

盐酸椒苯酮胺对大鼠和Beagle犬的急性毒性实验研究[△]

李健^{1*}, 李茹冰^{1#}, 张强¹, 陈新¹, 尹雁¹, 朱晋辉², 樊鸿浩², 邓乐君², 付岩霖³, 李伟达⁴(1.广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010; 2.南方医科大学, 广州 510515; 3.广州市众为生物技术有限公司, 广州 510663; 4.广东药学院中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R965;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1315-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.06

摘要 目的:观察盐酸椒苯酮胺(PPTA)对大鼠和Beagle犬的急性毒性反应,计算最大给药量并评价其安全性。方法:对SD大鼠分别ig和iv给药,单次剂量为50 mg/kg,间隔4~6 h,连续3次,总剂量为150 mg/kg,给药后连续14 d观察PPTA给药组($n=40$)和溶剂对照组($n=20$)大鼠毒性反应及体质量等。对Beagle犬单次ivgtt PPTA最大给药剂量200 mg/kg,给药后连续14 d观察PPTA给药组($n=4$)和溶剂对照组($n=3$)Beagle犬的一般生理指标、体质量、体温、心电图指标、血压、血浆电解质、尿液、眼科和病理学指标等。结果:大鼠经ig给药后未见明显异常表现,但iv给药数分钟内出现一过性的行动不稳,连续观察14 d均未见异常情况;给药组大鼠体质量均增长正常。Beagle犬给药过程出现一过性结膜充血、恶心呕吐、流涎、眼睑轻微水肿和后肢无力,有1只出现膀胱出血致尿血的现象;给药后14 d内给药组犬体质量与体温变化情况与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),其他各项指标均未观察毒性反应相关的异常改变。结论:大鼠ig和iv给予PPTA的半数致死量(LD₅₀)值均大于150 mg/kg;Beagle犬单次ivgtt给予PPTA 200 mg/kg未导致犬死亡,给药后所出现的异常体征为该药的毒副作用,膀胱出血等可能是该药主要的毒性反应。

关键词 盐酸椒苯酮胺;急性毒性;大鼠;Beagle犬;最大给药量

Experimental Study on Acute Toxicity of Piperphentonamine Hydrochloride in Rats and Beagle Dogs

LI Jian¹, LI Rubing¹, ZHANG Qiang¹, CHEN Xin¹, YIN Yan¹, ZHU Jinhui², FAN Honghao², DENG Lejun², FU Yanlin³, LI Weida⁴(1.Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 2.Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3.Guangzhou Zongwei Biotechnology Company Limited, Guangzhou 510663, China; 4.College of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate acute toxicity of piperphentonamine hydrochloride (PPTA) in rats and Beagle dogs, and to calculate maximum dosage and evaluate its safety. METHODS: SD rats were given relevant medicine via ig or iv, at a single dose of 50 mg/kg, every 4-6 h, for consecutive 3 times, 150 mg/kg in total; after 14 d treatment, the toxicity reaction and body weight of rats were observed in PPTA group ($n=40$) and solvent control group ($n=20$). Beagle dogs were given PPTA ivgtt, at maximal single dose of 200 mg/kg; after 14 d of treatment, Beagle dogs of PPTA group ($n=4$) and solvent control group ($n=3$) were observed in respects of general physiological index, body weight, body temperature, ECG index, blood pressure, plasma electrolyte, urine, ophthalmology and pathological index, etc. RESULTS: There was no obvious abnormality in rats after ig administration of PPTA. One-off action instability occurred after iv within minutes; no abnormality was found for 14 days; the increase of body weight of rats in treatment groups was normal. Transient conjunctival congestion, nausea and vomiting, salivation, mild edema eyelids and rear limb weakness were observed in Beagle dogs during dosing; only one Beagle dog suffered from hematuria caused by hemorrhage of bladder. 14 d after medication, there was no statistical significance in body weight and temperature of Beagle dogs between treatment groups and solvent control group ($P>0.05$). No abnormal changes due to drug toxicity reaction were observed. CONCLUSIONS: LD₅₀ values of PPTA in rats via ig and iv are over 150 mg/kg. Beagle dogs did not die at the single dose of 200 mg/kg PPTA, ivgtt. The abnormal signs of animals may be the side effects of PPTA. The main toxic reaction of PPTA may be hemorrhage of bladder and other.

KEYWORDS Piperphentonamine hydrochloride; Acute toxicity; Rats; Beagle dogs; Maximal dose

盐酸椒苯酮胺(Piperphentonamine hydrochloride, PPTA)是我国自主研发的新型钙增敏剂类强心药及心肌保护剂^[1],在临床上拟用于心衰和心肌缺血再灌注损伤的治疗。其能够改善心肌供血,增加心肌收缩力;能够增加心肌收缩蛋白对钙离

子的敏感性,但不增加心肌细胞内钙离子浓度^[2];不抑制钠-钾-ATP酶与磷酸二酯酶(PDE),不增加心肌环腺苷酸(cAMP)含量;可通过开放血管平滑肌细胞钙敏感钾离子通道产生舒张血管作用;对缺血及缺血再灌注损伤心肌有良好的保护作用,同时增强心功能降低心肌耗氧量;增加清除自由基的能力,改善心肌能量代谢,对抗细胞内钙超载,从而发挥保护缺血再灌注心肌作用^[3];该药代谢快,不在体内蓄积^[4-5]。为评价PPTA的安全性,指导临床用药,笔者采用大鼠和Beagle犬进行了该药的急性毒性实验。在新药研发过程中,药理毒理研究早期阶段,急性毒性实验所获得的信息具有重要意义^[6-7]。最大给药量实验是在合理的给药浓度及合理的给药容量的条

△ 基金项目:广东省教育部产学研结合项目(No. 2012B091100-170);广东省科技计划项目(广东省重大科技专项)(No. 2012A08020-4010);广州市科技计划项目(No. 201509010012)

* 副主任医师,硕士生导师。研究方向:药理研究、药事管理。电话:020-88654477。E-mail:lrb90927@126.com

通信作者:主任技师,硕士生导师。研究方向:新药研发。电话:020-88654185。E-mail:ljdengwalk@163.com

件下,以允许的最大剂量给予实验动物,观察动物出现的反应^[9]。在本实验中,笔者进一步考察了PPTA的最大给药量和剂量安全有效范围,旨在为制订该药的临床使用和临床毒副反应的监测方案提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

AVL-9130 钠钾氯分析仪(瑞士AVL医疗仪器公司);6511型心电图仪(上海光电医用电子仪器有限公司);EW 277电子血压计(日本松下电器公司)。

1.2 药品、对照品与试剂

PPTA(中国医学科学院药物研究所药物化学室合成,批号:2001801、2001803,纯度:均大于99.8%;大鼠给药时用5%葡萄糖溶液超声振荡溶解,以盐酸调节pH至3.0,使其质量浓度为2.5 mg/ml;Beagle犬给药时的质量浓度为2.0 mg/ml;均临用现配);各种试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD大鼠,60只,♀♂各半,体质量为160~200 g,由解放军总医院医学实验动物中心提供,合格证号为SCXK11-00-0002。Beagle犬,7只,♂,体质量为8~10 kg,由解放军总医院医学实验动物中心提供,合格证号为SCXK-(军)-2002-001。上述动物均由获得资格认可的人员饲养。动物房挂温湿度计,每天早上8:30-9:00测定记录1次。室温控制在(23±5)℃,湿度(50±20)%,12 h照明、12 h黑暗。每天清洁笼子1次。

2 方法

2.1 动物分组及给药^[9]

大鼠和Beagle犬的急性毒性实验中均设给药组和溶剂对照组。在大鼠急性毒性实验中,取SD大鼠60只,♀♂各半,分为给药组大鼠40只、溶剂对照组大鼠20只。PPTA质量浓度为2.5 mg/ml,pH 3.0的5%葡萄糖溶液为对照溶剂。给药组大鼠分别ig和iv PPTA,单次给药剂量均为50 mg/kg,间隔4~6 h,连续3次;溶剂对照组给予等体积溶剂。在Beagle犬急性毒性实验中,取7只犬随机分为2组,编号,分为给药组4只、溶剂对照组3只。给药组一次性ivgtt PPTA 200 mg/kg,滴注液量为100 ml/kg,质量浓度为2.0 mg/ml;溶剂对照组给予pH 3.0的5%葡萄糖溶液,滴注液量为100 ml/kg。

2.2 指标观察^[10]

大鼠急性毒性实验中的给药当天,尤其在给药后数小时内严密观察并记录大鼠情况,然后每天上、下午各1次,连续观察14 d。详细记录大鼠的毒性反应及死亡情况;定期称体质量,对死亡大鼠及时进行尸检。Beagle犬急性毒性实验的输液过程中密切观察并记录Beagle犬的一般生理指标,给药当天观测心电图(标准II导联)、血压和呼吸、血浆电解质、尿液生化指标;给药当天及给药后第7天和15天测体质量、体温;给药后每天观察2次Beagle犬的精神状况、行为活动、皮肤、被毛、体表黏膜、注射部位和食量,观察是否出现恶心呕吐、腹泻等;给药后每天进行眼科检查。详细记录Beagle犬的毒性反应及死亡情况;对死亡或出现严重毒性反应的Beagle犬进行系统尸检,对尸检发现病变的组织进行病理组织学检查。

2.3 统计学方法

组间比较选择两独立样本t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠的急性毒性

ig给药后大鼠未见明显异常表现,连续观察14 d也未见异常表现。ig给药组大鼠体质量增长正常,与溶剂对照组体质量

比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。iv给药后大鼠主要表现为行动不稳,肢体颤动、抽动,上述症状一般出现在给药数分钟之内,10 min后恢复正常;连续观察14 d未见其他异常表现。iv给药组大鼠体质量增长正常,但给药组♀性大鼠体质量与溶剂对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。给药组和溶剂对照组实验期间均无大鼠死亡,实验结束后所有大鼠处死时剖检均未见异常。以上结果表明,PPTA对大鼠体质量无明显影响,不同方式给药后各组大鼠体质量测定结果见表1、表2。

表1 PPTA经ig给药后各组大鼠体质量测定结果($\bar{x} \pm s, g$)

Tab 1 Body weight results of rats after ig administration of PPTA($\bar{x} \pm s, g$)

组别	性别	n	给药后时间				
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d
溶剂对照组	♂	5	198.06±13.39	213.94±15.91	241.48±14.96	253.22±15.47	301.78±22.59
	♀	5	166.96±16.49	170.42±14.98	182.54±15.40	184.10±14.64	201.46±15.89
给药组	♂	10	194.40±10.51	209.01±11.56	235.60±13.97	250.03±15.88	300.59±18.67
	♀	10	164.56±14.97	167.65±14.72	181.19±16.80	182.78±17.40	203.36±21.56

表2 PPTA经iv给药后各组大鼠体质量测定结果($\bar{x} \pm s, g$)

Tab 2 Body weight results of rats after iv administration of PPTA($\bar{x} \pm s, g$)

组别	性别	n	给药后时间				
			0 d	2 d	4 d	7 d	14 d
溶剂对照组	♂	5	186.70±6.77	200.12±12.55	219.56±11.28	249.64±11.78	289.98±8.14
	♀	5	163.12±5.96	179.18±6.44	179.96±6.66	191.38±9.10	207.64±13.98
给药组	♂	10	174.98±9.16	197.05±13.05	210.58±13.68	237.88±14.07	256.10±15.72
	♀	10	171.44±6.97	189.26±6.48*	192.20±7.94*	204.23±6.94*	217.35±9.18*

注:与溶剂对照组比较,* $P < 0.01$

Note:vs. solvent control group,* $P < 0.01$

3.2 Beagle犬的急性毒性

3.2.1 一般状态 4只给予200 mg/kg PPTA的Beagle犬在输注过程中精神不振,其中2只还相继出现结膜充血、恶心呕吐、流涎、眼睑轻微水肿和后肢无力现象,输液结束后逐渐恢复。实验期间Beagle犬摄食正常,无死亡。

3.2.2 体温、体质量 实验期间两组Beagle犬体质量增长正常,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),表明PPTA对Beagle犬体质量无显著影响。两组Beagle犬的体温均波动在正常范围之内,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表3、表4。

表3 PPTA经ivgtt单次给药后各组Beagle犬体质量变化测定结果($\bar{x} \pm s, g$)

Tab 3 Body weight change of Beagle dogs after single ivgtt administration of PPTA($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	检查时间	
		d_{0-7}	d_{7-15}
溶剂对照组	3	0.2±0.1	0.4±0
给药组	4	0.2±0.2	0.3±0.1

表4 PPTA经ivgtt单次给药后各组Beagle犬体温测定结果($\bar{x} \pm s, ^\circ C$)

Tab 4 Body temperature of Beagle dogs after single ivgtt administration of PPTA($\bar{x} \pm s, ^\circ C$)

组别	n	检查时间		
		d_0	d_7	d_{15}
溶剂对照组	3	38.9±0.1	39.1±0.1	39.1±0.3
给药组	4	39.1±0.2	38.9±0	38.9±0.3

3.2.3 心电图检查 两组Beagle犬给药期间心电图测定结果显示,给药组Beagle犬的各项指标与溶剂对照组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),表明PPTA对Beagle犬的心率

(HR)、PR间期、QRS时限和QT间期无明显影响,详见表5。

表5 PPTA经ivgtt单次给药后各组Beagle犬心电图测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 ECG examination results of Beagle dogs after single ivgtt administration of PPTA($\bar{x} \pm s$)

测定时间(给药后,h)	组别	n	HR,次/min	PR,s	QRS,s	QT,s
0	溶剂对照组	3	151±22	0.08±0.01	0.06±0.01	0.19±0.02
	给药组	4	164±36	0.08±0.01	0.06±0.01	0.18±0.01
0.5	溶剂对照组	3	151±12	0.08±0	0.06±0.01	0.18±0.01
	给药组	4	155±42	0.07±0	0.06±0.01	0.18±0.01
1	溶剂对照组	3	146±14	0.08±0	0.06±0.01	0.19±0.02
	给药组	4	187±16	0.08±0.01	0.05±0.01	0.18±0.01
4	溶剂对照组	3	147±15	0.08±0	0.06±0.01	0.19±0.02
	给药组	4	174±31	0.07±0	0.06±0	0.18±0.01
8	溶剂对照组	3	164±17	0.08±0.01	0.06±0.01	0.19±0.02
	给药组	4	154±16	0.07±0	0.06±0.01	0.19±0.01

3.2.4 血压指标 两组Beagle犬给药期间血压测量结果显示,给药组Beagle犬的各项指标与溶剂对照组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),表明PPTA对Beagle犬的血压无明显影响,详见表6。

表6 PPTA经ivgtt单次给药后各组Beagle犬血压测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 6 Blood pressure results of Beagle dogs after single ivgtt administration of PPTA($\bar{x} \pm s$)

测定时间(给药后,h)	组别	n	收缩压,kPa	舒张压,kPa
0	溶剂对照组	3	18.5±0.4	11.5±0.9
	给药组	4	19.0±1.2	10.6±0.5
0.5	溶剂对照组	3	18.2±0.6	10.6±1.8
	给药组	4	18.5±0.7	10.6±0.4
1	溶剂对照组	3	16.9±1.0	10.2±1.2
	给药组	4	18.5±1.0	9.6±0.7
4	溶剂对照组	3	18.2±0.7	10.8±0.4
	给药组	4	17.5±0.9	10.0±0.5
8	溶剂对照组	3	18.6±0.6	10.9±0.7
	给药组	4	17.9±1.6	10.5±0.5
24	溶剂对照组	3	18.3±1.1	10.6±1.2
	给药组	4	19.3±0.6	10.4±1.0

3.2.5 血浆电解质检查 两组Beagle犬给药期间血浆电解质测定结果显示,给药组Beagle犬的电解质浓度与溶剂对照组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$),表明PPTA对Beagle犬的血浆电解质水平无明显影响,详见表7。

表7 PPTA经ivgtt单次给药后各组Beagle犬血浆电解质测定结果($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

Tab 7 Plasma electrolyte results of Beagle dogs after single ivgtt administration of PPTA($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

测定时间(给药后,h)	组别	n	钠离子	钾离子	氯离子
0	溶剂对照组	3	143±3	4.3±0.5	101±2
	给药组	4	143±1	4.5±0.4	101±3
4	溶剂对照组	3	138±2	4.5±0.8	99±1
	给药组	4	136±3	4.0±0.1	96±4
8	溶剂对照组	3	137±2	4.7±0.2	98±2
	给药组	4	133±6	4.2±0.6	97±7
24	溶剂对照组	3	142±3	4.6±0.5	100±3
	给药组	4	145±1	4.9±0.3	101±2

3.2.6 尿液检查 给药后2~15 d,1只Beagle犬在给药后第2天发现血尿,此后3 d均检查出尿液潜血,至第7天恢复正常。其他Beagle犬均未发现异常反应。

3.2.7 眼科检查 溶剂对照组的1只Beagle犬和给药组的2只Beagle犬在输注过程中可见结膜充血,但用直接检眼镜检

查,未见眼底血管有明显扩张趋势,输液结束后恢复正常。未发现虹膜、瞳孔和晶体等有异常改变。

3.2.8 病理组织学检查 给药组1只Beagle犬膀胱内面黏膜上皮可见散在的陈旧性出血点,直径约0.1~0.2 cm,范围局限表浅,周围无红色晕斑;其他脏器未见异常。经观察尿血和潜血阳性为膀胱出血所致。

4 讨论

PPTA是我国自主研发的钙增敏剂类强心药及心肌保护剂,具有完全自主知识产权。已完成的PPTA的致畸敏感毒性实验和致突变实验表明,其无致畸胎作用或胚胎毒性^[1],以及无致突变作用^[2]。在本次实验条件下,PPTA对大鼠急性毒性研究的2种给药途径的最大给药量均参照了预实验结果,因大鼠ig给药的预实验结果提示PPTA的半数致死量(LD₅₀)无法计算以及在大鼠静脉注射的预实验中给药累计剂量达到140 mg/kg未见动物死亡,因此设计以最大给药浓度、最大给药体积连续3次给予PPTA,最大给药量为150 mg/kg,而且2种给药途径的给药组均只设1个。实验结果表明,大鼠ig和iv PPTA的LD₅₀值均大于150 mg/kg。

在大鼠急性毒性实验中PPTA的最大剂量为150 mg/kg,无大鼠死亡,结果表明该药的安全范围较大,因此对Beagle犬进行单次给药毒性实验,剂量增加至200 mg/kg。在本次实验中,给药组和溶剂对照组均有犬在眼科检查中出现结膜充血,可能与给予大量的酸性液体有关,PPTA的扩血管作用加速了结膜充血的发生。尿液检查中给药组有1只犬出现了尿血现象,随后恢复,病理组织学检查结果表明,此现象可能是在大剂量条件下PPTA的持续扩血管作用引起的急性毒性反应。在最大剂量静脉给药的情况下,动物会出现一系列非致死性的急性毒性反应,大部分反应持续时间较短,因此解释了输液期间犬出现的短暂异常现象。尿血犬膀胱则留下了病理改变,其余的检查项目未见明显异常。在实验中膀胱出血和结膜充血可能是PPTA的主要毒性反应,提示在该实验条件下,PPTA可能有导致膀胱出血和眼部问题的危险。根据上述PPTA急性毒性反应的动物表现,推断PPTA毒性作用的靶器官主要为中枢神经系统、眼血管及膀胱等。因此,若进行下一步的长期毒性实验,观察指标除常规项目之外,应考虑重点观察动物的有关血管反应,如眼底血管、注射局部血管等。

大鼠ig和iv PPTA的LD₅₀值均大于150 mg/kg,按体表面积计算,对应的人用剂量为大于25 mg/kg,而临床研究计划人拟用剂量为0.1~1 mg/kg。因此本次实验结果提示,该药的安全范围较大。Beagle犬ivgtt急性毒性实验结果显示,单次给药200 mg/kg未导致犬死亡;药后连续观察14 d,无犬死亡。即Beagle犬ivgtt PPTA最大耐受量大于200 mg/kg,对应的人用剂量为大于100 mg/kg,为人临床研究计划拟用剂量0.1~1 mg/kg的10~100倍,进一步提示该药的安全范围大。

综上,在本实验条件下,PPTA的毒性较小,安全范围较大。本次实验为制订该药的临床用药方案提供了合理的参考资料。

参考文献

- [1] 杨向阳,李若冰,万华印.新型钙增敏剂左西孟旦和盐酸椒苯酮胺研究进展[J].国际药学研究杂志,2010,37(1):32.
- [2] 李茹冰,万华印,邓凤君,等.心血管创新药盐酸椒苯酮胺[C].中国药理学学会药监专业委员会第一届第四次学术研讨会论文摘要汇编.北京:中国药理学学会,2008:44.
- [3] 范礼理,滕健,张润东,等.羟苯氨酮保护大鼠心脏对抗心肌缺血-再灌注损伤[J].药学学报,2005,40(6):507.
- [4] 牟英,孟志云,窦桂芳.椒苯酮胺在比格犬体内的药代动力学研究[J].中国血液流变学杂志,2006,16(3):338.

梓醇对成骨细胞-破骨细胞共育体系中破骨细胞活性、凋亡的影响及其机制研究^Δ

赖满香^{1*}, 陈侠¹, 冯娟¹, 何丽霞², 杨丽^{2#} (1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 暨南大学药学院, 广州 510560)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1318-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.07

摘要 目的: 研究中药单体梓醇在成骨细胞(OB)-破骨细胞(OC)共育体系中对OC活性、凋亡的影响及其作用机制。方法: 分别选用1~3 d龄和5~7 d龄SD乳鼠分离培养OB和OC, 建立OB-OC共育体系。通过倒置显微镜观察0(空白对照)、0.05、0.5、5、50、100 mg/L梓醇培养48、72、96 h后OC的骨吸收陷窝数目, 以反映OC活性; 以0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇培养细胞48、72、96 h, 检测OC中抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性, 计算OC的凋亡率; 以0(空白对照)、0.05 mg/L梓醇培养细胞并检测OB中骨保护素(OPG) mRNA的表达。结果: 在OB-OC共育体系中, 0.05~50 mg/L梓醇作用下所形成骨吸收陷窝数目显著低于空白对照($P < 0.01$), 表明梓醇可抑制OC活性, 其中质量浓度为0.05 mg/L时作用最明显。与空白对照比较, 0.05 mg/L梓醇作用后OC中TRACP的活性降低、OC的凋亡率升高($P < 0.05$); OB的OPG mRNA表达上调($P < 0.01$)。结论: 在OB-OC共育体系中, 梓醇可抑制OC活性、诱导OC凋亡, 其机制可能与上调OB的OPG mRNA表达有关。

关键词 梓醇; 成骨细胞; 破骨细胞; 共育体系; 活性; 凋亡

Effect of Catalpol on the Activity and Apoptosis of Osteoclast in the Osteoblasts-osteoclasts Co-culture System and Its Mechanism Study

LAI Manxiang¹, CHEN Xia¹, FENG Juan¹, HE Lixia², YANG Li² (1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510560, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of catalpol on the activity and apoptosis of osteoclasts (OC) in the osteoblasts (OB)-OC co-culture system and its mechanism. METHODS: OB and OC were isolated respectively from the SD rats of 1-3 days and 5-7 days old to establish OB-OC co-culture system. After treated with 0 (blank control), 0.05, 0.5, 5, 50 and 100 mg/L catalpol for 48, 72 and 96 h, the number of bone absorption lacuna for OC was observed by inverted microscope to reflect OC activity. After treated with 0 (blank control) and 0.05 mg/L catalpol for 48, 72 and 96 h, the activity of tartrate resistant acid phosphatase (TRACP) in OC was detected, and the apoptosis rate of OC was calculated. After treated with 0 (blank control) and 0.05 mg/L catalpol, mRNA expression of osteoprotegerin (OPG) in OB was detected. RESULTS: In OB-OC co-culture system, the number of bone absorption lacuna in 0.05-50 mg/L catalpol groups was significantly lower than blank control group ($P < 0.01$), indicating catalpol could inhibit OC activity, especially 0.05 mg/L catalpol. Compared with blank control, 0.05 mg/L catalpol lowered the activity of TRACP but increased the apoptosis rate of OC ($P < 0.05$); mRNA expression of OPG was up-regulated in OB ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: In OB-OC co-culture system, catalpol can inhibit the activity of OC and induce the apoptosis of OC, and its mechanism may be associated with the mRNA expression up-regulation of OPG in OB.

KEYWORDS Catalpol; Osteoblasts; Osteoclasts; Co-culture system; Activity; Apoptosis

- [5] Shi A, Hu X, Li R, *et al.* Determination of piperphen-tonamine and metabolites M1 and M6 in human plasma and urine by LC/MS/MS and its application in a pharmacokinetics study in Chinese healthy volunteers[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.031.
- [6] 王庆利, 王海学, 马磊. 急性毒性试验的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(21): 2 024.

- [7] 孙世明, 何林, 吴正中, 等. 注射用阿克拉霉素 A 固体脂质纳米粒小鼠体内抗肝癌活性及急性毒性研究[J]. 中国药房, 2005, 16(18): 1 371.
- [8] 王京霞, 张琦, 陈琳. 复方大青颗粒急性毒性实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 6(24): 496.
- [9] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 201-206.
- [10] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 383-389.
- [11] 李茹冰, 李健, 吴新荣, 等. 盐酸椒苯酮胺致畸感期毒性试验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5 610.
- [12] 陈阳述, 李茹冰, 李健, 等. 盐酸椒苯酮胺致突变实验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(19): 4 747.

Δ 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(No. B2015063); 广东食品药品职业学院自然科学基金项目(No. 2014YZ003)

* 副教授, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 020-28854972。E-mail: 76702876@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 临床中药学。电话: 020-38374505。E-mail: doctormonkey@126.com

(收稿日期: 2015-07-17 修回日期: 2015-10-19)

(编辑: 刘 萍)