



丹红注射液对 Beagle 犬的 13 周亚慢性毒性试验

迟福艳¹, 薛云², 戴学栋², 马玉奎²

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250033)

【摘要】 目的 研究 Beagle 犬连续静脉注射给予丹红注射液 13 周后所产生的亚慢性毒性作用。方法 选取 Beagle 犬 24 只, 分为 4 组, 连续静脉给药 13 周, 以体重、血液生化学、血液学、脏器重量、组织病理学检查为检测指标, 综合评价丹红注射液对 Beagle 犬的毒性作用。结果 丹红注射液 494 mg/kg 组 Beagle 犬体重增长明显延缓, 肾功能指标 (BUN、CR) 明显增加, 组织病理学检查表明肝脏枯否细胞增生。结论 丹红注射液 494 mg/kg 剂量下连续静脉注射 13 周可致 Beagle 犬产生明显的肾脏和肝脏毒性。

【关键词】 丹红注射液; Beagle 犬; 亚慢性毒性

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0027-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.006

A 13-week subchronic toxicity test of Danhong injection in Beagle dogs

CHI Fu-yan¹, XUE-yun², DAI Xue-dong², MA Yu-kui²

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China;

2. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250033)

【Abstract】 **Objective** To investigate the subchronic toxicity of a Chinese medicine Danhong injection in dogs. **Methods** Twenty-four healthy Beagle dogs (body weigh 7–9 kg, male:female = 1:1) were used in this study. The test dogs were administered with Danhong injection by intravenous injection once every day for consecutive 6 days/week for thirteen weeks. The Danhong injection was used in 3 doses: 494, 247, and 124 mg·kg⁻¹, respectively. The control dogs received normal saline injection in the same volume. The body weight, blood biochemistry, hematology, viscera relative weight and histopathology were determined for the overall toxicity assessment. **Results** The dogs administered with 494 g·kg⁻¹ Danhong injection showed significantly reduced body weight gain, abnormal increase of urea nitrogen (BUN), creatinine (CR) levels, and histopathological changes in the liver. **Conclusions** Danhong injection (494mg·kg⁻¹) administered Intravenously has obvious toxicity on the liver and kidney function.

【Key words】 Chinese medicine; Danhong injection; Beagle dog; Subchronic toxicity

人们普遍认为中药的药性平和、不良反应小、安全可靠。但随着中药新品种及新剂型不断出现,特别是中药注射液的广泛应用,其不良反应也日益突出,渐渐引起人们的重视。中药注射剂成分往往复杂,所引起的不良反应也不能准确发现引起的机

制。鉴于近年临床上中药注射剂引发的不良反应事故频发,为全面提高中药注射剂的安全性、有效性和质量可控性, SFDA 下发了《关于开展中药注射剂安全性再评价工作的通知》(国食药监办[2009] 28号)。按照 SFDA 的要求,我们在 GLP 条件下对

[作者简介] 迟福艳(1969-),女,研究方向:药物不良反应检测。E-mail: yaoliduli@163.com。

[通讯作者] 马玉奎(1975-),男,研究方向:药物安全性评价。E-mail: yukuima@sina.com。

丹红注射液进行了临床前安全性再评价研究。本试验通过观察 13 周重复静脉给予丹红注射液后 Beagle 犬所产生的毒性反应,预测临床用药中可能出现的不良反应,提示临床用药中需重点监测的指标,为临床用药的安全性提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

Beagle 犬,合格证号:SCXK(京)2011-0003,雌雄各半,体重范围为(6~8)kg,由北京玛斯生物技术有限公司提供。饲养于普通级环境,室温(19~26)℃,湿度 40%~70%,日温差 $\leq 4^{\circ}\text{C}$,换气次数 8~10 次/h,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)20100004。

1.2 仪器与试剂

BS300 型生化分析仪(深圳迈瑞公司制造),用于血液生化学检测。C2000 型血凝仪(北京东方普利生制造),用于血液学检测。TCS-150 型电子台秤(精确到 0.01 kg,梅特勒-托利多仪器(常州)有限公司制造),用于动物体重测定。TP1020 生物组织脱水机、EG1160 石蜡包埋机、RM2235 切片机、DMLS2 型显微镜(德国莱卡公司制造),以上仪器用于组织病理学检查。

丹红注射液(浓缩液)由济南步长制药有限公司提供,每 1 mL 中含总黄酮以芦丁计为 49.4 mg/mL(批号 110511);血液学检测试剂盒,由烟台卓越生物技术有限责任公司生产。血凝检测试剂盒由德国 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH 生产。血液生化学检测试剂盒由迈瑞上海科华生物工程股份有限公司生产。

1.3 方法^[1]

按照中药注射剂安全性再评价非临床研究评价技术原则要求,亚慢性毒性试验应采用啮齿类和非啮齿类两种动物;对于丹红注射液的大鼠亚慢性毒性研究已有报道^[2],但未见非啮齿类毒性研究,故本试验采用检疫合格的 Beagle 犬 24 只,雌雄各 12 只,按体重均衡原则分为 4 组,即溶剂对照组和丹红注射液 3 个不同剂量给药组(494,247,124 mg/kg),给药容积为 10 mL/kg,对照组同法给予 10 mL/kg 的生理盐水,每天 1 次给药,每周给药 6 d,停药 1 d,给药周期为 13 周,恢复期设为 4 周。

体重称重为每周 1 次,每次给药后需详细观察

Beagle 犬的毒性反应。血液学及血液生化学检测时间为第 1 次给药前、末次给药后及恢复期 4 周结束。末次给药后每组取雌雄各 2 只动物,恢复 4 周后每组取雌雄各 1 只动物。将所需剖检动物隔夜禁食 12 h 后进行剖检。静脉注射 3% 戊巴比妥钠溶液,约 1 mL/kg 麻醉后颈总动脉放血处死,然后对动物进行外观检查,包括动物的一般外观检查、体内各脏器、体液等的肉眼观察。肉眼观察后剖检,摘取主要脏器,称量主要脏器重量,将所取脏器以 10% 福尔马林溶液固定,进行病理组织学检查。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间进行方差分析统计其差异性。

1.4 剂量设计依据^[1]

中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则中规定,长期毒性试验高剂量原则上使动物产生明显的毒性反应,低剂量原则上高于动物药效学试验的等效剂量、并不使动物出现毒性反应,结合毒性作用机制和模式在高剂量和低剂量之间设立中剂量,以考察毒性反应剂量-反应关系。

丹红注射液临床用药剂量以芦丁计为 7.5 mg/kg,折算为犬的等效剂量为 12 mg/kg。同时,Beagle 犬急毒结果显示,667 mg/kg 剂量给药后,Beagle 犬出现呕吐、呼吸急促、后肢无力,活动减少等毒性反应,约(4~8)min 恢复正常,445 mg/kg 剂量给药后犬出现后肢无力和活动减少等毒性反应,约 2 min 恢复正常,296 mg/kg 剂量给药后犬未出现任何毒性反应。参考急毒结果,按照技术指导原则要求,将 494 mg/kg 设计为亚慢性毒性试验的高剂量,此剂量为临床剂量的 66 倍,药效学等效剂量的 41 倍,124 mg/kg 为低剂量,为临床用药剂量的 16 倍,药效学等效剂量的 10 倍。

2 结果

2.1 一般体征观察

高剂量组所有动物给药过程中均出现流涎和呕吐反应;中剂量组所有动物出现流涎,2 只动物偶尔出现呕吐反应;低剂量组和溶剂对照组所有动物均未见任何异常反应。

2.2 体重变化

与溶剂对照组比较,494 mg/kg 剂量组动物体重增长率明显偏低,在第 1、2 周出现统计学差异($P < 0.05$),说明丹红注射液 494 mg/kg 剂量下可抑制 Beagle 犬体重增长;247 mg/kg 和 124 mg/kg 剂量对 Beagle 犬体重无明显影响。见表 1。

表 1 丹红注射液对 Beagle 犬体重增长率的影响 ($\bar{x} \pm s$) (%)

Tab. 1 Effects of Danhong Injection on the body weight of dogs (%)

周数 Weeks	丹红注射液组/mg/kg Danhong injection groups, mg/kg			溶剂对照组 Vehicle control group
	494	247	124	
	1	0.8 ± 3.0 *	4.7 ± 2.4	
2	3.6 ± 2.2 **	5.5 ± 3.1	8.5 ± 5.8	9.0 ± 2.8
3	7.0 ± 7.9	10.0 ± 1.7	10.1 ± 3.5	11.3 ± 1.9
5	16.1 ± 7.3	18.3 ± 3.6	18.0 ± 3.2	19.9 ± 2.8
7	23.9 ± 7.7	27.2 ± 4.1	26.4 ± 2.5	28.9 ± 3.8
9	25.7 ± 8.6	30.2 ± 5.7	29.4 ± 3.3	32.5 ± 5.8
11	26.9 ± 10.6	32.1 ± 7.9	30.3 ± 3.8	32.3 ± 4.7
13	29.9 ± 12.2	38.9 ± 5.7	31.5 ± 12.1	36.3 ± 6.1
17	45.5 ± 19.0	49.3 ± 14.8	47.2 ± 2.1	48.8 ± 4.5

* $P < 0.05$ vs 溶剂对照组

2.3 血液学及血液生化学结果

参考本中心 Beagle 犬的背景数据及相关文献^[3],并与溶剂对照组比较,丹红注射液所有剂量组的血液学、心电等指标未见任何异常;TT、PT 和 TT 明显延长,高剂量组动物血清中 BUN 和 CR 明显升高,出现统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);其它两个剂量组血液生化学指标基本在正常范围内。高剂量组动物血清中 BUN 和 CR 的升高停药 4 周后可恢复正常。给药结束时出现统计学意义的指标结果如表 2 所示。

表 2 Beagle 犬异常的血液学及血液生化学指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Abnormal indexes of blood biochemistry and hematology of the dogs after Danhong Injection

异常指标 Indexes	丹红注射液组, mg/kg Danhong Injection groups, mg/kg			溶剂对照组 Vehicle control group
	494	247	124	
	TT (sec)	15.10 ± 2.81 **	13.32 ± 1.98 **	
PT (sec)	8.97 ± 1.65 *	8.02 ± 1.21 *	8.82 ± 2.16	6.68 ± 0.74
APTT (sec)	17.80 ± 1.15 *	17.20 ± 0.99 *	16.97 ± 2.53	14.47 ± 2.52
BUN (mmol/L)	6.21 ± 1.22 *	4.12 ± 0.60	4.38 ± 0.44	4.18 ± 0.91
CR (umol/L)	84.13 ± 9.99 *	69.75 ± 5.60	74.61 ± 7.49	68.15 ± 7.85

注: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs 溶剂对照组

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

2.4 病理组织学检查结果

丹红注射液高、中、低三个剂量组所有动物脏器重量均在正常范围内,各脏器未见肉眼可见病变。病理检查结果显示,494mg/kg 剂量组 50% 动物肝脏枯否氏细胞增生,胞质内可见棕黄色颗粒;溶剂对照组及中、低剂量组所有动物所有脏器均未见药物相关性病理组织学病变(图 1 见彩插 1)。

3 讨论

尿素氮(BUN)是人体蛋白质代谢的主要终末产物,肾脏为排泄尿素氮的主要器官;肌酐(CR)是肌酸和磷酸肌酸代谢的终产物,它的排泄量反映血液中的肌酸酐含量和肾小球的过滤速率,也就是肾脏的机能,当肾发生病变时,肌酐排泄受阻,血液中肌酸酐含量升高。通过测定血液中肌酐和尿素氮含量的测定,可检测肾功能是否异常^[4,5]。本研究中,高剂量组 Beagle 犬血清中 BUN 和 CR 明显升高,表明丹红注射液 494 mg/kg 剂量下对肾脏功能有明显的损伤,病理学检查结果显示,未见明显的组织病理学病变,说明对肾脏的损伤仅仅是功能性

损伤,并未有实质性病变。活血化瘀类药物可引起凝血时间延长,本试验中,犬血液的 PT(凝血酶原时间)、APTT(活化部分凝血活酶时间)和 TT(凝血酶时间)明显延长,分析原因为丹红注射液具有活血化瘀作用,凝血时间的延长为丹红注射液的药效作用,无毒理学意义。病理学检查结果显示,高剂量组 50% 动物肝脏枯否氏细胞增生,胞质内可见棕黄色颗粒,分析原因为丹红注射液自静脉进入动物体内后,作为异物可能会激活肝脏的单核-巨噬细胞系统,使巨噬细胞增生,继而吞噬异物颗粒,直至清除。

Beagle 犬亚慢性毒性试验可描述犬重复给予供试品后的毒性反应,是非临床安全性评价的重要内容,也是中药注射液再评价必须进行的研究项目。通过亚慢性毒性试验可以预测药物可能引起的临床不良反应的性质、程度、量效关系和时效关系、可逆性等;也可判断药物可能的毒性靶器官或组织,推测临床用药的安全范围,指导临床安全用药。本研究结果显示,丹红注射液静脉注射给药,其无毒反应剂量为 124 mg/kg,其主要的中毒靶器官为肝

(下转第 34 页)

- 应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7):61-67.
- [2] 路静, 朱祥宇, 王超, 等. 周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8):15-17.
- [3] 戴丽军, 黄莉, 廖军. 长爪沙鼠血清雌性激素的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 13(4):246-248.
- [4] 陈立青, 戴方伟, 郭红刚, 等. 长爪沙鼠发情周期规律与判定方法 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1):67-70.
- [5] 李力, 乔杰. 实用生殖医学[M]. 人民卫生出版社, 2012:45-82.
- [6] Lv XH, Shi DZ. Variations of serum estradiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. Exp Anim, 2010, 59(2):231-237.
- [7] Lv XH, Shi DZ. Variations in serum gonadotropin and prolactin levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. Exp Anim, 2011, 60(2):169-176.
- [8] Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena [J]. Mem Univ Calif, 1922, 6:1-148.
- [9] 朱士恩. 动物生殖生理学[M]. 中国农业出版社, 2006:50-69.
- [10] Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat; prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy [J]. Endocrinology, 1975, 96(1):219-226.
- [11] Nelson JF, Felicio LS, Osterburg HH, et al. Differential contributions of ovarian and extraovarian factors to age-related reductions in plasma estradiol and progesterone during the estrous cycle of C57BL/6J mice [J]. Endocrinology, 1992, 130(2):805-810.
- [12] Michael SD. Plasma prolactin and progesterone during the estrous cycle in the mouse [J]. Exp Biol Med, 1976, 153(2):254-257.

[修回日期]2014-04-08

(上接第 29 页)

脏和肾脏等,提示临床应用中应密切监测患者以上器官的功能。

参考文献:

- [1] 中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则[S]. 国家食品药品监督管理局颁发, 2005, 3.
- [2] 王保中, 曹茂荣, 邹薇红, 等. 丹红注射液毒理学研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(11):27-29.
- [3] 杨锋, 王红星, 何永亮, 等. 实验 Beagle 犬血液学及血液生物化学参考值的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6):355-358.
- [4] 周宗灿. 毒理学教程[M]. 北京大学医学出版社, 2006:425-427.
- [6] 任丽, 蒋素华, 刘红, 等. 血肌酐水平、MDRD-GRF、CG-GRF 与肾小管间质病变相关性研究 [J]. 检验医学与临床, 2010, 22(7):2436-2438.

[修回日期]2014-03-10