±14.6	252.8±15.5	287.4±19.1
苏苏小儿	5	110.8±6.0	130.4±6.2	145.9±8.8	175.1±9.4	214.5±10.0	241.8±10.9	274.2±15.9
止咳颗	15	109.4±8.8	131.7±8.0	144.6±9.9	174.0±10.8	211.4±13.8	241.2±15.9	275.0±18.4
粒	30	110.5±6.1	128.7±8.2*	142.0±9.3*	167.2±11.2**	206.0±15.6**	232.5±17.8**	261.2±21.5**
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		给药 d20	给药 d24	给药 d27	给药 d30	恢复 d1	恢复 d4	恢复 d8
对照	—	311.6±20.9	342.6±24.0	365.6±26.1	381.1±27.3	395.2±18.9	413.2±13.4	439.5±10.8
苏苏小儿	5	300.2±16.5	330.0±23.7	355.1±24.9	369.9±26.1	383.2±29.7	398.5±31.5	426.4±34.8
止咳颗	15	298.4±19.9	325.9±25.9	354.4±25.3	370.2±27.0	377.9±27.6	393.2±29.0	424.6±33.0
粒	30	284.6±24.8**	314.2±28.8**	334.2±27.0**	347.6±30.5**	350.4±23.6*	363.9±25.6**	388.3±26.6*
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g						
		恢复 d11	恢复 d15	恢复 d18	恢复 d22	恢复 d25	恢复 d28	
对照	—	449.7±11.2	474.8±12.6	483.1±17.1	506.8±12.6	517.8±13.0	510.7±17.0	
苏苏小儿	5	441.3±38.3	460.3±39.6	473.8±44.0	498.8±47.4	509.6±50.9	509.1±49.6	
止咳颗	15	439.6±34.6	463.0±34.8	478.4±40.0	498.4±42.5	511.4±42.4	507.3±48.6	
粒	30	403.6±28.6*	429.8±34.1	442.9±36.3	466.4±34.4	478.2±32.7	478.5±35.3	

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group
神、外观、行为和步态均无异常。

3.2 体质量变化结果

雄鼠苏苏小儿止咳颗粒高剂量组给药 d1、d3、d6、d10、d13、d17、d20、d24、d27、d30 及恢复期 d1、d4、d8、d11 体质量均显著低于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 恢复期 d15 可恢复正常; 雌鼠各剂量组各实验阶段体质量与对照组比较均无显著性差异, 结果见表 1。

3.3 摄食量变化结果

给药期间和恢复期, 各剂量组雌、雄鼠摄食量与对照组比较无显著性差异。

3.4 行为学测试结果

给药结束及恢复期, 各剂量组雌、雄鼠活动次数与对照组比较无显著性差异; 各剂量组与对照组

所有动物落地姿势均正常。

3.5 胫骨长度变化结果

给药结束及恢复期结束, 各剂量组雌鼠与雄鼠胫骨长度与对照组比较无显著性差异。

3.6 激素变化结果

给药结束, 雄鼠各剂量组血清 T 水平、雌鼠各剂量组血清 E₂ 水平与对照组比较均无显著性差异。恢复期结束, 雄鼠低、高剂量组血清 T 水平低于对照组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 雌鼠各剂量组血清 E₂ 水平与对照组比较均无显著性差异, 结果见表 2。

3.7 尿液变化结果

给药结束前及恢复期结束前, 所有收集的尿液样本外观均为正常的黄色或淡黄色的澄明液体, 雌鼠与雄鼠各剂量组尿液相关检测指标与对照组比

表2 苏苏小儿止咳颗粒对大鼠睾酮和雌二醇的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of SSXEZK Granules on T and E₂ of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	雄性大鼠血清 T/(nmol·L ⁻¹)		雌性大鼠血清 E ₂ /(pmol·L ⁻¹)	
		给药结束	恢复期结束	给药结束	恢复期结束
对照	—	4.060±1.826	5.772±1.608	32.982±6.907	38.802±3.345
苏苏小儿止	5	3.812±2.105	3.954±0.592*	34.672±8.525	39.105±2.524
咳颗粒	15	4.777±2.524	4.828±0.878	32.754±3.668	39.104±5.207
	30	5.020±1.486	3.721±0.776**	33.029±5.936	39.889±2.511

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

表3 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d结束对雄性大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of SSXEZK Granules on hematology of male rats after 30 day administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	WBC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	N/%	L/%	M/%	E/%	B/%	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)
对照	—	6.21±1.83	19.8±4.9	74.0±5.4	5.4±1.2	0.8±0.3	0.1±0.1	7.40±0.23
苏苏小儿	5	6.32±3.38	21.3±7.6	71.9±8.3	5.8±1.1	0.9±0.4	0.1±0.1	7.19±0.54
止咳颗	15	7.25±2.20	18.9±3.3	74.3±3.8	6.0±1.3	0.6±0.3	0.1±0.1	7.17±0.39
粒	30	8.22±2.54	19.2±3.7	73.7±5.6	6.5±2.0	0.5±0.2	0.1±0.1	7.25±0.50
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	HGB/ (g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/ (g·L ⁻¹)	PLT/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	RET/%
对照	—	143±9	42.0±1.9	56.9±1.7	19.4±0.8	341±7	1141±113	3.55±0.25
苏苏小儿	5	140±10	41.2±2.8	57.3±1.6	19.5±0.6	340±3	1202±159	3.98±0.42
止咳颗	15	138±5	40.9±1.2	57.1±1.9	19.2±0.6	337±4	1097±78	3.97±0.50
粒	30	141±11	41.6±2.7	57.5±0.9	19.4±0.4	337±6	1120±87	4.15±0.54*

与对照组比较:*P<0.05

*P<0.05 vs control group

表4 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d结束对雌性大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of SSXEZK Granules on hematology of female rats after 30 day administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	WBC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	N/%	L/%	M/%	E/%	B/%	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)
对照	—	4.64±1.68	14.8±3.3	78.8±3.7	5.2±1.1	1.0±0.5	0.2±0.1	6.94±0.55
苏苏小儿	5	5.76±3.13	16.6±7.2	76.7±7.7	5.6±1.6	0.9±0.5	0.2±0.1	6.96±0.29
止咳颗	15	4.68±1.82	18.5±5.2	74.0±6.4	6.3±1.6	0.9±0.4	0.2±0.2	6.82±0.38
粒	30	6.19±2.31	19.6±8.0	74.4±8.2	5.0±0.9	0.8±0.3	0.2±0.1	6.94±0.42
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/(g·L ⁻¹)	PLT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	RET/%
对照	—	132±9	39.0±2.3	56.4±2.5	19.1±0.9	339±4	1 029±158	2.61±0.63
苏苏小儿	5	135±8	39.2±1.7	56.4±1.8	19.4±0.7	344±9	1 150±139	2.67±0.23
止咳颗	15	133±7	38.5±1.9	56.4±1.3	19.6±0.5	347±4*	1 140±225	2.62±0.36
粒	30	133±5	39.0±1.6	56.3±1.7	19.2±0.8	341±5	1 173±172	2.91±0.44

表5 苏苏小儿止咳颗粒对恢复期雄性大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effect of SSXEZK Granules on hematology of male rats in convalescent period ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	WBC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	N/%	L/%	M/%	E/%	B/%	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)
对照	—	7.46±2.61	16.7±5.2	77.6±5.4	4.4±1.5	1.2±0.3	0.1±0.1	8.19±0.43
苏苏小儿止	5	6.88±3.48	24.0±14.9	70.4±15.0	4.4±0.7	1.1±0.5	0.1±0.1	8.09±0.40
咳颗粒	15	8.67±2.40	14.0±5.6	79.3±6.0	5.4±0.9	1.2±0.3	0.2±0.1	8.14±0.31
	30	6.65±2.84	22.8±4.2	71.2±5.1	4.7±1.0	1.0±0.2	0.2±0.1	7.88±0.20
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/(g·L ⁻¹)	PLT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	RET/%
对照	—	148±4	42.6±1.2	52.1±1.8	18.1±0.8	347±8	1048±98	2.98±0.52
苏苏小儿止	5	143±8	41.4±2.2	51.2±1.9	17.7±0.5	346±5	1037±123	2.70±0.32
咳颗粒	15	147±4	42.0±0.9	51.6±1.3	18.0±0.6	349±7	1080±166	2.64±0.21
	30	144±6	41.3±1.3	52.5±1.5	18.2±0.7	348±4	1031±106	2.73±0.62

表6 苏苏小儿止咳颗粒对恢复期雌性大鼠血液学的影响($\bar{x} \pm s$)Table 6 Effect of SSXEZK Granules on hematology of female rats in convalescent period ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	WBC/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)	N/%	L/%	M/%	E/%	B/%	RBC/ (10 ¹² ·L ⁻¹)
对照	—	2.90±0.66	17.8±4.3	76.6±5.0	4.5±0.8	1.0±0.3	0.1±0.2	7.47±0.39
苏苏小儿止 咳颗粒	5	3.94±1.25	19.7±4.3	75.6±4.4	3.6±1.0	1.0±0.4	0.0±0.1	7.23±0.40
	15	3.78±1.09	18.1±7.6	76.1±8.0	4.4±1.0	1.3±0.3	0.1±0.2	7.24±0.24
	30	3.13±1.51	18.8±5.1	75.1±5.6	4.8±0.2	1.2±0.5	0.1±0.2	7.19±0.39
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HGB/(g·L ⁻¹)	HCT/%	MCV/fL	MCH/pg	MCHC/(g·L ⁻¹)	PLT/(10 ⁹ ·L ⁻¹)	RET/%
对照	—	140±5	39.4±1.1	52.8±1.9	18.7±0.6	354±3	1041±208	3.06±0.79
苏苏小儿止	5	135±7	38.3±2.0	53.0±1.6	18.7±0.6	353±3	1033±75	3.28±0.67
咳颗粒	15	137±4	38.7±0.9	53.5±1.2	19.0±0.6	355±4	1037±174	2.92±0.32
	30	134±5	38.2±1.2	53.2±1.8	18.8±0.6	352±2	1030±176	3.22±0.87

较均无显著性差异。

3.8 血液学变化结果

给药结束,雄鼠高剂量组RET显著高于对照组($P<0.05$),雌鼠中剂量组MCHC显著高于对照组($P<0.05$),其他指标与对照组比较无显著性差异,结果见表3~6。

3.9 凝血变化结果

给药结束,雄鼠与雌鼠各剂量组各指标与对照组比较无显著性差异。恢复期结束,雄鼠中剂量组APTT低于对照组($P<0.05$),雌鼠各剂量组各指标与对照组比较无显著性差异,结果见表7。

3.10 血液生化和电解质变化结果

给药结束,雄鼠各剂量组各指标与对照组比较

表7 苏苏小儿止咳颗粒对大鼠凝血指标的影响($\bar{x} \pm s$)Table 7 Effect of SSXEZK Granules on blood coagulation of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	PT/s				APTT/s			
		给药结束 (雄性)	恢复期结束 (雄性)	给药结束 (雌性)	恢复期结束 (雌性)	给药结束 (雄性)	恢复期结束 (雄性)	给药结束 (雌性)	恢复期结束 (雌性)
对照	—	9.6±0.5	9.2±0.2	8.6±0.4	7.9±0.5	21.7±2.5	23.6±1.4	20.5±1.2	22.7±3.9
苏苏小儿	5	9.9±0.9	9.7±0.4	8.4±0.3	7.9±0.4	20.9±2.4	21.7±1.7	19.8±1.9	22.5±2.8
止咳颗	15	9.8±0.5	9.4±0.7	8.3±0.4	7.8±0.5	20.0±1.3	20.8±1.4*	20.5±0.9	21.9±1.7
粒	30	9.7±0.4	9.1±0.3	8.3±0.4	7.6±0.3	19.7±1.8	22.6±1.9	20.4±1.6	21.3±1.3

与对照组比较: * $P<0.05$; 给药期 $n=16$, 恢复期 $n=6$

* $P<0.05$ vs control group; $n=16$ during drug delivery period, $n=6$ during convalescence period

表8 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d结束对雄性大鼠血清生化和电解质的影响($\bar{x} \pm s$)Table 8 Effect of SSXEZK Granules on serum biochemistry and electrolyte of male rats after 30 day administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	36±5	102±15	52.38±2.62	24.97±1.57	0.54±0.31	212±42	7.21±0.77	5.2±0.5
苏苏小儿	5	36±5	94±14	51.27±2.30	24.96±0.88	0.75±0.13	210±34	7.24±0.63	5.1±0.7
止咳颗	15	33±5	99±17	49.26±3.44	24.16±1.43	0.65±0.26	214±57	7.21±0.80	5.0±0.6
粒	30	40±8	102±10	49.53±2.66	24.88±1.46	0.72±0.18	190±45	6.76±0.67	5.5±0.9
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	CHOL/ (mg·dL ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	K ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ / (mmol·L ⁻¹)	
对照	—	21.27±3.50	1.48±0.26	0.52±0.17	364±118	4.60±0.30	141±2	104±1	
苏苏小儿	5	20.92±3.04	1.52±0.13	0.46±0.12	295±78	4.72±0.41	141±1	103±1	
止咳颗	15	21.81±1.69	1.48±0.29	0.47±0.22	300±143	4.51±0.14	140±2	103±1	
粒	30	20.54±3.03	1.44±0.25	0.37±0.13	307±104	4.58±0.33	140±2	103±1	

表9 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d结束对雌性大鼠血清生化和电解质的影响($\bar{x} \pm s$)Table 9 Effect of SSXEZK Granules on serum biochemistry and electrolyte of female rats after 30 day administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	28±4	101±20	51.61±2.88	24.82±1.63	0.75±0.19	106±29	7.19±0.50	5.8±0.6
苏苏小儿	5	26±4	97±17	51.97±3.05	26.38±1.44	0.59±0.25	87±14	6.96±0.62	5.8±1.1
止咳颗	15	28±8	95±17	53.33±3.58	27.49±2.41**	0.25±0.66*	103±19	7.10±0.59	6.1±1.0
粒	30	32±7	94±18	54.04±3.27	27.60±1.61**	0.47±0.11	92±18	6.80±1.09	5.7±0.8
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	CHOL/ (mg·dL ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	K ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ / (mmol·L ⁻¹)	
对照	—	24.07±3.05	1.65±0.31	0.30±0.10	301±112	4.23±0.38	140±1	103±1	
苏苏小儿	5	21.91±2.32	1.83±0.37	0.29±0.10	304±108	4.27±0.27	140±1	103±2	
止咳颗	15	24.47±3.49	1.67±0.33	0.29±0.13	281±91	4.22±0.24	139±1*	103±1	
粒	30	21.10±3.55	1.96±0.35	0.31±0.09	252±74	4.28±0.16	139±1**	102±1	

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

表10 苏苏小儿止咳颗粒对恢复期雄性大鼠血清生化和电解质的影响($\bar{x} \pm s$)Table 10 Effect of SSXEZK Granules on serum biochemistry and electrolyte of male rats in convalescent period ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	38±6	86±11	57.00±1.80	24.58±1.11	0.66±0.31	154±26	9.55±0.80	5.5±0.6
苏苏小儿	5	42±9	84±10	56.84±3.59	24.37±1.78	0.72±0.32	142±52	9.39±1.79	6.8±1.4
止咳颗	15	38±5	85±13	57.32±1.27	24.81±0.93	0.96±0.35	132±23	9.77±0.81	6.2±0.9
粒	30	39±5	88±13	56.68±1.73	24.32±0.87	1.00±0.18	147±25	9.12±0.62	6.1±1.4
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	CHOL/ (mg·dL ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	K ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ / (mmol·L ⁻¹)	
对照	—	22.56±1.60	1.73±0.26	1.00±0.30	381±84	4.67±0.22	140±1	104±2	
苏苏小儿	5	25.01±2.75	1.70±0.38	0.57±0.39*	292±80	4.60±0.29	139±1	105±1	
止咳颗	15	23.98±1.95	1.83±0.18	0.46±0.12**	302±131	4.42±0.16	139±1	103±1	
粒	30	23.21±2.21	1.66±0.26	0.53±0.18*	245±98	4.64±0.11	140±2	104±2	

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01

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

表11 苏苏小儿止咳颗粒对恢复期雌性大鼠血清生化和电解质的影响($\bar{x} \pm s$)Table 11 Effect of SSXEZK Granules on serum biochemistry and electrolyte of female rats in convalescent period ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	TP/ (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	40±6	82±12	65.22±5.82	30.46±3.28	1.10±0.37	62±25	8.73±0.72	5.5±0.6
苏苏小儿	5	33±5	79±18	64.70±4.76	28.78±2.04	0.86±0.22	71±13	8.46±0.88	6.8±1.4
止咳颗	15	38±8	88±10	61.80±3.54	29.62±1.97	0.70±0.42	89±29	8.42±0.79	6.2±0.9
粒	30	42±13	91±16	60.45±5.22	28.39±3.54	0.91±0.14	82±27	8.73±1.28	6.1±1.4
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	CHOL/ (mg·dL ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	K ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Na ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ / (mmol·L ⁻¹)	
对照	—	28.49±2.69	1.98±0.48	0.31±0.06	244±103	4.00±0.38	141±1	106±2	
苏苏小儿	5	30.17±6.77	1.76±0.37	0.32±0.13	242±94	4.13±0.18	141±1	106±1	
止咳颗	15	27.96±3.19	1.67±0.40	0.27±0.07	218±49	4.12±0.39	140±1	105±1	
粒	30	30.14±3.49	2.00±0.35	0.24±0.05	214±53	4.10±0.22	141±1	105±1	

无显著性差异,雌鼠中、高剂量组 ALB 均高于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),中、高剂量组 Na^+ 均低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),中剂量组 TBIL 低于对照组 ($P < 0.05$)。恢复期结束,雄鼠低、中、高剂量组 TG 均低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),雌鼠各剂量组各指标与对照组比较无显著性差异,结果见表 8~11。

3.11 脏器质量及系数变化结果

给药结束,雄鼠中、高剂量组脑质量显著低于对照组 ($P < 0.05$),中、高剂量组肝脏系数显著高于对照组 ($P < 0.01$);雌鼠高剂量组肝脏质量及中、高剂量组肝脏系数均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。恢复期结束,雄鼠低剂量组肝脏及肝脏系数均显著低于对照组 ($P < 0.05, 0.01$),低剂量组脾质量显著低

于对照组,高剂量组心脏质量显著低于对照组 ($P < 0.05$),低、中剂量组脑质量显著低于对照组 ($P < 0.05$),肾系数显著高于对照组 ($P < 0.05$);雌鼠各剂量组各脏器质量及脏器系数与对照组比较均无显著性差异,结果见表 12~19。

3.12 大体剖检及组织病理学检查结果

给药 d19,中剂量组一只雄性动物给药后约 5 min 死亡,大体剖检可见动物口鼻周围棕褐色疑似药物的物质附着,双肺体积增大并呈棕褐色,双侧肾脏、肝脏呈暗红色。组织病理学检查发现气管腔内可见少量棕黄色物质,肺组织弥漫性肺泡腔内、小支气管周围及内部可见棕黄色物质。

给药结束,大体剖检未见异常,组织病理学检查各剂量组动物组织未见明显与药物相关病理改

表 12 苏苏小儿止咳颗粒给药 30 d 对雄性大鼠脏器质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 12 Effect of SSXEZK Granules on organ weight of male rats after 30 d administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器质量/g								
		肝	肾	肾上腺	脾	睾丸	附睾	心	胸腺	脑
对照	—	10.98±1.07	2.87±0.26	0.05±0.01	0.69±0.06	3.13±0.24	0.71±0.06	1.33±0.15	0.54±0.12	2.10±0.08
苏苏小儿	5	11.47±1.40	2.82±0.35	0.05±0.01	0.73±0.12	3.21±0.23	0.74±0.05	1.26±0.11	0.63±0.11	2.04±0.13
止咳颗	15	11.87±1.58	2.70±0.23	0.05±0.01	0.71±0.14	2.88±0.29	0.68±0.07	1.25±0.08	0.62±0.13	1.96±0.09*
粒	30	11.92±1.13	2.73±0.27	0.05±0.01	0.70±0.06	3.16±0.41	0.69±0.06	1.19±0.15	0.46±0.10	1.97±0.13*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表 13 苏苏小儿止咳颗粒给药 30 d 对雌性大鼠脏器质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 13 Effect of SSXEZK Granules on organ weight of female rats after 30 d administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器质量/g								
		肝	肾	肾上腺	脾	卵巢	子宫	心	胸腺	脑
对照	—	6.92±1.18	1.80±0.23	0.06±0.01	0.53±0.12	0.11±0.01	0.56±0.29	0.79±0.09	0.43±0.17	1.90±0.05
苏苏小儿	5	7.70±1.06	1.91±0.21	0.06±0.01	0.54±0.07	0.11±0.01	0.50±0.18	0.82±0.06	0.55±0.08	1.92±0.07
止咳颗	15	7.96±0.80	1.83±0.25	0.06±0.01	0.52±0.08	0.12±0.02	0.47±0.18	0.83±0.10	0.48±0.16	1.88±0.08
粒	30	8.71±1.28**	1.85±0.14	0.06±0.01	0.53±0.09	0.11±0.01	0.60±0.39	0.81±0.07	0.50±0.12	1.86±0.12

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 14 恢复期苏苏小儿止咳颗粒对雄性大鼠脏器质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 14 Effect of SSXEZK Granules on organ weight of male rats in convalescent period ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器质量/g								
		肝	肾	肾上腺	脾	睾丸	附睾	心	胸腺	脑
对照	—	17.67±1.92	3.19±0.29	0.05±0.01	0.87±0.09	3.52±0.27	11.29±0.11	1.64±0.09	0.50±0.09	2.30±0.09
苏苏小儿	5	14.60±2.37*	3.28±0.39	0.05±0.01	0.719±0.10*	3.25±0.56	1.27±0.12	1.54±0.10	0.43±0.07	2.11±0.09*
止咳颗	15	15.44±2.12	3.34±0.33	0.06±0.01	0.78±0.14	3.46±0.27	1.29±0.10	1.56±0.12	0.43±0.10	2.06±0.12*
粒	30	14.79±1.63	3.24±0.35	0.06±0.01	0.77±0.09	3.48±0.40	1.27±0.09	1.45±0.10*	0.45±0.09	2.17±0.16

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表15 恢复期苏苏小儿止咳颗粒对雌性大鼠脏器质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 15 Effect of SSXEZK Granules on organ weight of female rats in convalescent preiod ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器质量/g								
		肝	肾	肾上腺	脾	卵巢	子宫	心	胸腺	脑
对照	—	8.36±0.54	1.86±0.12	0.07±0.01	0.57±0.08	0.14±0.04	0.62±0.18	1.03±0.05	0.36±0.10	1.92±0.10
苏苏小儿	5	8.64±1.35	1.92±0.28	0.06±0.01	0.60±0.09	0.13±0.04	0.66±0.16	0.97±0.07	0.46±0.08	1.97±0.17
止咳颗	15	8.43±1.09	1.88±0.12	0.07±0.01	0.55±0.04	0.13±0.03	0.60±0.18	0.98±0.11	0.43±0.09	1.98±0.14
粒	30	8.25±1.00	1.97±0.25	0.08±0.02	0.53±0.10	0.14±0.02	0.62±0.23	0.95±0.12	0.37±0.08	1.98±0.06

表16 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d对雄性大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 16 Effect of SSXEZK Granules on organ index of male rats after 30 d administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器系数/(g·g ⁻¹ ×10 ⁻²)								
		肝	肾	肾上腺	脾	睾丸	附睾	心	胸腺	脑
对照	—	3.17±0.19	0.83±0.07	0.01±0.00	0.20±0.02	0.91±0.07	0.20±0.02	0.38±0.03	0.16±0.03	0.61±0.04
苏苏小儿	5	3.34±0.23	0.82±0.06	0.01±0.00	0.21±0.04	0.94±0.07	0.22±0.02	0.37±0.02	0.18±0.03	0.60±0.04
止咳颗	15	3.50±0.30**	0.80±0.05	0.01±0.00	0.21±0.03	0.85±0.08	0.20±0.03	0.37±0.02	0.18±0.03	0.58±0.04
粒	30	3.73±0.15**	0.85±0.05	0.01±0.00	0.22±0.02	0.99±0.10	0.22±0.02	0.37±0.03	0.14±0.04	0.62±0.05

与对照组比较:**P<0.01

**P<0.01 vs control group

表17 苏苏小儿止咳颗粒给药30 d对雌性大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 17 Effect of SSXEZK Granules on organ index of female rats after 30 d administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器系数/(g·g ⁻¹ ×10 ⁻²)								
		肝	肾	肾上腺	脾	卵巢	子宫	心	胸腺	脑
对照	—	3.25±0.36	0.85±0.07	0.03±0.01	0.25±0.04	0.05±0.01	0.27±0.14	0.37±0.03	0.20±0.08	0.90±0.06
苏苏小儿	5	3.46±0.33	0.86±0.08	0.02±0.01	0.24±0.03	0.05±0.00	0.22±0.08	0.37±0.02	0.25±0.04	0.87±0.04
止咳颗	15	3.69±0.23**	0.85±0.09	0.03±0.01	0.24±0.04	0.06±0.01	0.22±0.09	0.38±0.03	0.22±0.07	0.87±0.03
粒	30	4.08±0.34**	0.87±0.08	0.03±0.00	0.25±0.03	0.05±0.01	0.28±0.16	0.38±0.03	0.23±0.04	0.88±0.08

与对照组比较:**P<0.01

**P<0.01 vs control group

表18 恢复期苏苏小儿止咳颗粒对雄性大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 18 Effect of SSXEZK Granules on organ index of male rats in convalescent preiod ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器系数/(g·g ⁻¹ ×10 ⁻²)								
		肝	肾	肾上腺	脾	睾丸	附睾	心	胸腺	脑
对照	—	3.46±0.28	0.63±0.06	0.01±0.00	0.17±0.02	0.69±0.06	0.25±0.02	0.32±0.02	0.10±0.02	0.45±0.02
苏苏小儿	5	2.98±0.23**	0.67±0.04	0.01±0.00	0.15±0.03	0.66±0.07	0.26±0.03	0.32±0.03	0.09±0.02	0.44±0.05
止咳颗	15	3.15±0.24	0.68±0.03	0.01±0.00	0.16±0.03	0.71±0.06	0.26±0.02	0.32±0.02	0.09±0.01	0.42±0.02
粒	30	3.21±0.24	0.70±0.05*	0.01±0.00	0.17±0.01	0.76±0.05	0.28±0.02	0.32±0.01	0.10±0.02	0.47±0.03

与对照组比较:*P<0.05 **P<0.01

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

变;恢复期结束,各剂量组动物亦未见明显与药物相关病理改变及延迟性病理改变。

4 讨论

幼年动物毒理学试验设计应考虑试验中动物发育阶段与拟用儿童人群相当^[4-7],苏苏小儿止咳颗粒临床拟用人群为6岁以上儿童,购入动物为离乳

后3周的大鼠,适应性饲养1周后开始给药,此时动物年龄基本与临床拟用儿童年龄相当。

关于儿科用药临床前安全性评价检测指标的考虑,除设计一般检测指标,如临床体征、体质量、临床病理等,还应包括一些评价中枢神经系统发育和功能,以及生殖发育和功能的指标^[8-10]。本研究参

表19 恢复期苏苏小儿止咳颗粒对雌性大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s$)Table 19 Effect of SSXEZK Granules on organ index of female rats in convalescent preiod ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	脏器系数/(g·g ⁻¹ ×10 ⁻²)								
		肝	肾	肾上腺	脾	卵巢	子宫	心	胸腺	脑
对照	—	3.06±0.15	0.68±0.05	0.02±0.00	0.21±0.03	0.05±0.02	0.23±0.07	0.38±0.02	0.13±0.02	0.70±0.05
苏苏小儿	5	3.15±0.36	0.70±0.05	0.02±0.00	0.22±0.02	0.05±0.01	0.24±0.06	0.35±0.03	0.17±0.02	0.72±0.05
止咳颗	15	3.09±0.23	0.69±0.04	0.03±0.00	0.20±0.02	0.05±0.01	0.22±0.06	0.36±0.02	0.16±0.03	0.73±0.06
粒	30	3.10±0.21	0.74±0.05	0.03±0.00	0.20±0.03	0.05±0.01	0.23±0.07	0.36±0.03	0.14±0.02	0.75±0.06

考《药物重复给药毒性试验技术指导原则》,同时考虑对大鼠行为学指标、胫骨长度、雌二醇、睾酮进行检测,实验结果表明大鼠重复ig给予苏苏小儿止咳颗粒对大鼠行为学指标、胫骨长度、雌二醇无影响。恢复期结束,雄鼠5 g/kg、30 g/kg睾酮与对照组虽有统计学意义,但无剂量相关性,且绝对值相差不大,对个体数据分析认为该变化与药物延迟毒性无关。

给药d19,15 g/kg剂量组1只雄鼠死亡,结合大体剖检及组织病理学检查,判断动物死亡原因为ig操作失误引起急性呼吸衰竭,与药物毒性无关。30 g/kg雄鼠在给药期会出现体质量增长缓慢,但可恢复,考虑摄食量与对照组比较并无下降,推测该变化与药物相关。给药结束或恢复期结束,个别剂量组血液学、凝血指标、血清生化、电解质、脏器质量及系数个别指标与对照组比较偶见统计学差异,但均在背景值范围内,或无明显的剂量相关性,且相关脏器组织也未见明显异常改变,这些变化无毒理学评价意义。给药结束,雌鼠15 g/kg、30 g/kg肝脏质量分别增加了15.0%、25.8%,脏器系数分别增加了13.6%、25.6%,但结合血清生化未发现ALT、AST等相关指标异常,及组织病理学也未见明显与给药相关的肝脏异常变化,该变化无毒理学评价意义。

2017年国家食品药品监督管理总局药品审评中心颁布了《儿科用药非临床安全性研究技术指导原则(征求意见稿)》,对儿科用药非临床安全性评价研究方案的设计提供了参考依据。本实验为征求意见稿颁布之前进行,故在设计上存在一些不足,如缺少生长激素、免疫球蛋白G,学习记忆等指标的检测。但部分未检测指标,如生长激素,可以通过胫骨长度和激素水平反映受试物对大鼠生长并无影响。故从实验设计整体分析,部分检测指标的缺少可能不会影响实验结果的判断。

连续30 d ig给予苏苏小儿止咳颗粒(30、15、5

g/kg)后,30 g/kg雄性大鼠体质量增长缓慢,恢复期可恢复正常。15 g/kg、5 g/kg未见明显与药物相关毒性反应,提示苏苏小儿止咳颗粒对SD大鼠的无毒反应剂量为15 g/kg,相当于临床拟用剂量的22倍。

参考文献

- [1] 周莉,孙祖越.儿科用药发育毒性研究指标设定及中药安全性评价的特别关注点[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(1):21-28.
- [2] 井潇,高杰,吴纯启,等.儿童药物安全性评价研究进展[J].国际药学研究杂志,2016,43(4):608-614.
- [3] 白金山,见国繁,付国兵,等.特定穴推拿配合艾灸治疗小儿风寒咳嗽经验[J].环球中医药,2016,9(7):854-855.
- [4] 黄芳华,朱飞鹏,笪红远,等.中药儿科用药非临床安全性评价的一般考虑[J].中国新药杂志,2015,24(24):2779-2781.
- [5] 黄芳华,王庆利,Jim Ridings.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,2016,25(18):2052-2058.
- [6] 胡晓敏,王庆利,孙涛.儿童用药的非临床安全性评价研究和案例[J].中国临床药理学杂志,2014,30(9):836-837.
- [7] 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.
- [8] 孙祖越,周莉,韩玲.儿科用药非临床安全性评价要则及中药评价的特殊性[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(1):13-20.
- [9] 孙祖越,周莉.儿科用药非临床安全性评价中方案设计的策略[J].中国新药杂志,2016,25(21):2473-2482.
- [10] 光红梅,王庆利.FDA儿科药品的非临床安全性评价指导原则简介[J].中国新药杂志,2015,24(6):627-631.