

刘丽, 戴晓莉, 孙超, 等. 肠胃宁胶囊安全性评价研究[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 93 - 97.
Liu L, Dai XL, Sun C, et al. Safety evaluation of the Chang Wei Ning Capsule [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 93 - 97.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.04.016

肠胃宁胶囊安全性评价研究

刘 丽¹, 戴晓莉², 孙 超², 马玉奎^{2*}

(1. 山东仙河药业有限公司, 山东 东营 2572311; 2. 山东省药科学院新药评价中心, 济南 250100)

【摘要】 目的 研究肠胃宁胶囊单次和重复给药的临床前安全性, 为临床用药提供参考。方法 40 只小鼠分为肠胃宁胶囊组和空白对照组, 每组 20 只小鼠, 肠胃宁胶囊给药剂量为 32 g/kg, 空白对照组给予同体积纯水, 仔细观察动物体征至药后 14 d, 剖检肉眼大体观察各脏器形态。120 只大鼠分为肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 剂量组和空白对照组, 每组 30 只大鼠, 连续灌胃给药 13 周, 分别于给药 13 周和停药后 4 周时取部分大鼠进行血液学指标、血液生化学指标、病理组织学检查。结果 肠胃宁胶囊以 32 g/kg 剂量单日灌胃给药, 药后观察至第 14 天小鼠未见明显毒性反应。肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 剂量连续灌胃给药 13 周, 大鼠体重、血液学、血液生化学指标及组织病理学未见明显毒性反应。结论 肠胃宁胶囊小鼠单次给药最大给药量为 32 g/kg; 大鼠重复给药 13 周最大无毒反应剂量大于 9 g/kg。

【关键词】 肠胃宁胶囊; 单次给药毒性; 重复给药毒性; 最大给药量; 最大无毒反应剂量

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 04-0093-05

Safety evaluation of the Chang Wei Ning Capsule

LIU Li¹, DAI Xiaoli², SUN Chao², MA Yukui^{2*}

(1. Shandong Xianhe Pharmaceutical Co. Ltd., Dongying 257231, China.

2. New Drug Evaluation Center of Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250100)

【Abstract】 **Objective** To study the safety of the Chang Wei Ning Capsule and to provide a reference for clinical application. **Methods** Forty mice (males and females) were randomly divided into a Chang Wei Ning Capsule group and a normal control group, each containing twenty mice. Mice of the test group received 32 g/kg body weight Chang Wei Ning Capsule, while those of the control group received the same volume of pure water. A detailed observation of the mice, including examination of viscera morphology by naked eye, was conducted until day 14 post-drug administration. One hundred and twenty rats (males and females) were randomly divided into a normal control group and three different Chang Wei Ning Capsule dosage groups (9, 3, 1 g/kg bodyweight). The rats received consecutive intragastric administrations of Chang Wei Ning Capsule over a 13-week period. In addition to observing the general condition of the animals, body weight, blood, hepatic function and renal function measurements, and a histopathology analysis, were performed after the 13 week treatment duration and at four weeks-post drug withdrawal. **Results** No toxic reaction was observed in mice that received intragastric administrations of Chang Wei Ning Capsule (32 g/kg). No abnormal reaction was also observed in the rats of all dosage groups that received intragastric Chang Wei Ning Capsule over a 13-week period. **Conclusions** The maximum administered dose of Chang Wei Ning capsule in mice was 32 g/kg body weight in a single-dose toxicity test. No observed adverse effects were observed in rats receiving up to 9 g/kg drug per day in repeated-dose toxicity tests.

[基金项目] 中央引导地方科技发展专项(CXLC161906, 创新药物临床前评价公共服务平台)。
[作者简介] 刘丽(1976—), 女, 本科, 主管中药师, 研究方向: 药物警戒。E-mail: 513688702@qq.com
[通信作者] 马玉奎(1975—), 男, 博士, 主任药师, 新药药理毒理评价。E-mail: mayk@sdapsjpl.cn

【Keywords】 Chang Wei Ning capsule; single dose toxicity; repeated dose toxicity; maximal feasible dose; no observed adverse effect level

肠胃宁胶囊是由党参、白术、黄芪、赤石脂、干姜(炭)、木香、砂仁、补骨脂、葛根、防风、白芍、延胡索、当归、儿茶、罂粟壳、甘草(炙)等组成的中药复方制剂,具有健脾益肾、温中止痛及涩肠止泻的功效。该制剂主要用于脾肾阳虚所致的泄泻,症见大便不调、五更泄泻、时带黏液、伴腹胀腹痛、胃脘不舒和小腹坠胀等^[1-2]。近年来,随着中药在临床上的广泛应用,不良反应事件频发,中药的安全性越来越受到重视,但因其成分复杂,给不良反应的监控带来了诸多困难^[3]。故需要反过来从基础研究入手,进一步研究中药的安全性。因肠胃宁胶囊上市前未开展毒理学评价研究,国内无相关临床前安全性信息,为保证临床用药的安全性,指导临床合理用药,保障适用人群的用药安全,故对肠胃宁胶囊的临床前安全性重新评价。本文在 GLP 条件下,利用 SPF 级小鼠、大鼠为实验动物,经单次和重复给药,对其进行了临床前安全性评价研究,为该药品的临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级昆明小鼠 40 只,体重(20 ± 2) g, SPF 级 SD 大鼠 120 只,体重(210 ± 10) g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。实验动物饲养于山东省药学院新药评价中心 SPF 级动物房[SYXK(鲁)2014-0008],环境温度 $20^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$,日温差 $\leq 4^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~70%,换气次数每小时 8~10 次,动物自由饮食饮水。本实验遵循实验动物使用的 3R 原则,对动物给予人道主义关怀[IACUC 审批编号:IACUC-059]。

1.2 主要试剂与仪器

肠胃宁胶囊(山东仙河药业有限公司,批号:80930D4)。戊巴比妥钠(德国默克公司,批号:170108);生化分析仪所用试剂盒(上海执诚生物技术有限公司);生化分析仪、血液分析仪所用质控液(英国 RANDOX 实验室有限公司);电解质分析所用试剂、质控液(日立仪器(苏州)有限公司);凝血酶原时间、凝血酶时间试剂(上海太阳生物技术有限公司);凝血质控血浆(Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH 公司);血液分析仪所用试剂(Sysmex Corporation 公司)。

SYSMEX XT-2000IV 全自动血球计数仪(日本 Sysmex 公司)、日立 7180 全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术)、JY2001 型电子天平(奥豪斯仪器常州有限公司)、TDL-5 台式低速大容量离心机(江苏金坛市医疗仪器厂);NP-B 型生物组织包埋机(湖北诺普医疗器械有限公司);TK-218 摊烤片机(湖北泰维医疗器械有限公司);樱花 VIP-6 型生物组织脱水机(日本樱花公司);RM2235 切片机、DMLS2 显微镜(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠单次给药毒性试验

(一)剂量设计依据

根据药物非临床安全性研究技术指导原则确定试验剂量^[4]。肠胃宁胶囊临床用药剂量为一日 3 次,一次 4~5 粒,每粒 0.3 g,故人用日最大剂量为 4.5 g,按照成人体重为 60 kg 计算,为 0.075 g/kg。按照等效剂量折算系数计算小鼠等效剂量约为 0.7 g/kg。

肠胃宁胶囊内容物最大溶解度为 0.4 g/mL,小鼠最大灌胃体积为 40 mL/kg,故可采用最大给药浓度和最大给药体积给予小鼠,即单次给药 16 g/kg,一日给药 2 次,总剂量为 32 g/kg。

(二)实验方法

SPF 小鼠 40 只,给药前禁食约 12 h,空腹后按体重均衡原则分为 2 组,即空白对照组和肠胃宁胶囊组。肠胃宁胶囊组按照 40 mL/kg 给药容积灌胃给予 0.4 g/mL 浓度的药物混悬液,给药 2 次,间隔约 6 h,空白对照组给予等容积的纯水。给药后详细观察动物的外观反应,分别于药后 3、7、10、14 d 称量动物体重,每天观察 1 次,连续观察 14 d。观察结束,戊巴比妥钠安乐处死小鼠后剖检,肉眼观察心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等主要脏器有无分泌物(或渗出物)、淤血、出血、水肿、坏死等肉眼可见病变,如有病变组织需进行毒性病理学检查。

1.3.2 大鼠重复给药毒性试验

(一)剂量设计依据

根据药物临床前研究技术指导原则确定试验剂量^[4]。肠胃宁胶囊临床用药剂量为一日 3 次,一次 4~5 粒,每粒 0.3 g,故人用日最大剂量为 4.5 g,按照成人体重为 60 kg 计算,为 0.075 g/kg。按照等效剂量折算系数计算大鼠的等效剂量约为 0.5 g/kg。重

复给药毒性试验目的为尽可能暴露药物的毒性,故考虑到本品毒性较小及给药可操作性,高剂量可采用 0.3 g/mL 给药浓度和 15 mL/kg 给药容积,一日 2 次灌胃给药。选用高剂量的 1/3 和 1/9 作为则中、低剂量,三个剂量分别为 9、3、1 g/kg,分别相当于药效学剂量的 18、6 和 2 倍,临床人用剂量的 120、40 和 13 倍。

(二)实验方法

SPF 大鼠 120 只,按体重均衡原则^[5-6]分为 4 组,即空白对照组和肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 三个剂量组,每组 30 只动物,雌雄各半。各组灌胃给予相应剂量的药物混悬液 15 mL/kg,空白对照组给予等容积的纯水。大鼠上下午各给药 1 次,间隔约 6 h,连续给药 13 周,停药恢复 4 周。每次给药前后详细观察动物的外观反应,每周称量 1 次体重和摄食量。给药 13 周结束各组取 20 只大鼠,恢复 4 周结束各组取剩余 10 只大鼠,戊巴比妥钠麻醉后腹主动脉采血,进行血液学及血液生化学检查。剖检摘取各脏器,其中心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、睾丸、附睾、子宫、卵巢、肾上腺、胸腺主要脏器需称量。所有脏器中性甲醛溶液固定后进行毒性病理学检查。

1.3.3 检测指标

血液学指标:白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、血小板(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)、红细胞平均体积(MCV)、平均血红蛋白量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、中性细胞比率(NEUT%)、淋巴细胞比率(LYMPH%)、嗜酸性粒细胞比率(E0%)、嗜碱性粒细胞比率(BASO%)、单核细胞比率(MONO%)、红细胞分布宽度-变异系数(RDW-CV)、网织红细胞比率(RET%)、凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)。

血液生化学指标:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天

门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、总蛋白(TP)、总胆固醇(TC)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、肌酐(CR)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、肌酸激酶(CK)、钠离子(Na⁺)、钾离子(K⁺)、氯离子(Cl⁻)。

病理检查器官或组织:脑、心脏、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、睾丸、附睾、甲状腺、胸骨、脊髓(颈、胸、腰段)、甲状旁腺、食管、气管、颌下腺、胃、小肠、大肠、直肠、胰腺、主动脉、淋巴结、坐骨神经、膀胱、前列腺、垂体。

1.4 统计学方法

试验数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 DAS 2.0 统计软件对定量数据进行单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠单次给药毒性试验

小鼠灌胃给予肠胃宁胶囊后当日及连续观察 14 d 内未见明显毒性反应,肠胃宁胶囊各剂量组动物体重增长与同期空白对照组基本一致。观察期结束后剖检小鼠,各主要脏器色泽、形态均正常,触及无结节,均未发现肉眼可见异常,故未进行组织病理学检查。故本试验条件下,小鼠最大给药量为 32 g/kg。小鼠体重数据见下表 1。

2.2 大鼠重复给药毒性试

试验结果显示,所有动物均未出现任何毒性反应。大鼠连续灌胃给药 13 周及恢复 4 周检测结果显示,与空白对照组比较,肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 三个剂量组大鼠体重、摄食量、血液学、血液生化学及脏器相对重量均无明显差异($P>0.05$)。病理学检查结果显示,所有大鼠所有脏器均未出现药物相关性病理组织学病变。给药 13 周大鼠主要检测指标见表 2 和表 3,肝、肾病理图片见图 1。

表 1 肠胃宁胶囊对小鼠体重的影响($\bar{x}\pm s, n = 20, g$)
Table 1 The effects of Chang Wei Ning capsule on the body weight in mice

组别 Groups	空白对照组 Normal group	肠胃宁胶囊组 Chang Wei Ning capsule group
药前-空腹 Before-drug - fasting	20.15±0.90	20.15±0.97
药后 3 d Post-drug 3 d	25.51±0.99	25.61±1.01
药后 7 d Post-drug 7 d	29.03±1.44	29.33±0.96
药后 10 d Post-drug 10 d	31.905±1.55	32.27±1.25
药后 14 d Post-drug 14 d	35.765±1.35	35.87±1.46

表 2 肠胃宁胶囊重复给药 13 周对 SD 大鼠血液学的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

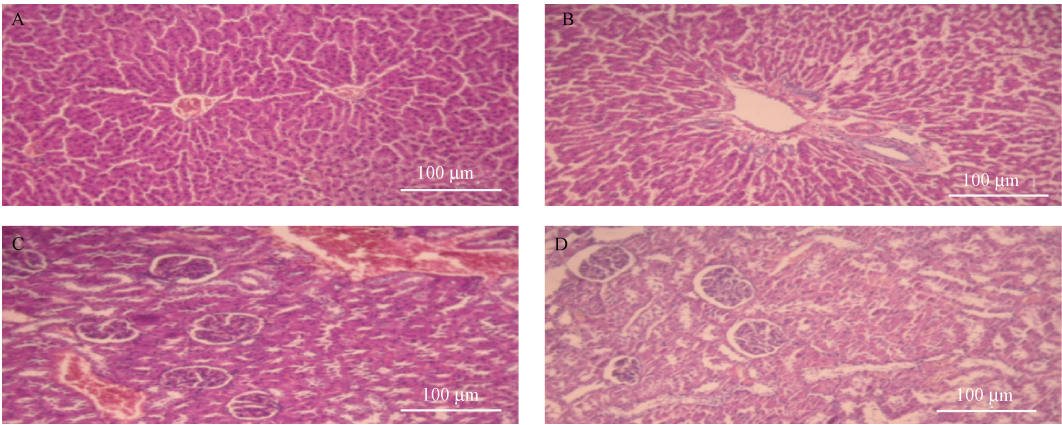
Table 2 The effects of Chang Wei Ning capsule on hematology in rats

组别 Groups	空白对照组 Normal group	肠胃宁胶囊组 Chang Wei Ning capsule group		
		9 g/kg	3 g/kg	1 g/kg
白细胞 WBC ($10^9/L$)	5.9±1.6	7.4±4.6	6.4±0.5	6.8±1.7
红细胞 RBC ($10^{12}/L$)	8.6±0.3	8.5±0.7	8.7±0.2	8.4±0.2
血红蛋白 HGB (g/L)	142±5	139±10	144±5	142±4
血小板 PLT ($10^9/L$)	1018±87	1021±129	1006±90	1080±121
凝血酶原时间 PT(s)	13.3±0.5	13.3±0.4	13.2±0.3	13.5±0.7
活化部分凝血活酶时间 APTT (s)	13.4±1.3	12.5±1.3	12.1±1.6	13.3±1.4
凝血酶时间 TT (s)	35.8±0.7	35.8±1.9	34.9±1.9	37.0±1.5

表 3 肠胃宁胶囊重复给药 13 周对 SD 大鼠血液生化学的影响($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 3 The effects of Chang Wei Ning capsule on blood biochemistry in rats

组别 Groups	空白对照组 Normal group	肠胃宁胶囊组 Chang Wei Ning capsule group		
		9 g/kg	3 g/kg	1 g/kg
丙氨酸氨基转移酶 ALT (U/L)	37±17	36±19	38±16	36±8
天门冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	101±20	99±26	98±17	98±25
总蛋白 TP (g/L)	63±3	62±4	63±3	61±3
白蛋白 ALB (g/L)	30±4	30±2	31±3	29±3
葡萄糖 GLU (mmol/L)	7.5±0.6	7.5±0.4	7.2±0.7	7.1±0.6
尿素氮 BUN (mmol/L)	4.8±0.5	5.0±0.6	4.8±0.8	5.2±0.4
肌酐 CREA (umol/L)	30.5±5.1	30.0±3.7	30.9±4.0	28.0±3.3
总胆固醇 TC (mmol/L)	1.8±0.3	1.8±0.3	1.8±0.3	1.8±0.4



注:A:肠胃宁胶囊高剂量组-肝;B:空白对照组-肝;C:肠胃宁胶囊高剂量组-肾;D:空白对照组-肾。

图 1 给药 13 周时小鼠肠胃宁胶囊高剂量组及空白对照组组织病理学图片(×10, HE 染色)

Note. A, High dosage of Chang Wei Ning capsule group, liver. B, Normal control group, liver. C, High dosage of Chang Wei Ning capsule group, kidney. D, Normal control group, kidney.

Figure 1 Histopathological images of Chang Wei Ning capsule and normal control mice during 13week administration(HE staining)

3 讨论

单次给药毒性(急性毒性, single dose toxicity)是指一天内一次或者多次将受试药物给予动物后产生的毒性反应。其目的是初步探索药物的毒性作用和毒性靶器官。临床上药物过量导致的急性中毒相关信息可从此试验研究结果中获得。单次

给药毒性试验研究常用 LD50 法、最大耐受量、最大给药量、限度试验等方法^[6]。对于毒性较小的药物,最常用的方法为最大给药量法,是指动物单次或 24 h 内多次(2~3 次)给药所采用的最大给药剂量。肠胃宁胶囊内容物最大溶解度为 0.4 g/mL,小鼠最大灌胃体积为 40 mL/kg,故可给予小鼠的最大给药量为 16 g/kg,一日可给药 2 次。本试验结果显

示,本品在日最大给药量(MFD)32 g/kg 时小鼠未见任何不良反应,相当于小鼠药效学等效剂量的 46 倍左右,临床人用剂量的 427 倍左右。

重复给药毒性试验研究(repeated dose toxicity)是药物临床前安全性评价最主要内容,通过将药物按照临床用药途径大剂量重复多次给予动物,密切检测动物产生的毒性反应和中毒靶组织器官,能够获得毒性产生的量效和时效关系,预测药物在临床上可能出现的毒性反应性质及发生率,对药物的临床应用具有重要的参考意义^[4,7]。本文 SD 大鼠重复给药毒性试验结果表明,肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 三个剂量下对大鼠体重、摄食量、血液学、血液生化学及脏器相对重量均无明显影响。病理学检查结果亦显示,以上剂量下未见明显的毒性靶器官。从试验结果可得大鼠重复给药 13 周最大无毒反应剂量(NOAE)大于 9 g/kg,此剂量相当于大鼠药效学等效剂量的 18 倍,临床人用剂量的 120 倍。

综上所述,通过本研究结果可得肠胃宁胶囊小鼠单次给药最大给药量(MFD)为 32 g/kg;大鼠重复给

药 13 周最大无毒反应剂量(NOAE)大于 9 g/kg。提示本品临床应用安全范围较大,安全窗较宽。

参考文献:

- [1] 苗明三,刘同祥,孙艳红,等.肠胃宁片对大、小鼠结肠炎模型的影响[J].中药药理与临床,2003,19(5):41-42.
- [2] 牛洪辉,杨亚蕾,苗明三,等.肠胃宁片镇痛作用和对肠蠕动的影响[J].时珍国医国药,2009,20(10):2499-2500.
- [3] 曹明成,黄泰康.我国有毒中药的研究进展综述[J].中国药业,2016,25(2):9-13.
- [4] 药物非临床安全性研究技术指导原则[S].国家食品药品监督管理局药品审评中心,2014:21-33.
- [5] 张颖,马玉奎,戴晓莉,等.多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液大鼠重复给药毒性的比较[J].中国比较医学杂志,2016,26(6):23-27.
- [6] 李波,袁伯俊,廖明阳.药物毒理学[M].北京:人民卫生出版社.2015:523-525.
- [7] 戴晓莉,戴学栋,郭峰,等.注射用右旋雷贝拉唑钠大鼠 13 周重复给药毒性研究[J].中国药物警戒,2016,13(7):389-393.

[收稿日期] 2018-11-20

(上接第 92 页)

- [3] Li C, Xu M, Wu Y, et al. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanyl anesthesia: a randomized controlled study [J]. Anesthesiology. 2014, 121(2):249-259.
- [4] 韩冲芳,贺建东,王晓鹏,等.七氟醚预处理联合后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响[J].临床麻醉学杂志,2015,31(06):592-596.
- [5] 陈红生,曹苏.七氟醚后处理对大鼠脑缺血-再灌注后炎症因子水平的影响[J].江苏医药,2016,42(15):1641-1643.
- [6] 陈海娥,马迎春,何金波,等.缺血后处理对肺缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制[J].中国应用生理学杂志,2014,30(3):251-256.
- [7] 卢孙山,顾健腾,鲁开智,等.七氟醚预处理在单肺通气肺缺血再灌注损伤中的保护作用[J].第三军医大学学报,2018,40(02):155-159.
- [8] Luo C, Yuan D, Zhao W, et al. Sevoflurane ameliorates intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury by inhibiting the synergistic action between mast cell activation and oxidative stress[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1):1082-1090.
- [9] 孙鸿然,苟杨,刘丹彦.亚甲蓝预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J].重庆医科大学学报,2018,43(03):426-431.
- [10] Ding Y, Chen M, Wang M, et al. Posttreatment with 11-keto-β-

boswellic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: Nrf2/HO-1 pathway as a potential mechanism [J]. Mol Neurobiol, 2015, 52(3):1430-1439.

- [11] 庞勇.七氟醚预处理对缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用及机制研究[J].现代预防医学,2015,42(21):3959-3961.
- [12] 杨黄恬,王志华,刘金龙,等.线粒体在心肌缺血再灌注损伤与保护中的重要作用[J].中国病理生理杂志,2015,31(10):1822.
- [13] Breuer T, Maes K, Rossaint R, et al. Sevoflurane exposure prevents diaphragmatic oxidative stress during mechanical ventilation but reduces force and affects protein metabolism even during spontaneous breathing in a rat model[J]. Anesth Analg, 2015, 121(1):73-80.
- [14] 盛琼,翁平,张晓彤,等.亚甲蓝减轻大鼠离体心脏缺血/再灌注引起的线粒体损伤[J].中国病理生理杂志,2017,33(04):711-716.
- [15] Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From mitochondrial function to neuroprotection—an emerging role for methylene blue[J]. Mol Neurobiol, 2017, 55(6):5137-5153.
- [16] 黄剑峰,冼海燕,侯小琼.七氟醚对新生大鼠神经干细胞的增殖作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(07):24-27,42.

[收稿日期] 2018-09-18