

甘桔冰梅片的急性毒性与长期毒性实验研究

兰艳丽^{1*},涂晓敏¹,谭正怀²,唐大轩²,葛麟²,王莉²(1.成都市第五人民医院耳鼻喉科,成都 611130;2.四川省中医药科学院药理毒理研究院,成都 610041)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2507-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.04

摘要 目的:研究甘桔冰梅片的急性毒性与长期毒性。方法:测定最大耐受量。96只SD大鼠随机均分为正常对照[等容含0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液]组与甘桔冰梅片高、中、低剂量[50.0、25.0、12.5 g(原生药)/kg]组。灌胃给药,每天1次,连续4周。观察给药4周与停药2周期间大鼠摄食量、体质量的变化;测定用药4周与停药2周后大鼠血液细胞学、生化学指标,观察大鼠器官组织病理形态学的变化。结果:最大耐受量为84.0 g(原生药)/kg。与正常对照组比较,甘桔冰梅片中、低剂量组停药2周后大鼠白细胞(WBC)减少,甘桔冰梅片低剂量组用药4周后大鼠血小板(PLT)增加,甘桔冰梅片低剂量组停药2周后大鼠尿素氮(BUN)减少,甘桔冰梅片低剂量组用药4周后大鼠血清胆红素(T-BIL)减少,甘桔冰梅片中、低剂量组大鼠用药4周后肌酸激酶同工酶(CK)增强,甘桔冰梅片中剂量组大鼠停药2周后CK增强。甘桔冰梅片高、中、低剂量组大鼠除上述指标外其余指标无明显改变($P>0.05$)。结论:甘桔冰梅片对大鼠无明显急性毒性反应,其最大耐受量为84.0 g(原生药)/kg。长期用药对大鼠蓄积性毒性较小,其安全剂量为25.0 g(原生药)/kg。

关键词 甘桔冰梅片;非临床安全性;急性毒性;长期毒性

Acute Toxicity and Long-term Toxicity Test of Ganju Bingmei Tablet

LAN Yan-li¹, TU Xiao-min¹, TAN Zheng-huai², TANG Da-xuan², GE Lin², WANG Li²(1.Dept. of E.N.T, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China; 2.Pharmacology and Toxicology Institute, Sichuan Academe of TCM, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the acute toxicity and long-term toxicity of Ganju bingmei tablet. METHODS: The maximum tolerated dose was determined.96 SD rats were randomly divided into normal control group [constant volume containing 0.5% CMC-Na] and Ganju bingmei tablet high-dose, medium-dose and low-dose groups (50.0, 25.0, 12.5 g/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 4 weeks. The changes of food intake and body weight were observed, and hematological index, blood biochemical index and pathomorphology of organs and tissue were determined after 4 weeks of treatment and 2 weeks after drug withdrawal. RESULTS: The maximum tolerated dose was 84.0 g/kg. Compared with control group, WBC of rats decreased in Ganju bingmei tablet medium-dose and low-dose groups half month after drug withdrawal; PLT of rats increased while T-BIL decreased in Ganju bingmei tablet low-dose group 4 weeks after treatment, and BUN of rats decreased 2 weeks after drug withdrawal; CK of rats increased in Ganju bingmei tablet medium-dose and low-dose groups 4 weeks after treatment, and that of rats increased in Ganju bingmei tablet medium-dose group 2 weeks after drug withdrawal. No obvious change was found in other index of Ganju bingmei tablet high-dose, medium-dose and low-dose groups except above index ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Ganju bingmei tablet has no significant acute toxicity to rats, and the maximum tolerance dose is 84.0 g/kg. The long-term toxicity scheme has less accumulative toxicity to rats, and the safe dose of Ganju Bingmei tablet is 25.0 g/kg.

KEYWORDS Ganju bingmei tablet; Non-clinical safety; Acute toxicity; Long-term toxicity

甘桔冰梅片已上市多年,处方来源于著名中医古籍《证治准绳·类方·卷二》所载的清音丸经加减化裁而成,由桔梗、薄荷、射干、青果、乌梅(去核)、蝉蜕、甘草、冰片等组成,具有疏风清热、利咽开音功效,临床多用于急性咽喉炎的治疗。药理研究表明,甘桔冰梅片能明显减轻大鼠急、慢性咽炎病变程度^[1-2],并且临床上使用甘桔冰梅片治疗咽喉炎也取得了良好的疗效^[3-10]。按照国家中药新药研发要求,笔者对甘桔冰梅片急性和长期毒性进行研究^[11],以期对甘桔冰梅片进行非临床安全性评价。

1 材料

* 副主任医师。研究方向:难治性突聋的治疗。E-mail: 644388139@qq.com

1.1 仪器

EB-3200型电子天平(日本Shimadzu公司);7020型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司);MEK-6318型血液分析仪(日本光电公司);Coa DATA 4001型血凝分析仪(德国兰波公司)。

1.2 药品与试剂

甘桔冰梅片(重庆华森制药有限公司,批号:20111023,含量:每1g相当于5.08g原生药);生化指标试剂盒(四川省迈克科技有限责任公司);血液指标测试剂盒(上海东湖生物医学有限公司)。

1.3 动物

SPF级5~6周龄SD大鼠,♀♂兼用,体质量250~280g,

由四川省中医药科学院动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(川)2005-190]。

2 方法

经预试验发现该药无法测出半数致死剂量(LD₅₀),故改为测定最大耐受量,测得大鼠的最大耐受量为84.0 g(原生药)/kg。

2.1 分组与给药

96只SD大鼠随机均分为4组,即正常对照[等容含0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液]组与甘桔冰梅片高、中、低剂量[50.0、25.0、12.5 g(原生药)/kg,分别相当临床日用量的312.5、156.3、78.1倍]组。ig给药,每天1次,连续4周。

2.2 指标的检测

逐日观察大鼠的外观、活动、毛色、饮食、粪便等情况,并根据体重调整给药量。给药4周及停药2周后进行系统检测。检测大鼠血液、细胞学和血液生化学指标,观察系统尸检与病理组织学变化。

2.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后用LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 甘桔冰梅片对大鼠摄食量的影响

与正常对照组比较,甘桔冰梅片高、中、低剂量组大鼠摄食量无明显变化($P > 0.05$)。提示各剂量甘桔冰梅片对大鼠摄食量无明显影响。甘桔冰梅片对大鼠摄食量的影响见表1。

表1 甘桔冰梅片对大鼠摄食量的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Tab 1 Effects of Ganju bingmei tablet on food intake of rats ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

测定时间	正常对照组	甘桔冰梅片低剂量组	甘桔冰梅片中剂量组	甘桔冰梅片高剂量组
用药0周	16.1±1.8	13.7±1.3	16.2±2.4	13.2±1.7
用药1周	10.9±1.3	9.7±3.1	13.4±2.0	10.2±2.9
用药2周	10.6±0.6	10.5±1.5	10.6±1.0	10.9±1.8
用药3周	9.3±0.9	8.4±1.4	8.8±1.3	8.0±0.9
用药4周	8.8±1.2	7.5±1.7	8.2±1.2	7.5±0.2
停药1周	8.5±1.8	9.0±0.6	12.2±1.3	8.7±0.7
停药2周	9.2±4.2	5.7±0.5	10.2±1.3	8.3±2.3

3.2 甘桔冰梅片对大鼠体质量的影响

与正常对照组比较,甘桔冰梅片高、中、低剂量组大鼠体质量无明显变化($P > 0.05$)。提示各剂量甘桔冰梅片对大鼠体质量无明显影响。甘桔冰梅片对大鼠体质量的影响见表2。

3.3 甘桔冰梅片对大鼠血液指标的影响

与正常对照组比较,甘桔冰梅片中、低剂量组停药2周后大鼠白细胞(WBC)减少,甘桔冰梅片低剂量组用药4周后大鼠血小板(PLT)增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。甘桔冰梅片对大鼠血液细胞学指标的影响见表3(RBC为红细胞,HGB为血红蛋白,N为大细胞在WBC中的百分比,L为小细胞在WBC中的百分比,E为嗜酸性粒细胞百分比,PT为血浆凝血酶原时间,RET为网织红细胞计数)。

3.4 甘桔冰梅片对大鼠生化指标的影响

与正常对照组比较,甘桔冰梅片低剂量组大鼠停药2周后尿素氮(BUN)减少,甘桔冰梅片低剂量组用药4周后大鼠血清胆红素(T-BIL)减少,甘桔冰梅片中、低剂量组大鼠用药4周后肌酸激酶同工酶(CK)增强,甘桔冰梅片中剂量组大鼠停药2

表2 甘桔冰梅片对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Tab 2 Effects of Ganju bingmei tablet on body weight of rats ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

测定时间	性别	正常对照组	甘桔冰梅片低剂量组	甘桔冰梅片中剂量组	甘桔冰梅片高剂量组
用药0周	♀	130.9±10.8	131.6±10.9	131.7±11.8	132.5±9.9
	♂	145.9±14.8	147.8±14.5	148.4±14.3	145.2±15.2
用药1周	♀	163.0±9.7	153.6±7.6	153.9±11.6	154.1±9.9
	♂	186.3±16.5	181.1±20.8	193.9±17.1	180.5±16.4
用药2周	♀	184.8±14.6	174.3±19.7	182.4±15.5	178.5±21.4
	♂	227.4±24.5	217.7±26.9	237.5±291.2	204.4±34.1
用药3周	♀	209.8±12.9	201.7±19.3	206.1±17.6	205.1±15.8
	♂	266.5±28.8	260.6±27.7	291.2±32.7	256.8±20.9
用药4周	♀	225.5±12.2	219.1±18.6	216.3±17.2	221.1±15.4
	♂	296.8±41.4	295.3±26.2	314.1±37.9	279.1±27.5
停药1周	♀	239.4±12.0	219.8±13.3	226.2±19.9	235.7±4.8
	♂	320.8±26.5	316.2±18.7	303.9±24.3	301.9±46.3
停药2周	♀	250.6±10.1	228.1±22.9	236.8±23.9	248.8±9.2
	♂	340.1±30.7	352.4±11.5	342.8±18.9	317.8±31.7

表3 甘桔冰梅片对大鼠血液细胞学指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 24$)

Tab 3 Effects of Ganju bingmei tablet on hematological index of rats ($\bar{x} \pm s, n = 24$)

指标	测定时间	正常对照组	甘桔冰梅片低剂量组	甘桔冰梅片中剂量组	甘桔冰梅片高剂量组
WBC, ×10 ⁹ /L	用药4周	7.6±3.4	8.7±3.2	8.6±2.9	8.9±3.6
	停药2周	12.4±3.3	8.6±2.8*	8.0±2.6**	9.5±4.5
RBC, ×10 ¹² /L	用药4周	6.8±0.5	7.0±0.5	6.8±0.5	6.4±0.5
	停药2周	7.6±0.7	7.5±0.5	7.6±0.6	7.6±0.6
HGB, g/L	用药4周	119.9±7.5	122.8±7.3	120.0±8.1	113.2±9.1
	停药2周	129.6±12.6	126.5±9.2	127.9±7.6	126.8±8.4
PLT, ×10 ⁹ /L	用药4周	253.1±60.9	297.5±43.8*	279.5±34.2	276.1±64.9
	停药2周	283.2±44.3	288.3±63.4	295.3±40.9	311.5±51.8
N, %	用药4周	20.4±5.1	19.9±7.8	20.1±3.8	20.5±4.4
	停药2周	24.7±14.7	18.9±9.2	18.3±5.3	20.7±11.9
L, %	用药4周	79.6±5.1	79.9±7.7	79.9±3.7	78.7±4.8
	停药2周	75.3±14.7	80.7±9.1	81.7±5.3	79.3±11.9
E, %	用药4周	0.1±0.3	0.1±0.4	0.1±0.3	0.1±0.3
	停药2周	0.0±0.0	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
PT, s	用药4周	13.2±2.8	12.9±1.7	14.3±3.5	12.4±0.9
	停药2周	16.3±6.7	14.4±5.3	12.2±1.6	13.3±2.3
RET, %	用药4周	1.1±0.5	1.0±0.5	1.1±0.4	1.1±0.6
	停药2周	1.0±0.4	1.0±0.7	1.4±0.8	1.2±0.5

与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

周后CK增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。甘桔冰梅片对大鼠血液生化指标的影响见表4(ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶,Cr为肌酐,TP为总蛋白,ALB为白蛋白,A/G为白蛋白和球蛋白的比值,ALP为碱性磷酸酶,Glu为血糖,TC为总胆固醇,TG为甘油三酯)。

3.5 甘桔冰梅片对大鼠器官组织病理形态的影响

给药4周及停药2周后,各组大鼠主要器官的大体标本未发现明显异常。按照国家中药新药6.1类长期毒性实验要求,取正常对照组和甘桔冰梅片高剂量组大鼠脑、小脑、脑干、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肾上腺、胸腺、子宫、卵巢、乳腺、睾丸、附睾、前列腺、垂体、脊髓、胰腺、甲状腺、甲状旁腺、唾液腺、食管、气管、主动脉、胃、小肠、腮腺、大肠、膀胱、坐骨神经、

表4 甘桔冰梅片对大鼠血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=24$)

Tab 4 Effects of Ganju bingmei tablet on blood biochemical index($\bar{x} \pm s, n=24$)

指标	测定时间	正常对照组	甘桔冰梅片低剂量组	甘桔冰梅片中剂量组	甘桔冰梅片高剂量组
ALT, U/L	用药4周	25.4±13.4	26.5±5.2	26.4±8.7	54.1±85.5
	停药2周	30.6±8.2	26.8±5.9	26.1±4.5	31.0±9.2
AST, U/L	用药4周	133.4±44.1	165.4±28.7	157.7±29.9	185.4±107.6
	停药2周	138.6±25.9	147.4±30.1	152.4±31.8	150.2±20.6
BUN, mmol/L	用药4周	6.2±1.3	5.6±1.2	5.6±1.1	5.3±1.2
	停药2周	8.5±2.6	6.3±1.3*	7.9±1.9	7.1±0.7
Cr, mol/L	用药4周	44.5±6.1	45.5±6.3	47.2±6.6	42.5±5.0
	停药2周	49.5±10.0	52.1±3.4	58.7±7.0	49.5±9.9
TP, g/L	用药4周	72.6±4.4	74.0±3.9	71.8±3.8	71.7±5.3
	停药2周	71.8±4.6	71.1±2.1	72.8±3.6	71.8±4.6
ALB, g/L	用药4周	33.1±2.8	34.3±2.5	33.7±2.3	33.5±3.2
	停药2周	33.4±3.8	33.6±3.5	35.1±1.7	34.4±2.8
A/G	用药4周	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.2	0.9±0.1
	停药2周	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1
ALP, U/L	用药4周	191.3±81.4	206.9±64.8	197.0±59.2	205.2±66.6
	停药2周	211.1±84.4	185.3±68.5	162.4±58.1	184.7±74.2
T-BIL, mg/L	用药4周	0.7±0.4	0.26±0.38*	0.49±0.49	0.9±1.6
	停药2周	0.4±0.4	0.6±0.2	0.4±0.3	0.4±0.4
Glu, mmol/L	用药4周	4.0±0.5	3.6±0.7	3.8±0.5	3.5±0.5
	停药2周	6.0±1.4	4.2±0.5	4.3±0.6	4.6±0.6
TC, mmol/L	用药4周	1.5±0.2	1.8±0.8	1.4±0.2	1.4±0.3
	停药2周	1.4±0.2	1.5±0.3	1.6±0.2	1.7±0.2
TG, mmol/L	用药4周	0.8±0.2	0.9±0.3	0.9±0.3	0.9±0.3
	停药2周	0.8±0.2	0.9±0.3	0.9±0.3	0.9±0.3
CK, U/L	用药4周	1 025.6±350.2	1 369.6±481.2*	1 499.3±448.2**	1 295.8±443.9
	停药2周	1 156.9±611.7	1 535.2±723.5	1 815.8±541.5*	1 684.5±554.8

与正常对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs. normal control group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

视神经、淋巴结、骨髓等34个器官用福尔马林固定, HE染色, 在显微镜下作病理组织学检查。结果发现, 在给药4周后甘桔冰梅片高剂量组有1只大鼠脾脏白髓淋巴组织有萎缩, 停药2周后正常对照组有1只大鼠肺有灶性肺炎、1只大鼠肝有轻度脂肪变性。提示甘桔冰梅片高剂量组经长期ig给药, 对大鼠主要器官组织无明显的病理形态学影响。

4 讨论

药品安全性需要经过动物实验(非临床安全性研究)和临床试验(临床安全性研究)进行评价, 非临床安全性研究的目的包括寻找毒性靶器官, 阐明(描述)靶器官毒性作用的性质、剂量依赖性、毒性与药物体内暴露强度的关系以及靶器官毒性的潜在可逆性。非临床安全性评价能为临床安全用药提供参考信息; 能够提示药物风险, 权衡药物的风险和效益; 是临床安全性研究的必要前提^[12]。药物毒理学评估理念从单一毒性评价向多学科综合评价转化的发展过程, 研究方法从整体实验向体外实验转化, 研究深度从器官、组织水平向分子、基因水平转化^[13]。经过多年的发展, 我国的中药和天然药物的非临床安全性评价和注册管理取得了很大的发展, 但与发达国家比较仍存在较大距离, 因此, 目前我国应客观地分析其当前存在的问题并借鉴国外植物药在该领域的可取之处, 做到扬

长避短^[14]。

本研究按照国家相关中药新药研发要求, 采用动物急性、长期毒性实验方法评价了甘桔冰梅片非临床安全性。结果显示, 急性毒性实验中无法测出该药LD₅₀, 测得大鼠的最大耐受量为84.0 g(原生药)/kg。长期毒性实验中大鼠ig甘桔冰梅片4周及停药2周后, 各剂量组大鼠的摄食量、体质量增长、血象、肝肾功未见明显改变, 对大鼠的脑、心脏、肝脏、骨髓、肺脏、肾脏等34个器官组织未见明显的病理形态学改变。血液与生化测定中, 个别指标与正常对照组比较有统计学差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 但均在正常值范围内波动, 且均无明显量效关系。提示甘桔冰梅片急性毒性实验对大鼠无明显毒性反应, 长期毒性实验对大鼠蓄积性毒性较小, 其安全剂量为25.0 g(原生药)/kg(相当临床人日用量的156.3倍)。

参考文献

- [1] 唐大轩, 葛麟, 王莉, 等. 甘桔冰梅片防治咽炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 137.
- [2] 兰艳丽, 涂晓敏, 谭正怀. 甘桔冰梅片防治急性咽炎的主要药效学研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2013, 21(4): 290.
- [3] 马金莹, 刘会清, 刘海燕. 甘桔冰梅片联合质子泵抑制剂治疗反流性咽喉炎80例[J]. 中国药业, 2012, 21(22): 90.
- [4] 史广超, 李景钊, 段天林. 甘桔冰梅片联合左氧氟沙星治疗急性化脓性扁桃腺炎的疗效观察[J]. 中国现代医药杂志, 2011, 13(10): 100.
- [5] 吕忠, 邓立波, 唐真武, 等. 手术联合甘桔冰梅片治疗声带小结临床观察[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(9): 16.
- [6] 赵晨, 于刚, 李笑天, 等. 手术结合药物治疗声带息肉临床疗效观察[J]. 中国医药导报, 2012, 9(26): 51.
- [7] 梅祥胜. 甘桔冰梅片治疗声带小结86例[J]. 中医研究, 2009, 22(5): 24.
- [8] 李海霞. 甘桔冰梅片治疗慢性咽喉炎的疗效观察[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(22): 37.
- [9] 梅祥胜. 甘桔冰梅片治疗慢性咽喉炎80例[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(5): 311.
- [10] 王治文, 袁瑞林. 甘桔冰梅片与依诺沙星联合治疗咽喉炎[J]. 中国医药指南, 2010, 8(4): 85.
- [11] 国家药品监督管理局《中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则》课题组. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[S]. 2005年.
- [12] 宋军, 赵军宁, 吴承云, 等. 中药非临床安全性评价对上市后安全性再评价作用之思考[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(12): 730.
- [13] 张晓芳, 袁伯俊, 陆国才. 药物毒理学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(24): 2 298.
- [14] 张晓东, 李连达. 从美国植物药注册实例看我国中药和天然药物非临床安全性评价[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(4): 251.

(收稿日期: 2014-03-18 修回日期: 2014-05-20)