·实验研究·

离乳大鼠给予小儿风叶咳喘平合剂的重复给药毒性评价

周　莉[1,2,3],玄振玉[4],崇立明[1,2,3],侯祎雯[1,2,3],杨　阳[1,2,3],陆赛卫[4],李　雷[1,2,3],
王　芬[1,2,3],王忠辉[1,2,3],陈丽芬[1,2,3],张　鑫[1,2,3],孙祖越[1,2,3]

(1 上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室,中国生育调节药物毒理检测中心,上海 200032;
2 国家人口和计划生育委员会计划生育药具重点实验室,上海 200032;3 复旦大学生殖与发育研究院,
上海 200032;4 苏州玉森新药开发有限公司,苏州 215000)

[**摘要**] **目的**:探索刚离乳幼龄大鼠的中药非临床安全性评价方法,观察小儿风叶咳喘平合剂4周灌胃给药对幼龄SD大鼠的毒性反应,为儿童临床用药提供参考。**方法**:刚离乳SD大鼠120只,按体重随机分为4组,每组30只,雌雄各半,分为溶媒对照组,风叶咳喘平合剂低(浸膏7.0 g·kg^{-1})、中(浸膏14.0 g·kg^{-1})和高(浸膏22.5 g·kg^{-1})剂量组;各剂量组动物每天灌胃给药1次,PND_{21}开始给药,共4周,溶媒对照组给予等量的去离子水;检测一般状况、体重、摄食量、生长发育、血液学、血液生化学、凝血、尿液、免疫、激素、脏器和病理组织学变化。**结果**:高剂量组雌雄幼龄大鼠体重降低、摄食量减少、血液学指标(网织红细胞计数RET和RET%增加)、脏器重量或系数(胸腺减轻、肝脏增加)有所改变;雄性幼龄大鼠生长发育迟缓,表现为雄鼠顶臀长减少,胫骨长缩短、胫骨总密度和皮质密度增加;未见明显毒性靶器官;上述表现对雄性幼龄大鼠的影响更加明显。**结论**:幼龄SD大鼠4周灌胃给予风叶咳喘平合剂的安全剂量为浸膏7.0 g·kg^{-1}(低剂量,相当于生药量79.8 g·kg^{-1}),为大鼠等效剂量的2.5倍,临床剂量的14.9倍。

[**关键词**] 小儿风叶咳喘平合剂;幼龄SD大鼠;重复给药毒性;安全性评价

[**中图分类号**] R994　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003－3734(2021)05－0434－07

Toxicity evaluation of repeated dose of Children Fengye Kechuanping Mixture in juvenile rats

ZHOU Li[1,2,3], XUAN Zhen-yu[4], CHONG Li-ming[1,2,3], HOU Yi-wen[1,2,3], YANG Yang[1,2,3], LU Sai-wei[4],
LI Lei[1,2,3], WANG Fen[1,2,3], WANG Zhong-hui[1,2,3], CHEN Li-fen[1,2,3], ZHANG Xin[1,2,3], SUN Zu-yue[1,2,3]

(1 *Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, National Evaluation Centre for Toxicology of Fertility Regulating Drugs, Shanghai* 200032, *China*; 2 *Key Laboratory of Reproduction Regulation of NPFPC, Shanghai* 200032, *China*; 3 *Reproductive and Developmental Research Institute of Fudan University, Shanghai* 200032, *China*; 4 *Suzhou Youseen New Drug R&D Co., Ltd., Suzhou* 215000, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the non-clinical safety evaluation method of Traditional Chinese medicine in juvenile rats, and observe the 4-week toxicity of Children Fengye Kechuanping Mixture, so as to provide reference for clinical medication in children. **Methods**: A total of 120 juvenile SD rats were randomly divided into 4 groups

[**基金项目**] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-002,2019ZX09201004-002-051);上海市科委研发平台专项(18DZ2292100)

[**作者简介**] 周莉,女,研究员,主要从事药物生殖药理毒理学研究、新药非临床安全性评价工作。E-mail: zhoulijss@163.com。共同第一作者:玄振玉,男,教授级工程师,主要从事新药研发。E-mail:xuanzhenyu@163.com。

[**通讯作者**] 孙祖越,男,研究员,主要从事药物生殖药理毒理学及新药非临床安全性评价研究。E-mail: sunzy64@163.com。

according to bodyweight, with 30 rats in each group, half male and half female. Four groups were solvent control group, Children Fengye Kechuanping Mixture low (extract 7.0 g·kg^{-1}), medium (extract 14.0 g·kg^{-1}) and high (extract 22.5 g·kg^{-1}) dose groups. Each group was given the medication once a day by gavage. PND_{21} were given for 4 weeks in total, and the solvent control group was given the same amount of deionized water. General status, bodyweight, food intake, growth and development, hematology, blood biochemistry, coagulation, urine, immunity, hormones, organs and histopathological changes were detected. **Results**: In high-dose group, the weight, food intake, hematological indexes (RET, RET% increase), organ weight or coefficient (thymus decrease, liver increase) changed. Growth retardation was observed in male juvenile rats (manifested as decreased top hip length, shortened tibia length, increased tibia total density and cortex density). No obvious toxic target organs were observed. The effect of the above expression in juvenile male rats was more obvious. **Conclusion**: The safe dose of Children Fengye Kechuanping Mixture was 7.0 g·kg^{-1} (low dose, equivalent to raw dose 79.8 g·kg^{-1}), 2.5 times of the equivalent dose and 14.9 times of the clinical dose in juvenile SD rats given by gavage for 4 weeks.

[**Key words**] Children Fengye Kechuanping Mixture; juvenile SD rats; repeated dose toxicity; safety evaluation

小儿风叶咳喘平为名老中医经验方,由矮地茶、枇杷叶、麻黄、苦杏仁、薄荷、陈皮、竹茹、鱼腥草和炙甘草组成,经前期临床观察和药理研究显示,本方对成人具有明显的止咳、平喘、抗炎、化痰和抑菌等功效,可有效缓解急性支气管炎患者的咳嗽症状,减轻咳嗽严重程度[1]。目前儿科药物的市场需求巨大,为了扩大用药人群至儿童,充分评价小儿风叶咳喘平合剂对儿童的安全性,本研究通过观察风叶咳喘平合剂重复给药对幼龄大鼠的毒性反应,寻找无毒反应的安全剂量,为临床儿童用药提供依据。

由于儿科人群的特殊性,其非临床安全性评价有不同于成人用药的独特之处。不同地区的监管机构之前已经发布了一些指导原则,且对于是否进行幼龄动物实验(juvenile animal study,JAS)以及其时间安排和设计尚未达成完全一致[2]。近日,ICH S11《支持儿科药物开发的非临床安全性评价》拟在国内正式实施,进行幼龄动物非临床安全性评价的实验设计,除考虑普通成年动物实验需考虑的问题外,还应考虑儿科用药的特点,儿童与成人的差异、代谢特点、生长发育和神经行为等,对中枢神经、骨骼、生殖和泌尿等系统特殊靶器官和指标进行设定。根据成年人或成年动物表现出的作用特点,选择相应动物和相应指标[3-4]。本研究通过观察小儿风叶咳喘平重复给药对刚离乳幼龄大鼠的毒性反应,寻找合适的评价指标和无毒反应的安全剂量,为临床儿童用药提供依据。

材料与方法

1 受试物与试剂

小儿风叶咳喘平合剂(苏州玉森新药开发有限公司提供,批号:170201,含量以岩白菜素计,不得少于6.0 mg·g^{-1};以盐酸麻黄碱计,不得少于2.2 mg·g^{-1});临床为口服给药,3~6岁,10 mL·次$^{-1}$,*tid*;每mL含2.138 6 g生药,即64.158生药·d^{-1},相当于5.63 g浸膏·d^{-1}。受试物临用前用去离子水配制成所需浓度。

2 实验动物

由于受试物拟用于2~3岁儿童,故采用刚离乳(PND_{21},postnatal day)的幼龄大鼠。按照体重水平,随机将SPF级SD幼龄大鼠120只,分为溶媒对照组(去离子水)、风叶咳喘平合剂低、中和高剂量组共4组,每组30只,雌雄各半;给药时PND_{21}体重40.4~57.3 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物许可证号SCXK(沪)2013-0016。动物在上海市计划生育科学研究所(中国生育调节药物毒理检测中心)SPF级动物房内饲养,每笼饲养同性别动物不多于5只,自由饮水摄食,室温21.7~25.0 ℃,相对湿度45.6%~66.2%,光照黑暗各12 h,换气每小时12次,全新风。

3 仪器

日本日立7020型全自动生化分析仪、Sysmex XT2000i血球分析仪、Sysmex CA500 SERIES凝血分析仪、SIEMENS CLINITEK STATUS尿液化学分析

仪、Zenyth 20st 型酶标仪、Leica RM2126 石蜡切片机、Nikon eclipse 50i 型病理显微镜、YLS－31A 大小鼠转棒测试仪操作规程、YLS－1A 多功能小鼠活动记录仪和 PAF－8M 小鼠避暗实验视频分析系统。

4 剂量设计

以文献[5]报道 2 岁儿童平均体重约 12 kg 计算，即临床剂量为 5.35 g 生药·kg^{-1}·d^{-1}，折算成大鼠等效剂量为 32.1 g 生药·kg^{-1}·d^{-1}；根据前期的重复给药预试验设置本试验低、中和高剂量组，剂量分别为 7.0，14.0 和 22.5 g 浸膏·kg^{-1}（分别相当于 79.8，159.6 和 256.5 g 生药·kg^{-1}）。

5 给药方法与检测指标

各剂量组灌胃（*ig*）给予风叶咳喘平合剂溶液 30 mL·kg^{-1}体重，*qd*，连续 4 周，对照组给予等量的去离子水。试验期间每天观察动物的一般状况，定期称量体重和摄食量，并进行行为学和性发育等指标检查；给药 d 29 和 d 43 分别剖杀 2/3 和 1/3 的动物，进行血液学、凝血、血液生化学、激素和免疫指标检测；解剖时称量脏器，计算脏器系数，测量胫骨长度和密度，并进行病理组织学检查。

6 统计学方法

采用 SPSS 统计软件进行统计分析，体重及摄食量等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较时用单因素方差分析或非参数检验；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。

结　果

1 一般状况

给药期及恢复期所有大鼠外观体征、行为活动、姿势、饮水和被毛、对外界刺激反应、腺体分泌物和呼吸状态等均正常。

2 体重和摄食

雄鼠：中剂量组 d 17，d 21，d 24 和 d 28，高剂量组 d 14，d 17，d 21，d 24，d 28，d 31，d 35 和 d 38 体重明显降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），中剂量组 d 17 ~ d 18，高剂量组 d 17 ~ d 18 和 d 24 ~ d 25 摄食量明显降低（$P<0.05$）。雌鼠：高剂量组 d 14 和 d 17 体重明显降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），d 17 ~ d 18 摄食量明显降低（$P<0.01$）。结果见图 1 和图 2。

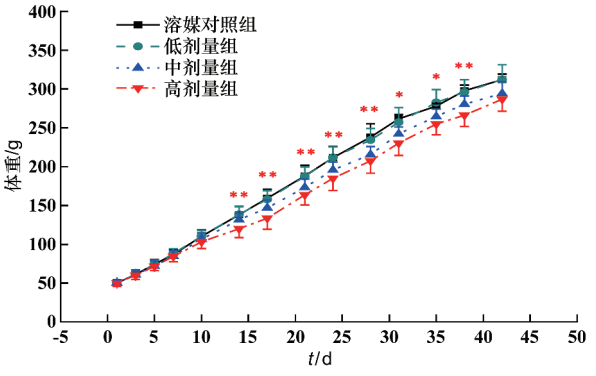


图 1 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对雄鼠体重的影响

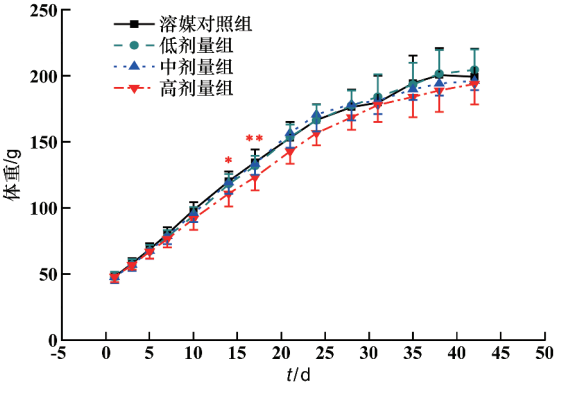


图 2 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对雌鼠体重的影响

3 行为学影响

各剂量组雌雄动物行为学指标包括平衡协调能力、自发活动和学习记忆能力等，与溶媒对照组相比均未见统计学差异（$P>0.05$）。

4 骨骼系统影响

雄鼠：给药期结束，与溶媒对照组（17.5 ± 0.5）cm 相比，中剂量组（16.8 ± 0.4）cm、高剂量组（16.2 ± 0.3）cm 顶臀长减少（$P<0.01$）；与溶媒对照组（35.10 ± 0.94）cm 相比，高剂量组（33.85 ± 1.13）cm 胫骨长减少（$P<0.05$）；中剂量组皮质密度、高剂量组总密度和皮质密度均增高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。恢复期结束，与溶媒对照组（19.7 ± 0.3）cm 相比，高剂量组（18.7 ± 0.5）cm 顶臀长减少（$P<0.01$）。雌鼠：给药期和恢复期结束，骨骼系统指标均未见统计学差异（$P>0.05$）。结果见表 1。

表 1 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对雄鼠骨骼系统的影响

检测指标	阶段	n	溶媒对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
顶臀长/cm	d 29	10	17.5 ± 0.5	17.3 ± 0.3	16.8 ± 0.4[b]	16.2 ± 0.3[b]
	d 43	5	19.7 ± 0.3	19.6 ± 0.3	19.2 ± 0.5	18.7 ± 0.5[b]
胫骨长/mm	d 29	10	35.10 ± 0.94	35.63 ± 0.65	34.52 ± 0.94	33.85 ± 1.13[a]
	d 43	5	38.24 ± 0.63	38.62 ± 0.76	37.94 ± 0.80	37.69 ± 0.43
总密度/mg·cm^{-3}	d 29	10	330.8 ± 16.8	329.4 ± 24.1	353.2 ± 12.2	365.0 ± 18.4[b]
	d 43	5	380.5 ± 25.5	362.6 ± 15.3	366.1 ± 13.6	379.4 ± 22.3
小梁密度/mg·cm^{-3}	d 29	10	254.0 ± 20.2	240.7 ± 15.6	248.5 ± 17.4	244.6 ± 19.7
	d 43	5	236.1 ± 8.6	241.7 ± 18.5	232.4 ± 14.4	251.7 ± 19.4
皮质密度/mg·cm^{-3}	d 29	10	775.4 ± 12.0	779.2 ± 15.9	792.5 ± 8.9[a]	806.0 ± 8.8[b]
	d 43	5	841.9 ± 29.4	821.7 ± 11.9	832.3 ± 6.5	821.9 ± 17.0

与溶媒对照组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

5 血液学影响

雄鼠:给药期结束,中剂量组平均血小板体积(MPV)和血小板分布宽度(PDW)降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);高剂量组网织红细胞计数(RET)和网织红细胞比率(RET%)升高($P<0.05$);恢复期结束,高剂量组红细胞计数(RBC),红细胞压积(HCT),红细胞分布宽度(RDW-SD)和 RET 升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。雌鼠:给药期结束,低剂量组血小板压积(PCT)降低($P<0.05$);中剂量组 MPV 和 PDW 降低($P<0.01$);高剂量组 RET 和 RET% 升高($P<0.01$);恢复期结束,各指标均未见统计学差异($P>0.05$)。结果见表 2。

表 2 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对幼龄大鼠血液学的影响

指标	性别	阶段	n	溶媒对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
RET/10^9·L^{-1}	雄	d 29	10	414.5 ± 28.7	444.4 ± 40.2	470.0 ± 43.7	477.5 ± 61.6[a]
		d 43	5	252.1 ± 30.0	293.9 ± 20.8	291.3 ± 30.7	341.1 ± 46.0[b]
	雌	d 29	10	276.9 ± 39.0	310.2 ± 60.4	314.8 ± 49.1	380.7 ± 49.1[b]
		d 43	5	174.6 ± 60.7	217.1 ± 25.8	230.3 ± 55.7	212.7 ± 43.0
RET%/%	雄	d 29	10	8.07 ± 0.56	8.13 ± 0.65	8.73 ± 1.00	9.38 ± 1.24[a]
		d 43	5	4.50 ± 0.62	5.04 ± 0.52	5.03 ± 0.52	5.52 ± 0.72
	雌	d 29	10	5.60 ± 0.88	5.87 ± 0.98	6.22 ± 0.92	7.54 ± 1.00[b]
		d 43	5	3.41 ± 1.40	4.15 ± 0.37	4.24 ± 1.03	3.88 ± 0.79

与溶媒对照组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

6 凝血影响

雄鼠:给药期结束,高剂量组凝血酶时间(TT)降低($P<0.01$);恢复期结束,均未见统计学差异($P>0.05$);雌鼠:给药期结束,高剂量组凝血酶原时间(PT)、血浆纤维蛋白原(Fbg)降低($P<0.05$);恢复期结束,低、高剂量组 PT 降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

7 血液生化学影响

雄鼠:给药期结束,低剂量组尿素氮(BUN)和血糖(GLU)降低($P<0.05$),三酯甘油(TRIG)和钙(Ca^{2+})升高($P<0.05$);中剂量组 BUN、肌酐(CREA)、总蛋白(TP)和 GLU 降低($P<0.01$),钙(Ca^{2+})升高($P<0.05$);高剂量组天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酸磷酸激酶(CK)、BUN、CREA、TP、白蛋白(ALB)和 GLU 降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);恢复期结束,各指标均未见统计学差异($P>0.05$)。

雌鼠:给药期结束,高剂量组 AST 降低($P<0.01$);低、中剂量组丙氨酸氨基转移酶(ALT)降低($P<0.01$);低、中和高剂量组 BUN,CREA,GLU 和氯(Cl^-)降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);恢复期结束,各指标均未见统计学差异($P>0.05$)。

8 性发育影响

各剂量组雄鼠包皮腺裂开和雌鼠阴道张开时间均未见统计学差异($P>0.05$)。

9 激素水平影响

雄鼠:给药期结束,低剂量组雌二醇(E_2)水平

升高($P<0.01$);恢复期结束,低、中剂量组 E_2 水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中剂量组睾酮(T)水平降低($P<0.05$)。

雌鼠:给药期结束,低、中剂量组 E_2 水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);恢复期结束,高剂量组 T 水平降低($P<0.05$);低剂量组类胰岛素生长因子-1(IGF-1)升高($P<0.05$),中和高剂量组生长激素(GH)升高($P<0.05$)。

10 尿液

各剂量组尿液指标与溶媒对照组相比均未见统计学差异($P>0.05$)。

11 脏器重量和系数影响

雄鼠:给药期结束,中和高剂量组脑和胸腺重量降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中剂量组胸腺脏体比、脏脑比降低($P<0.05$),睾丸脏体比升高($P<0.05$);高剂量组肝脏、肾脏和睾丸脏体比升高($P<0.01$),胸腺脏体比降低($P<0.01$);恢复期结束,各剂量组脏器重量和系数未见统计学差异($P>0.05$);雌鼠:给药期结束,中和高剂量组肝脏重量、脏体比和脏脑比均升高($P<0.01$);恢复期结束,各剂量组脏器重量和系数未见统计学差异($P>0.05$)。结果见表 3 和表 4。

表 3 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对雄鼠脏器重量和系数的影响 g

脏器	指标	阶段	n	溶媒对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
脑	重量	d 29	10	1.829 ± 0.083	1.802 ± 0.058	1.710 ± 0.084[a]	1.702 ± 0.126[a]
		d 43	5	1.869 ± 0.075	1.875 ± 0.092	1.864 ± 0.106	1.820 ± 0.057
	脏体比	d 29	10	0.842 ± 0.062	0.809 ± 0.043	0.835 ± 0.057	0.886 ± 0.109
		d 43	5	0.632 ± 0.037	0.627 ± 0.015	0.656 ± 0.034	0.670 ± 0.040
肝脏	重量	d 29	10	7.812 ± 0.854	8.289 ± 0.586	7.826 ± 0.389	7.726 ± 0.676
		d 43	5	9.098 ± 0.680	9.565 ± 0.529	9.077 ± 0.498	8.800 ± 0.737
	脏体比	d 29	10	3.579 ± 0.248	3.710 ± 0.153	3.820 ± 0.194	3.998 ± 0.250[b]
		d 43	5	3.071 ± 0.180	3.203 ± 0.169	3.193 ± 0.148	3.229 ± 0.147
	脏脑比	d 29	10	4.270 ± 0.425	4.599 ± 0.296	4.588 ± 0.333	4.570 ± 0.592
		d 43	5	4.874 ± 0.392	5.103 ± 0.169	4.885 ± 0.438	4.842 ± 0.466
胸腺	重量	d 29	10	0.697 ± 0.092	0.636 ± 0.088	0.551 ± 0.049[b]	0.501 ± 0.098[b]
		d 43	5	0.655 ± 0.092	0.624 ± 0.054	0.557 ± 0.058	0.613 ± 0.105
	脏体比	d 29	10	0.319 ± 0.027	0.284 ± 0.032	0.269 ± 0.028[a]	0.260 ± 0.052[b]
		d 43	5	0.221 ± 0.029	0.209 ± 0.009	0.195 ± 0.012	0.225 ± 0.033
	脏脑比	d 29	10	0.381 ± 0.048	0.352 ± 0.042	0.322 ± 0.027[a]	0.297 ± 0.070[a]
		d 43	5	0.352 ± 0.058	0.333 ± 0.022	0.299 ± 0.026	0.338 ± 0.064
肾脏	重量	d 29	10	1.924 ± 0.167	2.047 ± 0.166	1.921 ± 0.105	1.902 ± 0.200
		d 43	5	2.300 ± 0.150	2.315 ± 0.210	2.307 ± 0.203	2.169 ± 0.238
	脏体比	d 29	10	0.882 ± 0.047	0.917 ± 0.071	0.938 ± 0.058	0.983 ± 0.079[b]
		d 43	5	0.776 ± 0.037	0.774 ± 0.043	0.811 ± 0.061	0.795 ± 0.055
	脏脑比	d 29	10	1.051 ± 0.072	1.135 ± 0.073	1.125 ± 0.065	1.123 ± 0.140
		d 43	5	1.232 ± 0.089	1.233 ± 0.065	1.238 ± 0.087	1.191 ± 0.119
睾丸	重量	d 29	10	2.044 ± 0.134	2.130 ± 0.131	2.108 ± 0.144	2.019 ± 0.120
		d 43	5	2.644 ± 0.158	2.734 ± 0.237	2.558 ± 0.139	2.429 ± 0.144
	脏体比	d 29	10	0.941 ± 0.091	0.954 ± 0.046	1.028 ± 0.053[a]	1.047 ± 0.071[b]
		d 43	5	0.893 ± 0.056	0.914 ± 0.055	0.900 ± 0.051	0.896 ± 0.093
	脏脑比	d 29	10	1.119 ± 0.085	1.182 ± 0.074	1.234 ± 0.090	1.191 ± 0.097
		d 43	5	1.415 ± 0.052	1.457 ± 0.075	1.373 ± 0.055	1.337 ± 0.116

与溶媒对照组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;脏体系数 = 脏器重量(g)×100/体重(g);脏脑比 = 脏器重量(g)/脑重(g)

表 4 风叶咳喘平合剂灌胃 4 周对雌鼠脏器重量和系数的影响 g

脏器	指标	阶段	n	溶媒对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
肝脏	重量	d 29	10	6.110 ± 0.552	6.515 ± 0.504	7.342 ± 0.629[b]	6.939 ± 0.470[b]
		d 43	5	6.229 ± 0.861	6.796 ± 0.753	6.539 ± 0.262	6.370 ± 0.529
	脏体比	d 29	10	3.579 ± 0.236	3.877 ± 0.278	4.247 ± 0.296[b]	4.315 ± 0.224[b]
		d 43	5	3.247 ± 0.259	3.403 ± 0.293	3.447 ± 0.102	3.401 ± 0.226
	脏脑比	d 29	10	3.492 ± 0.341	3.896 ± 0.324	4.273 ± 0.368[b]	4.230 ± 0.357[b]
		d 43	5	3.579 ± 0.476	3.816 ± 0.366	3.754 ± 0.313	3.604 ± 0.235

与溶媒对照组相比，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$；脏体比 = 脏器重量(g) × 100/体重(g)；脏脑比 = 脏器重量(g)/脑重(g)

12 病理检查

给药期和恢复期结束，溶媒对照组和高剂量组部分动物出现一些轻度病理改变，如：肝脏轻微小灶性炎细胞浸润；肝细胞内轻微空泡变；肝门管区轻微纤维化，胆小管轻微增生；肾脏乳头管轻度扩张；肺脏泡沫细胞轻微增多；心肌间质轻微灶性炎细胞浸润等；其他如子宫内膜轻度增生，子宫腔中度扩张，子宫腺轻度扩张以及宫颈、阴道鳞状上皮轻度黏液化，附睾管中细胞碎片轻微增多，哈氏腺间质轻度炎细胞浸润、前列腺间质轻度炎细胞浸润等表现，动物数量及病变程度未见组间明显差异。

讨 论

幼龄动物毒性研究的主要目的是确定药物是否影响动物的整体发育，以及对特殊器官或系统的关注。幼龄动物非临床安全性研究受多种因素的影响，年龄的选择是关键，动物初始给药的年龄在发育上需要对应于拟用患者的最小年龄[6]。小儿风叶咳喘平合剂床拟用人群为 2 岁以上儿童，故本研究选择刚离乳(PND_{21})动物开始给药，此时动物年龄与临床拟用儿童年龄相当。

对生长发育的评估是确定性幼龄动物毒性的关键目标，首选大体解剖时对长骨长度(如胫骨和股骨)以及体重和摄食量的评价来进行。除了考察重复给药毒性研究的常规指标外[7-8]，通常还应包括对中枢神经系统的评价(如评估个体发育反射、感觉功能、运动活动与学习记忆测试等)，以及生殖发育和功能的评价[9-10]。

本实验根据上述设定指标进行检测，雄鼠中剂量组 d 17 ~ d 28，高剂量组 d 14 ~ d 38 体重明显降低，雌鼠高剂量组 d 14 和 d 17 体重明显降低，同时伴随着中、高剂量组摄食量的减少，认为大剂量风叶咳喘平合剂可减缓幼龄大鼠体重的增长。

给药期结束，雄鼠中、高剂量组顶臀长缩短，高剂量组胫骨长缩短($P < 0.01$)，中、高剂量组雄鼠胫骨总密度和皮质密度增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；恢复期结束，高剂量组雄鼠顶臀长仍然缩短($P < 0.05$)。综合分析，胫骨总密度和皮质密度增高幅度较小，恢复期已无明显差异，结合本中心同龄大鼠相应的整体数值范围($PND_{49\sim51}$ 雄鼠胫骨总密度：299.6 ~ 370.7 $mg \cdot cm^{-3}$，皮质密度：754.6 ~ 827.1 $mg \cdot cm^{-3}$)，考虑为正常范围的波动，但是综合考虑给药期雄鼠中、高剂量组确有胫骨总密度和皮质密度增加趋势以及顶臀长和胫骨长缩短，认为大剂量风叶咳喘平合剂，对于雄性幼龄大鼠骨骼生长可能会有一定影响，提醒临床大剂量长期给予受试物时注意检测相关指标。

血液学指标结果显示，部分指标如 MPV，PDW，RET，RET% 有所波动，但均未偏离文献报道的同龄大鼠背景数据以及本中心同龄大鼠相应的整体数值范围；组织病理学检查显示：胸骨骨髓红系、粒系和多核巨细胞比例合理；但高剂量 RET 和 RET% 确有增加趋势，提示临床大剂量给予风叶咳喘平合剂时，注意监测血液学指标的变化。

激素检测结果显示，给药期结束，低、中剂量组雌雄动物的 E_2 水平均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，恢复期结束，低和中剂量组雄鼠的 E_2 水平升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，中剂量组睾酮(T)降低($P < 0.05$)；整体看来，雌激素和睾酮无规律性变化，未见明显的剂量-反应关系，同时也均未偏离本中心同龄大鼠相应的整体数值范围(E_2，$PND_{49\sim51}$ 雄鼠：26.7 ~ 91.4 $ng \cdot L^{-1}$；雌鼠：18.4 ~ 63.2 $ng \cdot L^{-1}$；T，$PND_{49\sim51}$ 雄鼠：31.9 ~ 261.6 $ng \cdot L^{-1}$；雌鼠：47.3 ~ 140.9 $ng \cdot L^{-1}$)，同时雄鼠的包皮腺裂开时间和雌鼠的阴道张开时间未见差异，认为灌胃给予风叶咳喘平合剂 4 周，不会对幼龄大鼠的性激素水平造成明

显影响。

各剂量组脏器重量和脏器系数虽然有所波动，但是大部分数值的变化均未偏离本中心同龄大鼠相应的整体数值范围[11-12]，同时血液学和血生化指标未见大幅度改变，组织病理学检查结果显示高剂量组病理改变轻微，与溶媒对照组变化相当；但是，中、高剂量组肝脏、胸腺和睾丸的脏器重量或系数变化趋势较明显，因此考虑大剂量长期灌胃给予受试物，可能会对幼龄大鼠的肝脏、胸腺和睾丸的重量或系数产生一定影响，结合镜下改变，认为尚未引起上述脏器的器质性改变。

综合分析，各剂量组动物均未发现与受试物有关的明显毒性体征表现，生长发育指标（GH，IGF-1和IGFBP-3等生长相关激素）、行为学指标（平衡协调能力、自发活动次数和学习记忆能力）、生殖功能指标（睾丸精子头计数、激素水平和动情周期）、眼科指标、凝血指标、血生化指标、免疫指标（IgM和IgG）、尿液指标以及各主要脏器的镜下组织结构均未见与受试物有关的明显改变；主要毒性表现为中、高剂量组雌雄幼龄大鼠体重降低、摄食量减少、血液学指标（网织红细胞计数RET，RET%增加）、脏器重量、脏体比或脏脑比（胸腺减轻、肝脏增加）有所改变；雄性幼龄大鼠生长发育迟缓（表现为雄鼠顶臀长减少，胫骨长缩短、胫骨总密度和皮质密度增加）；未见明显毒性靶器官；上述表现对雄性幼龄大鼠的影响更加明显。在本实验条件下，认为幼龄SD大鼠4周灌胃给予风叶咳喘平合剂的安全剂量为7.0 $g\cdot kg^{-1}$浸膏（低剂量，相当于79.8 $g\cdot kg^{-1}$生药量），为等效剂量的2.5倍，临床剂量的14.9倍。

受试物提供方曾经开展了成年动物的长期毒性试验，溶媒对照组、低、中和高（生药10.7，21.4和53.5 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$）剂量组分别为临床用量的10，20和50倍，每组30只大鼠，雌雄各半；*qd*，连续30 d，恢复期30 d。结果为给药期结束，高剂量组雄鼠体重降低、摄食量减少、雌鼠平均红细胞容积（MCV）增高，凝血酶原时间（PT）缩短、总胆红素（TBIL）降低、总胆固醇（CHO）升高，停药后上述指标基本恢复正常，认为风叶咳喘平合剂对成年大鼠未见明显的毒性反应。与幼龄动物的给药结果初步比较，可见与成年动物实验的体重、摄食等结果具有一定的一致性，而幼龄动物的重复给药毒性试验增加了更为细致的对生长发育指标（顶臀长、阴道张开时间和骨密度等）的关注，对于儿科临床用药人群的合理用药提供了参考。

[参 考 文 献]

[1] 鹿振辉，张惠勇，张琼，等. 风叶咳喘平合剂治疗急性支气管炎咳嗽（风热犯肺）的随机双盲多中心临床研究[J]. 中成药，2014，36(6)：1151-1155.

[2] 黄芳华，王庆利，RIDINGS J，等. 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] CAPPON GD，BAILEY GP，BUSCHMANN J，*et al*. Juvenile animal toxicity study designs to support pediatric drug development[J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*，2009，86(6)：463-469.

[6] ICH S11. 支持儿科药物开发的非临床安全性评价[EB/OL]. (2020)[2020-09-16]. http://www.cde.org.cn/ichWeb/news/getNewsDetail/2/3ac68cf61f65114d8fce5e9ede086bba/1.

[7] 国家食品药品监督管理总局. 药物重复给药毒性试验技术指导原则[EB/OL]. (2014)[2020-08-31]. http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL1616/101017.html.

[8] 原国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[EB/OL]. (2007)[2020-08-31]. http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=1498.

[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(20)：2473-2482.

[10] 周莉，孙祖越. 非临床安全性评价中离乳前给药的幼龄动物分组设计[J]. 中国新药杂志，2016，25(20)：2483-2488.

[11] 崇立明，杨阳，陈丽芬，等. 幼龄SD大鼠重复给药毒性试验背景数据的建立[J]. 中国新药杂志，2021，30(1)：17-24.

[12] 孙祖越，周莉. 儿科用药非临床安全性研究[M]. 上海：上海科学技术出版社，2020.

编辑：杨青/接受日期：2020-10-23