

热炎宁合剂的非临床幼年动物毒理学研究

周晓冰^{1#}, 郭隽^{1#}, 曹兆军², 褚亚军², 霍桂桃¹, 屈哲¹, 杨莹¹, 赵婷婷¹, 王伟凡¹, 耿兴超^{1*}, 张河战^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 清华德人西安幸福制药有限公司, 西安 710043)

摘要 目的: 采用幼年动物对热炎宁合剂进行毒理学研究, 进一步为其儿科用药提供临床前安全性数据。方法: 采用10日龄SD大鼠连续36天灌胃给予热炎宁合剂, 观察主要毒性靶器官及损害的可逆程度, 评估大鼠产生的毒性反应及其严重程度。结果: 给药后动物出现棕褐色水样便, 与药物的药效作用相关; 而深黄色尿液症状可能与受试物本身性状相关。离乳前高剂量组雌、雄动物体重下降, 给药初期高剂量组雌、雄动物体重增长幅度减少; 给药结束时高剂量组雌、雄动物血红蛋白、红细胞比容降低, 雄性动物网织红细胞含量及比例升高; 给药结束时高剂量组雌性动物血清中甘油三酯含量升高; 给药组雌、雄性动物尿比重、尿酮体增加, 尿颜色加深, 雄性动物尿隐血含量增加、尿白细胞含量增加; 以上指标在恢复期结束时均可恢复。此外, 未观察到热炎宁合剂对其他指标的影响。给药组动物尿生化指标的变化并未观察到相应肾脏组织病理学的明显改变。结论: 在本试验条件下, 热炎宁合剂对幼龄动物不产生明显毒性作用的剂量为65.1 g/kg (相当于生药量)。这些结果为临床儿科剂量及毒副反应的监测提供参考依据。

关键词: 热炎宁合剂; 幼年动物; 儿科; 毒理学研究

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)09-1040-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.09.007

Toxicological Studies of Reyanning Mixture on Juvenile Animals

Zhou Xiaobing^{1#}, Guo Jun^{1#}, Cao Zhaojun², Chu Yajun², Huo Guitao¹, Qu Zhe¹, Yang Ying¹, Zhao Tingting¹, Wang Weifan¹, Geng Xingchao^{1*}, Zhang Hezhan^{1*} (1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China; 2. Tsinghua Deren Xi'an Happiness Pharmaceutical Co. Ltd., Xi'an 710043, China)

Abstract Objective: To conduct toxicological research on Reyanning mixture using juvenile animals, and provide further preclinical safety data for its pediatric use. **Methods:** 10-day-old SD rats were intragastrically administrated with Reyanning mixture for 36 consecutive days, and the main toxic target organs and the reversibility of the damage, and to evaluate the toxicity and severity of the rats. **Results:** After the administration, the animals which appeared brown watery stools, was related to the drug effect; and the symptoms of dark yellow urine might be related to the properties of the test substance. The body weights of females and males in the high-dose group were decreased before weaning, and the weight gains of females and males in the high-dose group decreased at the initial

作者简介: 周晓冰, 研究员, 博士; Tel: (010) 67872233-8004

共同第一作者: 郭隽, 副研究员, 博士; Tel: (010) 67872233-8221

通信作者: 张河战, 主任技师; Tel: (010) 67876249; E-mail: zhanghz@nifdc.org.cn

耿兴超, 研究员, 博士; Tel: (010) 67872233-8201; E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

stage of administration. The hemoglobin and hematocrit of the females and males in the high-dose group decreased at the end of the administration, and the number and proportion of reticulocytes of male animals in high-dose group increased. The serum triglyceride of the female animals in the high-dose group increased. In the administration groups, the urine specific gravity and urine ketone increased and the urine color darkened. The contents of urine occult blood and white blood cell in the male animals increased. All of the above indicators were restored at the end of the recovery period. In addition, no other abnormalities associated with the test article was found. No renal histopathological change, corresponding to the variations in the urine biochemical indexes, was observed.

Conclusion: Under current experimental conditions, no observable adverse effect level of Reyanning Mixture on juvenile animals was 65.1 g/kg (equivalent to the amount of crude drug). These results provide a reference basis for the the clinical pediatic dose design and toxic side effects monitoring.

Keywords: Reyanning Mixture; juvenile animals; pediatric; toxicological studies

近年来,随着临床儿科用药需求的增加,中药儿科用药成为药物研发的热点。由于儿科人群的特殊性,对其安全性评价应特别关注^[1-2]。开展幼龄动物的非临床安全性评价,有利于为儿科药物提供非临床安全性方面的数据资料,以支持其临床试验并为制订临床用药方案提供临床前试验资料^[3]。

急性上呼吸道感染是临床儿科疾病中最常见的一类疾病,病毒为其主要致病原。考虑到儿童免疫系统功能仍未发育完善,较成人低下,小儿上呼吸道感染常继发各种并发症,且病毒性感染后极易继发细菌感染,病情会进一步加重,因此,及时有效治疗上呼吸道感染具有十分重要的临床意义。目前,西医并无理想的抗病毒药物,而中成药在本病的缩短病程、降低并发症等方面具有优势。热炎宁合剂由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲四味中药组成,具有清热解毒之功效,对成人感冒、扁桃体炎、急性咽炎疗效显著,毒副作用小^[4]。虽然热炎宁合剂临床已有儿科应用,但尚无准确的用量用法指导,也缺乏临床前毒理学研究数据。为了进一步提供临床前安全性资料及临床用药参考,本研究对热炎宁合剂开展了幼年大鼠毒理学试验。

1 材料

1.1 受试物

受试物为热炎宁合剂临床用原液(相当于生药量1.30 g/mL),批号为20160801;其主要成分为蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲;为了评价大剂量热炎宁合剂在幼年动物的毒性,对原批号20160801热炎宁合剂进行5倍浓缩,获得相当于生药量6.51 g/mL的高浓度受试物,批号仍为20160801;均由清华德人西安幸福制药有限公司制造提供,密封,放

置阴凉处保存。对照品为去离子水。

1.2 试剂和仪器

血清生化检测试剂购自北京中生生物工程公司;免疫组化试剂包括磷酸盐缓冲液PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司)、抗大鼠 α -2u球蛋白抗体(美国R&D公司)、辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG(英国abcam公司)。

Sysmex CA-1500血凝分析仪(日本Sysmex); HITACHI 7180型自动生化分析仪(日本日立); AM-4290尿分析仪(日本京都); TEC5EMJ-2型自动包埋机(日本樱花); DRS-2000自动染色机和封片机(日本SAKURA樱花); 显微镜(日本Olympus)。

1.3 实验动物及饲养条件

本试验购入分娩后1~2日龄(Postnatal Day 1-2, PND1-2) SPF/VAF级CD(SD)大鼠及其全部子代动物,共15窝(PND2日龄10窝, PND1日龄5窝)。动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物许可证号: SCXK(京)2012-0001]。饲养至幼鼠PND9日龄时分组。PC聚碳酸酯鼠盒饲养,在检疫驯化期及试验期间离乳前为1窝/笼,离乳后为4只/笼。饲养室控制温度20~26℃,湿度40%~70%,换气次数15次/小时,12小时照明。

2 方法

2.1 动物分组及给药

PND4进行均窝调整,各窝仔鼠的均窝调整,使各窝仔鼠均为4雌和4雄。PND9进行分组,每组3窝24只仔鼠(4雌4雄/窝),采取交叉抚育设计,来自任何原始母鼠窝中的幼仔不超过1雄1雌,整个窝给予1个剂量水平,幼龄大鼠于PND21

离乳。试验共设置4个剂量组：对照组、受试物低剂量组（26 g/kg）、中剂量组（65.1 g/kg）以及高剂量组（130.2 g/kg），剂量均以相当于生药量表示。每组24只动物，雌雄各半，从PND10起，经口灌胃给药，每天下午1次，给药体积10~20 mL/kg。连续给药36天次日剖杀雌、雄各8只/组，恢复期16天次日剖杀雌、雄各4只/组。

2.2 观察指标

每天上、下午观察动物的临床症状，其中给药期间在下午给药前、给药后各观察1次，包括母鼠的养仔、授乳、做窝等行为和幼龄动物的外观及

行为方面的异常表现等；并在不同试验日期进行幼鼠生长发育指标的检查，详细检查内容见表1；同时自断乳日（PND21）起每周定时测定1次幼鼠摄食量至恢复期结束；断乳前每天1次、断乳后每周2次、恢复期每周1次称量幼鼠体重；给药结束与恢复期结束前各进行1次尿液分析和眼科检查；在给药结束和恢复期结束时各组分别解剖16和8只动物（雌雄各半），并采血进行血清生化与血液学测定，对各组动物进行大体病理学及组织病理学检查，并在给药结束时，选取每组两只雄性动物肾脏进行 α -2u球蛋白免疫组织化学分析。

表1 热炎宁合剂对幼龄大鼠生长发育影响的检测指标

项目	检查指标	检查时间
外观分化	切齿萌出	PND11、PND 14
	眼睑开裂	PND14、PND17
骨骼生长	骨密度检查	PND46、PND61
感觉与反射机能检查	角膜反射、耳介反射、疼痛反射、自由落下反射、Preyer反射、瞳孔反射检查	PND21
性成熟检查	雌性幼仔阴道开裂情况	PND35、PND42
	雄性幼仔龟头包皮腺裂开情况	PND42、PND44
行为学检查	自主运动检查	PND35

2.3 统计学分析

对于体重、进食量、血液学指标、血液凝固及血清生化检查指标、绝对脏器重量和相对脏器重量等数据均按照以下方法统计：①首先用Bartlett检验方法进行数据均一性检验，如果数据均一（检验 $P \geq 0.05$ ），则进行方差分析检验（ F 检验）；如果Bartlett检验的结果显著（ $P < 0.05$ ），则进行Kruskal-wallis检验。②如果方差分析检验结果显著（ $P < 0.05$ ），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（ $P \geq 0.05$ ），则统计结束。③如果Kruskal-wallis检验结果显著（ $P < 0.05$ ），则进一步用Dunnett非参数检验法进行多重比较检验；如果Kruskal-wallis检验结果不显著，则统计结束。其中除自主活动数据由于各组雌雄动物数较少，每组雌雄动物合并统计

外，其余数据均为雌雄分别统计。感觉与反射机能检查指标、行为学指标和性成熟检查指标则采用秩和检验分析。

3 结果

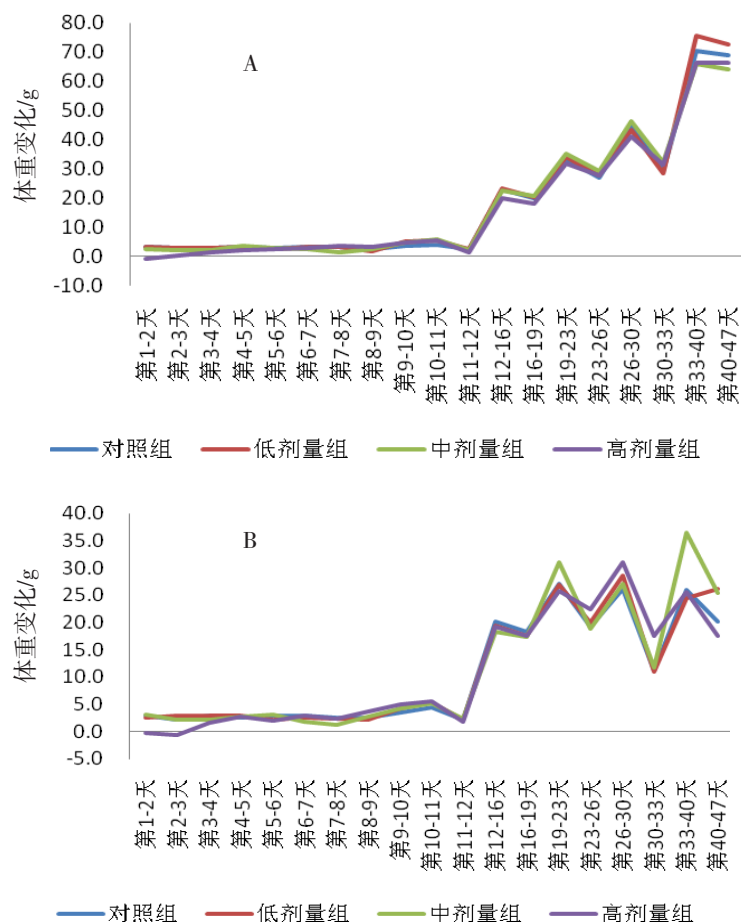
3.1 临床观察、体重与摄食量测定以及眼科检查

试验期间，受试物在给药2~9天可导致动物出现棕褐色水样便，其中低剂量仅个别动物出现1~2天棕褐色水样便。高剂量组从给药第4天开始，中剂量组从给药第5天开始，低剂量组从给药第12天开始，各组动物出现深黄色尿液并持续至给药结束，但该症状从给药第20天开始仅出现在每次给药后观察时，上午及给药前观察时均未见动物尿液异常。恢复期各给药组以上症状均未出现。

体重测定结果显示所有动物体重均呈现增长趋势，仅发现离乳前（给药第2~10天期间）高剂

量组雌、雄动物体重下降, 给药初期高剂量组雌、雄动物体重增长幅度减少; 但到给药后期以及恢复期, 给药组与对照组动物体重增长无明显差异 (图1)。与同期对照组相比, 未观察到热

炎宁合剂对离乳后雌、雄动物摄食量的影响。此外, 动物各剂量组眼前节及眼后节检查各项指标均未见明显异常。



A. 雌性动物体重结果; B. 雄性动物体重结果。

图1 给药后动物体重增长曲线

3.2 血液学、血清生化和尿液检测分析

给药结束时高剂量组雌、雄动物血红蛋白、红细胞比容降低, 雄性动物网织红细胞含量及比例升高; 给药结束时高剂量组雌性动物血清中甘油三酯含量升高; 给药组雌、雄动物尿比重、尿酮体增加, 尿颜色加深, 雄性动物尿隐血含量增加、尿白细胞含量增加; 以上指标在恢复期结束时均可恢复。此外, 与对照组相比, 热炎宁合剂给药组动物

未观察到对其他指标的影响。

3.3 对幼鼠发育指标和行为学的影响

与对照组相比, 未观察到各剂量组雌、雄动物切齿萌出、眼睑开裂、感觉与反射机能、龟头包皮腺裂开、阴道张开等指标的差异以及各剂量组间幼鼠自主活动的差异 (表2、3)。也未观察到热炎宁合剂对幼龄大鼠骨密度的影响。

表 2 热炎宁合剂对幼龄 SD 大鼠生长发育指标的影响 (雄性, $n=12$)

组别	切齿萌出比例 /%		眼睑开裂比例 /%		自由落下反射比例 /%	瞳孔反射比例 /%
	PND11	PND14	PND14	PND17	PND21	PND21
对照组	25.0	100.0	83.3	100.0	100.0	100.0
低剂量组	91.7	100.0	66.7	100.0	100.0	100.0
中剂量组	100.0	/	83.3	100.0	100.0	100.0
高剂量组	91.7	/	77.8	100.0	100.0	100.0

组别	Preyer 反射比例 /%	疼痛反射比例 /%	角膜反射比例 /%	耳介反射比例 /%	龟头包皮腺裂开比例 /%	
	PND21	PND21	PND21	PND21	PND42	PND44
对照组	100.0	100.0	100.0	100.0	75.0	100.0
低剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3	100.0
中剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3	100.0
高剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	77.8	100.0

表 3 热炎宁合剂对幼龄 SD 大鼠生长发育指标的影响 (雌性, $n=12$)

组别	切齿萌出比例 /%		眼睑开裂比例 /%		自由落下反射比例 /%	瞳孔反射比例 /%
	PND11	PND14	PND14	PND17	PND21	PND21
对照组	66.7	100.0	91.7	100.0	91.7	100.0
低剂量组	83.3	100.0	83.3	100.0	100.0	100.0
中剂量组	100.0	/	83.3	100.0	100.0	100.0
高剂量组	100.0	/	72.7	100.0	100.0	100.0

组别	Preyer 反射比例 /%	疼痛反射比例 /%	角膜反射比例 /%	耳介反射比例 /%	阴道张开比例 /%	
	PND21	PND21	PND21	PND21	PND35	PND42
对照组	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/
低剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/
中剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/
高剂量组	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	/

3.4 对动物脏器重量的影响

给药结束时,与对照组相比,偶见1~2个脏器重量的改变出现在中、高剂量组单一性别动物中,但在镜下未见与之相关的组织病理学变化,考虑脏器重量的差异是由于动物个体差异造成。恢复期结束时,与对照组相比,受试物低、中和高剂量组动物各组织器官重量均未见显著性差异。

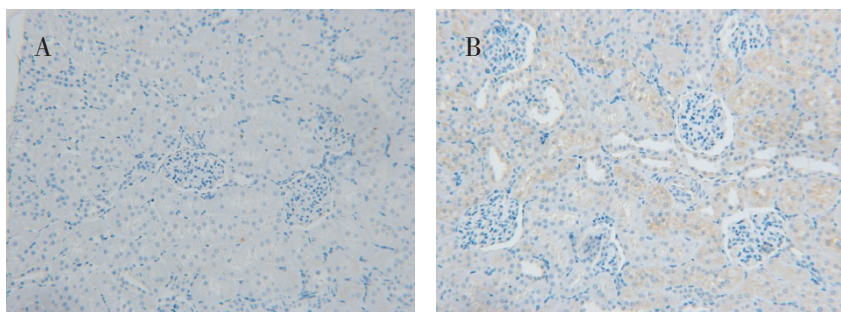
3.5 病理学检查

组织病理学检查发现,多次给药后,对照组与受试物低、中和高剂量组均有1~3只数量不等雄性动物肾脏可见极轻度或轻度肾小管上皮细胞玻璃样小滴;中剂量组3/8只雄性动物肾脏可见极轻度

肾小管上皮细胞玻璃样小滴;高剂量组有2/6只雄性动物肾脏分别可见肾小管上皮细胞玻璃样小滴。至恢复期结束,仍在对照组及受试物给药组的雄性动物中可见这些改变。

3.6 肾脏 α -2u球蛋白免疫组化分析

分析结果显示大鼠 α -2u球蛋白可与对照组及受试物高、中和低剂量给药组动物肾脏肾小管上皮细胞玻璃样小滴可见特异性结合,而阴性对照PBS与动物肾脏肾小管上皮细胞玻璃样小滴未见特异性结合(图2)。结果表明出现于雄性大鼠肾脏肾小管上皮细胞中的玻璃样小滴为 α -2u球蛋白蓄积体,为雄性大鼠常见的背景性变化。



A. 阴性对照PBS; B. α -2u球蛋白。

图2 大鼠肾脏 α -2u球蛋白免疫组化分析

4 讨论

由于成人与儿童脏器功能及代谢特征存在差异,可能会影响到药物安全性特征。成熟体系与未成熟体系之间的内在差异,可能导致在儿童中出现一些于成人中观察不到的毒性,因此,幼年动物资料对于评估药物对儿童的潜在毒性具有重要价值^[1-2]。对于已上市的中药制剂拟增加儿童用药和/或包含儿童用药的,若缺乏系统的儿童用药临床安全性试验和非临床安全性评价资料的,应进行幼年动物毒理学试验。

热炎宁合剂为已获得批准文号的上市药物,功能主治为清热解毒,主要用于流行性感冒、扁桃体炎、急性咽炎等。临床成人用量为一次10~20 mL,一日2~4次。为增加儿童为临床用药人群,本试验采用幼年动物考察药物可能产生的毒性作用。根据拟增加儿童人群的临床用量,分别为1~3岁,一次5 mL,一日3次;4~6岁,一次10 mL,一日3次;7~13岁,一次15 mL,一日3次。本试验采用的最高剂量为受试物能达到的最高浓度,以及大鼠经

口灌胃给药的最大体积。给药体积20 mL/kg,幼龄大鼠PND10(平均体重20 g)对应给药体积约为0.4 mL/只,至PND45(平均体重200~250 g)对应给药体积约为4~5 mL/只。研究采用与临床用药人群年龄相匹配的幼龄大鼠为研究对象,大鼠PND10约相当于临床新生儿过度至婴儿阶段,PND45约相当于临床12岁儿童,本研究给药动物周龄覆盖临床应用人群的年龄范围(1~12岁)^[5]。并且热炎宁临床用药一般不超过一周,本研究给药周期远超过临床应用周期。为考察可能存在的毒性反应的量效关系,本试验设置低、中、高剂量之间的倍比为1:2.5:5。

在本研究中对10日龄SD大鼠连续灌胃至出生后第45日,动物出现的棕褐色水样便与药物的药效作用相关;深黄色尿液症状可能与受试物本身性状相关。给药组尿生化指标的变化并未观察到相应肾脏组织病理学的明显改变,且出现的反应均可恢复,因此认为热炎宁合剂对幼龄动物不产生明显毒性作用的剂量为65.1 g/kg(相当于生药量),按

体重折算约为1~3岁儿童临床拟用剂量的33.3~41.7倍; 4~6岁儿童临床拟用剂量的30~33.3倍; 7~12岁儿童临床拟用剂量的25.6~38.8倍; 按体表面积折算约为1~3岁儿童临床拟用剂量的5.8~7.1倍; 4~6岁儿童临床拟用剂量的5.1~6.7倍; 7~12岁儿童临床拟用剂量的4.9~8.2倍。

研究报道 α -2u球蛋白肾病综合征具有性别和物种特异性, 只发生于雄性大鼠, 为近端小管S2段蛋白质滴蓄积, 进而单个细胞坏死、近端小管和髓袢细段连接处出现颗粒管型、细胞再生为特征的肾脏病变。 α -2u球蛋白在正常雄性大鼠肝脏合成, 雄激素调控, 可经肾小球滤过, 约50%近端小管重吸收, 溶酶体降解^[6]。外源化合物与 α -2u球蛋白可逆结合, 降低溶酶体蛋白酶的降解能力, 致溶酶体数量增加体积增大, 形成特征性的玻璃样小滴。本试验中对照组和受试物各剂量组雄性动物中肾脏 α -2u球蛋白免疫组化染色阳性, 因此热炎宁合剂的非临床幼年动物毒理学研究中肾脏肾小管上皮细胞玻璃样小滴的病理改变为 α -2u球蛋白蓄积所致。

由于我国目前尚未发布有关儿科用药安全性评价的指导原则。本研究在遵循GLP规范下, 参考美国FDA与欧盟EMA颁布的儿科用药非临床研究评价指导原则, 并结合中药儿科用药的安全性评价特点, 开展中药儿科用药的幼年动物毒理学试验, 为国内相似的儿科用药非临床安全性评价研究提供支

持和参考, 为制定我国相关的指导原则奠定基础。

参考文献:

- [1] FDA. Guidance for Industry: Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products[EB/OL]. (2006-02-08) [2020-03-02]. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079247.pdf>.
- [2] EMA. Guideline on the Need for Non-clinical Testing in Juvenile Animals of Pharmaceuticals for Pediatric Indications[EB/OL]. (2008-08-01) [2020-03-02]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-need-non-clinical-testing-juvenile-animals-pharmaceuticals-paediatric-indications_en.pdf.
- [3] 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.
- [4] 卢锐. 热炎宁合剂主要药效学实验研究[J]. 浙江临床医学, 2009, 11(6): 568-569.
- [5] 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.
- [6] 戴贵东, 王心如. α -2u球蛋白与化学物质危害性的评价[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2002, 29(4): 206-210.

(收稿日期 2020年3月27日 编辑 王雅雯)