

吕晗莹,宋翼升,王汉波,等. 去壁灵芝孢子粉幼龄大鼠安全性评价研究[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 21-30.

Lyu HY, Song YS, Wang HB, et al. Safety evaluation of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder in juvenile rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 21-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.004

去壁灵芝孢子粉幼龄大鼠安全性评价研究

吕晗莹¹, 宋翼升¹, 王汉波², 李振皓², 徐靖², 张城达¹, 杨倩¹,
刘靖¹, 谢锋¹, 黄敏聪¹, 陈云祥¹, 张立将^{1*}

(1. 杭州医学院(浙江省医学科学院)安全性评价研究中心, 杭州 310053; 2. 金华寿仙谷药业有限公司, 浙江 金华 321299)

【摘要】 目的 研究去壁灵芝孢子粉6周重复给药对幼龄大鼠各系统发育的影响及其毒性反应。**方法** 24日龄(postnatal day, PND24)幼龄SD(Sprague-Dawley)大鼠128只,采用体重均衡法分为溶媒对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组32只,雌雄各半,经口灌胃分别给予纯水、去壁灵芝孢子粉0.8、1.8和4.0 g/kg剂量,给药体积均为10 mL/kg,每天给药1次,连续给药6周(42 d),于停药次日、停药4周分别剖检每组雌雄大鼠10/16只、6/16只;检测常规毒性指标和生长发育、骨骼发育、行为学、性激素、免疫系统发育等指标。**结果** 去壁灵芝孢子粉各剂量对幼龄SD大鼠临床症状、体重、摄食、性征发育、行为学、血液学、血清生化学、眼科、生长激素、性激素、骨骼系统发育、免疫学、组织病理学等指标均未见明显毒性影响;仅出现以高剂量为主的雌雄大鼠部分尿液指标可逆性异常(停药4周后恢复正常),考虑与供试品成分或其代谢产物经尿液排泄有关;各剂量组水迷宫实验中潜伏期时间减少、空间探索测定目标象限内时间百分比增加,提示学习记忆能力增强,考虑不排除可能与其药理学作用有关。**结论** 去壁灵芝孢子粉对幼龄SD大鼠未见明显毒性反应,未观察到不良反应剂量(no-observed adverse effect level, NOAEL)为4.0 g/kg。

【关键词】 去壁灵芝孢子粉;儿科药物;幼龄动物试验;重复给药毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0021-10

Safety evaluation of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder in juvenile rats

LYU Hanying¹, SONG Yisheng¹, WANG Hanbo², LI Zhenhao², XU Jing², ZHANG Chengda¹, YANG Qian¹,
LIU Jing¹, XIE Feng¹, HUANG Mincong¹, CHEN Yunxiang¹, ZHANG Lijiang^{1*}

(1. Center of Safety Evaluation, Hangzhou Medical College (Zhejiang Academy of Medical Sciences), Hangzhou 310053, China.

2. Jinhua Shouxiangu Pharmaceutical Co., Ltd., Jinhua 321299)

【Abstract】 Objective To explore the effects and toxicity of repeated administration of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder for 6 weeks on the development of various systems in juvenile rats. **Methods** One hundred twenty-eight juvenile SD rats aged 24 days (postnatal day, PND24) were divided into vehicle control, low-dose, medium-dose and high-dose groups by the weight balance method. Each group was composed of 32 rats (half male and half female), and received pure water or wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder 0.8, 1.8 and 4.0 g/kg doses by gavage, respectively, each in a volume of 10 mL/kg, once a day for 6 consecutive weeks (42 d). The day after drug withdrawal and 4 weeks after drug withdrawal, 10/16 and 6/16 rats in each group were necropsied, and routine toxicity indicators and

【基金项目】 浙江省重点研发计划项目(2020C03053, 2021C03077); 浙江省基础公益研究计划项目(LGF18H310004); 浙江省实验动物科技计划项目(2018C37127)。

【作者简介】 吕晗莹(1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 幼龄动物毒理学。E-mail: 15168236539@163.com

【通信作者】 张立将(1981—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药物毒理学研究和评价。E-mail: zhanglj127@163.com

indicators of growth and development, bone development, behavior, sex hormones, immune system development, and other indicators were detected. **Results** Each dose of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder had no significant toxic effects on the clinical symptoms, weight, food intake, sexual development, behavior, hematology, serum biochemistry, ophthalmology, growth hormones, sex hormones, skeletal system development, immunology, histopathology, or other indicators of juvenile SD rats. However, the rats in the high-dose group had reversible abnormalities in some urine indicators (all returned to normal after 4 weeks of drug withdrawal), which was considered to be related to the urine excretion of the test product components or their metabolites. In the water maze test of each dose group, the incubation period decreased, and the percentage of time in the target quadrant, as measured by space exploration, increased, suggesting that the learning and memory ability was enhanced, which may be related to its pharmacological effects. **Conclusions** Wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder has no obvious toxic effects in juvenile SD rats, and the NOAEL was 4.0 g/kg.

【Keywords】 wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder; pediatric drugs; juvenile animal study (JAS); repeated dose toxicity

灵芝孢子粉是灵芝生长后期从其菌褶中生长的微小卵形生殖细胞,即灵芝的种子,其在生物学上也被称为“担孢子”^[1]。灵芝孢子粉的化学成分主要包括多糖类、三萜类、蛋白质、甾醇类、核苷类、微量元素等,其中总三萜、总多糖被认为是主要的活性成分^[2]。已有大量研究表明,灵芝孢子粉具有提高免疫^[3-4]、抗肿瘤^[5-6]、护肝^[7]、抗氧化^[8]等功效。灵芝孢子壁主要由几丁质等成分构成,不易消化;为提高生物利用度,发展了灵芝孢子破壁技术,其药效也明显提高,但目前国内外的破壁技术不能去除残留的孢子壁,其有效成分含量并没有显著提高^[9]。而新兴的去壁技术能将非药用、约占孢子粉 2/3 重量的孢子壁有效分离,获得的去壁灵芝孢子粉活性物质大幅度提高^[4,10]。

目前尚未见灵芝孢子粉在儿童及幼龄动物安全性方面的相关报道,为了推广去壁灵芝孢子粉的应用范围、增加儿童适用人群,考察评估去壁灵芝孢子粉在儿童应用中的安全性,作者开展了幼龄大鼠安全性评价试验。通过考察连续给予幼龄 SD 大鼠去壁灵芝孢子粉 6 周(停药恢复 4 周)可能产生的不良反应以及对幼龄动物的性发育、行为学(学习记忆)、骨骼发育等影响,确定未观察到不良反应剂量,判断“去壁灵芝孢子粉”对幼龄大鼠重复给药的毒性靶器官或靶组织,为儿科用药的临床试验及临床应用提供参考数据,并提示临床中可能需重点监测的指标。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 128 只, PND24, 雌雄各半, 雄鼠重 34.1~48.8 g, 雌鼠重 35.2~46.5 g, 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-

0001], 动物饲养于浙江省医学科学院安全性评价研究中心屏障系统动物房[SYXK(浙)2017-0010]。本试验通过实验动物管理和使用委员会(IACUC)审核动物伦理(GLP-2020-035), 符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

去壁灵芝孢子粉(金华寿仙谷药业有限公司, 批号:20200301, 含量:粗多糖(以葡萄糖计)21.4 g/100 g, 总三萜(以齐墩果酸计)5.7 g/100 g), 棕褐色粉末, 溶于水, 临用前用纯水配制成给药浓度。

生化检测试剂(德国 DiaSys Diagnostic Systems GmbH); 血液学检测试剂(Siemens); 大鼠生长激素、大鼠睾酮、大鼠雌二醇 ELISA 试剂盒(Elabscience)。

Top Scan 动物行为分析系统(CSI 公司); CA-1500 全自动血凝分析仪(日本 Sysmex); 7100 全自动生化分析仪(日本日立); N-600 尿液分析仪(长春迪瑞); ADVIA2120 全自动血细胞分析仪(美国 Bayer); Welch Allyn 12500-YD 双目间接检眼镜(美国伟伦)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和剂量设计

采用体重均衡法随机将大鼠分为溶媒对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 32 只, ♀♂各半, 分别经口灌胃给予纯水、去壁灵芝孢子粉 0.8、1.8 和 4.0 g/kg, 给药体积均为 10 mL/kg, PND24 开始给药, 每天给药 1 次, 连续给药 6 周, 停药后恢复观察 4 周。

1.3.2 检测指标

试验期间每天观察大鼠的一般情况; 大鼠摄食量和体重在给药期间称量 2 次/周, 恢复期称量 1 次/周; 雄鼠和雌鼠分别于 PND39~PND46 和 PND28~PND36, 每天进行性征发育观察(龟头包皮分离/阴道张开情况); 停药检查和恢复期结束检查

分别进行行为学评价(全部大鼠)、水迷宫实验(6只/性别/组);停药检查和恢复期结束时分别随机抽 80 只(每组 20 只,♀♂各半)和 48 只(每组 12 只,♀♂各半),并进行常规重复给药毒性指标以及生长发育相关毒性指标检查,主要包括一般反应(外观体征、行为活动、粪尿性状、死亡情况等),生长发育指标(体重、摄食量、性征发育),行为学(一般行为学评价;改良 Irwin's 行为学评价方法;学习记忆能力;Morris 水迷宫实验),血液学,凝血指标,血清生化,尿液指标,眼科检查指标,激素相关指标(生长激素、雌二醇、睾酮),骨骼检查指标,组织病理学(心脏、脾、肺、肝、肾、肠道、脑(大脑、小脑、脑干)、垂体、胸腺等 40 种脏器组织)。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 进行统计学分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,选用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析;计数资料选用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)进行显著性分析;显著性检验水准 α 为 0.05。

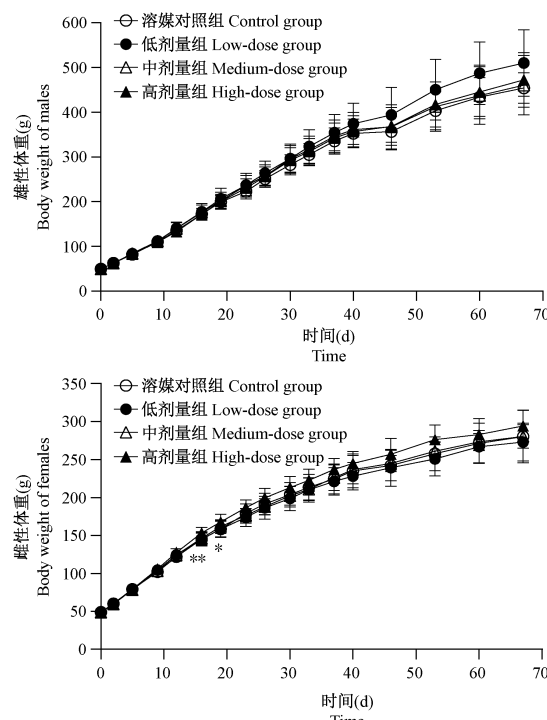
2 结果

2.1 一般情况、体重和摄食量

整个实验期间,各组雌雄大鼠均未见明显异常反应,未出现动物死亡或濒死。各剂量组雌雄大鼠体重及摄食量均未见明显毒性影响,仅高剂量组雌鼠给药第 16、19 天的体重、高剂量雄鼠第 4 天、低剂量组雄鼠第 45 天的摄食量高于溶媒对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余给药时期和恢复期各组雌雄大鼠的体重、摄食量均未见明显变化($P > 0.05$),如图 1 和图 2 所示。上述体重、摄食量变化幅度较小,无明显剂量-时效关系,且体重和摄食量增加一般均非毒性表现,结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据、长期研究经验等其他各方面因素,故考虑为无明显毒理学意义。

2.2 血液学

各剂量去壁灵芝孢子粉对雌雄大鼠的血液学指标均未见明显毒性影响。仅出现个别指标的波动:停药时,中剂量组雌鼠的活化部分凝血酶时间低于相应时间的溶媒对照组($P < 0.01$);恢复期结束时,低剂量组雄鼠的凝血酶原时间和高剂量组雌鼠的平均血小板体积高于相应时间的溶媒对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),低剂量组雌鼠的纤维蛋白原和高剂量组雄鼠的红细胞体积分布宽度低于相应时间



注:与溶媒对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下同。

图 1 去壁灵芝孢子粉对幼龄 SD 大鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same as below.

Figure 1 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on body weight of juvenile SD rats

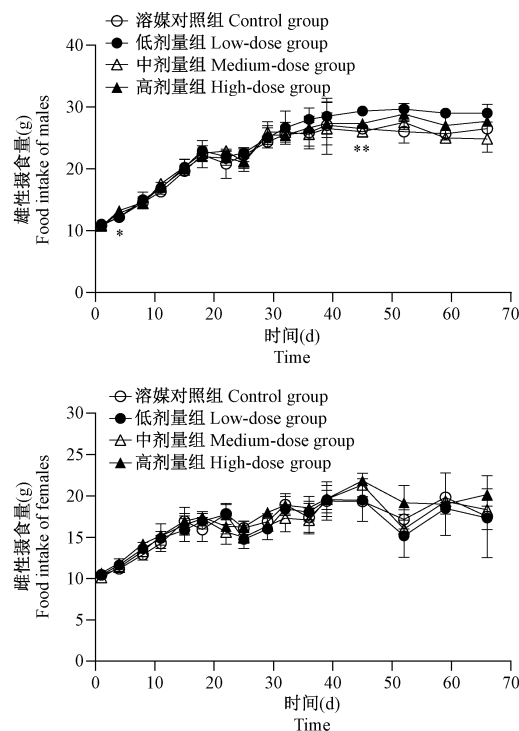


图 2 去壁灵芝孢子粉对幼龄 SD 大鼠食物摄入的影响。

Figure 2 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on food intake of juvenile SD rats

的溶媒对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 如表 1 所示。但上述异常指标的波动幅度小, 无明显剂量反应关系, 且与凝血、红细胞相关的其他指标均未见显著性异常, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据等各方面因素, 考虑无毒理学意义。

2.3 血清生化学

各剂量去壁灵芝孢子粉对雌雄大鼠血液学指标均未见明显毒性影响。仅出现个别指标的波动: 停药时, 高剂量组雄鼠的 Na^+ 、雌鼠的 Cl^- 和中剂量组雌鼠的 Cl^- 高于相应时间的溶媒对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 中剂量组雌鼠的肌酐和高剂量组雌鼠的肌酐、肌酸磷酸激酶低于相应时间的溶媒对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 如表 2 所示。但上述异常指标的波动幅度较小, 且无明显的剂量-反应关系, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据等各方面因素, 考虑无毒理学意义。

2.4 尿液、眼科检查

去壁灵芝孢子粉对停药检查时各剂量组雌雄

大鼠尿液指标有一定的异常影响: 停药时, 高剂量组雌雄大鼠的尿胆原、胆红素、蛋白质、酮体、比重、维生素 C、微白蛋白和中剂量组大鼠的微白蛋白、白细胞高于相应时间的溶媒对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 低、中、高剂量组雌雄大鼠的 pH 值均低于相应时间的溶媒对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 恢复期结束时, 各组上述指标均恢复至正常, 如表 3 所示。上述尿液指标存在剂量-反应关系, 但在停药后均可恢复至正常, 考虑可能与服用大量高浓度的去壁灵芝孢子粉后随尿液排出的药物原型或代谢产物的理化性质有关, 结合肾功能相关血清生化指标和肾组织病理学检查结果未见明显异常, 且上述异常波动范围较小, 结合统计学结果和生物学/临床意义、长期研究经验等其他各方面因素, 故综合考虑其无明显的毒理学/临床意义。

眼科检查未见与去壁灵芝孢子粉相关的明显异常影响。

表 1 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠血液学的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on hematology in juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
停药检查 Drug withdrawal period	活化部分凝血酶时间(s)	♂	15.7±1.2	15.3±0.5	15.5±0.9	16.1±1.1
	APTT	♀	17.6±0.7	17.3±0.8	16.2±0.9**	16.9±0.8
	红细胞体积分布宽度(%)	♂	12.1±0.5	11.7±0.4	11.6±0.5	11.3±0.4**
	RDW	♀	11.2±0.1	11.0±0.1	11.2±0.3	11.1±0.2
恢复期结束检查 End of recovery period	平均血小板体积(fL)	♂	9.5±0.7	9.5±0.4	9.0±0.6	9.6±0.2
	MPV	♀	9.0±0.6	9.4±0.3	8.9±0.3	9.7±0.4*
	凝血酶原时间(s)	♂	10.8±0.5	11.7±0.9*	11.1±0.5	10.6±0.4
	PT	♀	9.1±0.6	9.5±0.4	9.9±0.7	9.1±0.3
	纤维蛋白原(g/L)	♂	2.1±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.0±0.1
	Fbg	♀	1.9±0.0	1.6±0.1*	1.7±0.1	1.8±0.1

注: $n=10$ (停药期), $n=6$ (恢复期结束)。与溶媒对照组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. $n=10$ (Drug withdrawal period), $n=6$ (End of recovery period). Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 2 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠血清生化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on serum biochemistry in juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
停药检查 Drug withdrawal period	肌酐($\mu\text{mol/L}$)	♂	41.8±2.4	39.7±2.5	38.6±3.3	38.1±6.0
	Crea	♀	43.5±3.2	42.7±5.2	38.9±3.1*	39.3±3.5*
	肌酸磷酸激酶(IU/L)	♂	817.6±125.4	772.8±240.3	694.8±201.8	614.7±183.3
	CK	♀	605.0±210.5	526.1±154.5	520.5±102.6	385.7±111.6**
	钠离子(mmol/L)	♂	145.8±1.5	147.0±0.9	147.3±0.8	148.2±1.0**
	Na^+	♀	146.4±1.2	147.3±0.7	147.4±1.3	147.8±1.2
	氯离子(mmol/L)	♂	107.8±1.9	108.2±1.2	108.6±1.2	109.1±1.4
	Cl^-	♀	108.2±1.0	109.1±1.1	109.3±1.5*	109.8±1.0**

注: 与溶媒对照组比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。下表同。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same as below.

表 3 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠尿液指标的影响(停药检查期)($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on urine indexes of juvenile rats (Drug withdrawal period)

检测指标 Test items	结果等级 Results classification	各等级比例(%) Ratio of each grade							
		溶媒对照组 Control group		低剂量组 Low-dose group		中剂量组 Medium-dose group		高剂量组 High-dose group	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
尿胆原(μmol/L) URO	Normal	100	100	100	100	80	100	40**	100
	1+	0	0	0	0	20	0	60	0
胆红素(μmol/L) BIL	Neg	100	100	100	100	90	100	40**	100
	1+	0	0	0	0	10	0	60	0
蛋白质(g/L) Protein	Neg	90	100	30	80	30	80	0**	40*
	Trace	10	0	40	20	20	20	20	60
	1+	0	0	20	0	50	0	70	0
	2+	0	0	10	0	0	0	10	0
酮体(mmol/L) KET	Neg	20	100	10	80	10	70	0	30**
	+-	80	0	60	20	60	30	80	70
	1+	0	0	30	0	30	0	20	0
白细胞(Leuko/μL) LEU	Neg	0	70	0	30	0	10*	0	20
	+-	60	30	20	60	30	70	20	80
	1+	40	0	40	10	50	20	70	0
	2+	0	0	40	0	20	0	10	0
	<= 1.005	20	80	0	10	20	50	0*	0**
比重 SG	1.01	50	0	20	0	0	10	0	10
	1.015	20	20	20	40	10	10	10	0
	1.02	10	0	30	40	10	20	0	10
	1.025	0	0	30	10	40	0	20	50
	>= 1.030	0	0	0	0	20	10	70	30
	5.5	0	0	0	20*	10*	0	20**	30**
pH	6	10	0	20	60	60	20	70	60
	6.5	10	20	20	0	20	10	0	10
	7	40	40	30	10	0	30	0	0
	7.5	40	30	30	10	10	40	0	0
	8	0	10	0	0	0	0	10	0
	0	100	100	70	40	80	70	10**	20**
维生素 C(mmol/L) VC	0.6	0	0	30	50	10	20	70	60
	1.4	0	0	0	10	10	0	10	0
	2.8	0	0	0	0	0	10	10	20
	0	100	100	70	40	80	70	10**	20**
微白蛋白(g/L) MALB	Neg	0	70	0	10	0	20	0	0
	0.15	90	30	30	70	30	60	0	40
	>0.15	10	0	70	20	70	20	100	60

2.5 生长发育、激素及骨骼系统发育

去壁灵芝孢子粉各剂量组所有雄鼠龟皮分离完成的时间段为 PND39~PND46, 所有雌鼠阴道张开完成的时间段为 PND28~PND36, 与溶媒对照组相比无显著性差异($P>0.05$), 如表 4 所示。各剂量去壁灵芝孢子粉对雄鼠龟皮分离完成的时间、雌雄大鼠的生长激素、性激素(睾酮、雌二醇)指标均未见明显毒性影响; 对雌雄大鼠的骨骼系统发育指标(股骨长、骨密度)也未见明显毒性影响。

骨骼发育指标显示, 除恢复期结束时高剂量组雌鼠的股骨骨密度高于溶媒对照组($P<0.01$)外, 其余各剂量组雌雄大鼠的骨骼系统发育指标与溶媒

对照组均无显著性差异($P>0.05$)。上述异常指标波动幅度较小, 且一般情况下骨密度小幅升高非毒性表现, 故考虑无明显毒理学意义。

激素检测结果显示, 仅停药时低、中剂量组雄鼠的血清雌二醇水平高于溶媒对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 如表 5 所示, 其余停药及恢复期各剂量组雌雄大鼠的睾酮、雌二醇及生长激素水平与溶媒对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。上述异常指标的波动无明显剂量-反应关系, 且波动幅度较小, 结合统计学结果和生物学/临床意义、实验室背景数据、长期研究经验等其他各方面因素, 考虑为无毒理学意义的个体波动。

2.6 去壁灵芝孢子粉对行为学的影响

改良 Irwin's 行为学评价结果显示(如表 6 所示):给药中期检查的低剂量组“应激性发声”(20/32 只)、高剂量组“应激性发声”(19/32 只)的发生率高于溶媒对照组(7/32 只)($P<0.05$ 或 $P<0.01$);给药中期各剂量组其他指标,以及停药及恢复期结束时各剂量组所有指标均与溶媒对照组无显著性差异($P>0.05$)。上述异常可能与试验前期幼龄大鼠年龄小及对灌胃给药不适应引起的应激反应,且无明显剂量-反应关系,考虑为无毒理学意义。

Morris 水迷宫实验结果显示(如表 7 所示),与溶媒对照组相比,恢复期中、高剂量组雄鼠训练第 2 天的潜伏期时间缩短($P<0.05$),低、中、高剂量组雄鼠及低、中剂量组雌鼠空间探索测定中目标象限内时间百分比升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);停药及恢复期结束时其余各剂量组雌雄鼠的潜伏期时间和空间探索测定指标无明显变化。上述结果提示各剂量组大鼠可以用更短的时间找到平台或在目标象限内的活动时间更多,可能为学习记忆能力增强而非毒性表现;鉴于有明显的剂量-反应关系,考虑可能为灵芝孢子粉的药理学作用表现。

2.7 对脏器重量和系数及组织病理学

如表 8 所示,停药时,高剂量组雌鼠的心脏、肝重量高于溶媒对照组;恢复期结束时,低、中剂量组雄鼠的胸腺重量及系数高于溶媒对照组,但波动幅度均较小,且无明显剂量-反应关系,并未见相应的病理学改变,故考虑无明显毒理学意义;各剂量组雌雄鼠其余的脏器重量和系数未见明显变化。

病理学镜检结果显示,各组各脏器均未发现与去壁灵芝孢子粉相关的组织病理学改变(主要脏器见图 3)。

表 6 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠改良 Irwin's 行为指数的影响(发生次数/总数)($\bar{x}\pm s$, $n=32$)

Table 6 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on the modified Irwin's behavior index in juvenile rats (Number of occurrences/total number)

检测指标 Test items	分类 Classification	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
发声 Vocalisation	未发现 Not found	25/32	12/32 *	21/32	13/32 **
	应激性发声 Stress vocalization	7/32	20/32	11/32	19/32
	未发现 Not found	32/32	30/32	32/32	31/32
	应激性排尿 Stress urination	0/32	2/32	0/32	1/32
	未发现 Not found	32/32	29/32	30/32	31/32
	应激性排便 Stress defecation	0/32	3/32	2/32	1/32
应激行为 Stress behavior	排尿 Urination				
	排便 Defecation				
	未发现 Not found	32/32	29/32	30/32	31/32
	应激性排尿 Stress urination	0/32	2/32	0/32	1/32
	未发现 Not found	32/32	29/32	30/32	31/32
	应激性排便 Stress defecation	0/32	3/32	2/32	1/32

3 讨论

儿童被认为容易受环境中药物或化学物质的毒性影响,这是由于儿童机体的各器官系统仍处于发育阶段,导致对药物的吸收、分布、代谢、排泄等方面与成人不同,因而在计算儿童药量时不能简单的在成人用药基础上推算,容易造成儿童用药错误^[11-12],医学史上也多次出现儿科用药不良反应^[13-15],对此

表 4 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠性发育的影响($\bar{x}\pm s$, $n=16$)

Table 4 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on sexual development of juvenile rats

检测指标 Test items	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
阴道张开 Vaginal opening (PND)	32.7±1.4	31.9±1.7	32.3±1.0	31.6±1.8
包皮分离 Foreskin separation (PND)	41.3±1.8	41.6±1.9	41.3±1.3	41.9±1.8

表 5 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠性激素的影响(停药检查期)($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 5 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on the sex hormones of juvenile rats (Drug withdrawal period)

检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
雌二醇 E2	♂	4.06±0.93	5.22±0.39 **	5.00±0.22 *	4.53±0.33
	♀	5.47±1.28	5.00±0.43	5.22±0.52	4.81±0.35
睾酮 T	♂	2.63±1.84	3.00±1.67	2.41±0.89	3.53±1.58
	♀	0.90±0.16	0.94±0.07	0.99±0.15	0.83±0.10

有必要开展幼龄动物非临床安全性评价。幼龄动物重复给药毒性实验是用于评价药物非临床安全性的重要手段之一,对评估药物应用于临床后儿科用药人群的不良反应用具有重要意义^[12,16]。幼龄动

物实验已广泛应用于化学药物^[17]、癌症药物^[18]、环境毒物^[19]及各类中药^[20-21]等。灵芝孢子粉已在大量研究中被证实,具有提高免疫、抗肿瘤、护肝、抗氧化等功效^[3-4],在成人中已有很广泛的应用。鉴

表 7 去壁灵芝孢子粉对幼年大鼠水迷宫实验的影响(恢复期结束)($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 7 Effect of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on water maze test in juvenile rats (End of recovery period)

检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High dose group
训练第 1 天潜伏期(s) Training day 1	♂ ♀	30.23±33.38 27.90±24.89	22.49±20.49 27.34±27.28	35.06±35.96 12.44±11.68	25.89±18.92 24.30±21.69
潜伏期 Incubation period	♂ ♀	30.82±31.12 24.22±26.56	15.25±15.39 19.54±19.68	9.51±9.06* 15.36±19.73	11.66±13.11* 21.11±20.08
训练第 2 天潜伏期(s) Training day 2	♂ ♀	21.20±28.81 24.12±24.68	20.99±24.72 17.49±18.17	15.49±14.42 11.98±18.51	15.71±15.59 19.51±18.97
训练第 3 天潜伏期(s) Training day 3	♂ ♀	2.00±1.41 5.17±2.32	3.33±2.42 4.67±1.21	4.83±2.86 3.67±2.66	4.83±1.72 3.33±1.75
经过平台次数 Number of platform passes	♂ ♀	42.19±39.17 22.82±20.95	18.36±22.24 19.43±16.15	12.24±10.67 41.48±37.35	20.70±25.02 21.94±9.13
空间探索 Space exploration	♂ ♀	26.40±7.01 30.32±9.67	40.17±14.69* 48.33±11.27	42.67±6.86* 49.88±12.43	45.93±12.63** 41.63±14.59
目标象限内时间百分比(%) Percentage of time in target quadrant	♂ ♀				

表 8 去壁灵芝孢子粉对幼龄大鼠器官重量和系数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 8 Effects of wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder on organ weight and coefficient of juvenile rats

检测阶段 Detection phase	检测指标 Test items	性别 Sex	溶媒对照组 Control group	低剂量组 Low-dose group	中剂量组 Medium-dose group	高剂量组 High-dose group
停药检查 Drug withdrawal period	心脏重量(g) Heart weight	♂ ♀	1.305±0.084 0.890±0.077	1.319±0.097 0.915±0.093	1.295±0.107 0.915±0.067	1.294±0.123 0.998±0.086**
	心脏系数(%) Heart coefficient	♂ ♀	0.376±0.021 0.391±0.025	0.368±0.029 0.412±0.028	0.364±0.031 0.397±0.025	0.371±0.021 0.418±0.036
	肝重量(g) Liver weight	♂ ♀	11.034±1.491 7.519±0.712	11.642±1.910 7.218±0.476	11.989±1.802 7.330±0.672	11.535±1.275 8.241±0.601*
	肝系数(%) Liver coefficient	♂ ♀	3.161±0.235 3.298±0.198	3.218±0.234 3.258±0.173	3.357±0.308 3.179±0.219	3.306±0.140 3.446±0.181
	脾重量(g) Spleen weight	♂ ♀	0.766±0.109 0.611±0.111	0.794±0.081 0.563±0.058	0.800±0.095 0.609±0.066	0.779±0.073 0.617±0.052
	脾系数(%) Spleen coefficient	♂ ♀	0.220±0.025 0.267±0.040	0.221±0.020 0.253±0.017	0.225±0.020 0.264±0.024	0.225±0.025 0.258±0.025
	肾重量(g) Kidney weight	♂ ♀	2.872±0.227 1.939±0.212	3.073±0.404 1.977±0.132	3.073±0.307 2.082±0.149	3.058±0.261 2.128±0.192
	肾系数(%) Kidney coefficient	♂ ♀	0.826±0.046 0.849±0.047	0.853±0.066 0.892±0.043	0.863±0.041 0.904±0.066	0.879±0.063 0.889±0.062
	心脏重量(g) Heart weight	♂ ♀	1.151±0.093 0.975±0.056	1.627±0.240 1.159±0.236	1.500±0.077 0.971±0.064	1.555±0.180 1.102±0.120
	心脏系数(%) Heart coefficient	♂ ♀	0.356±0.018 0.368±0.027	0.350±0.046 0.449±0.110	0.352±0.050 0.366±0.019	0.352±0.018 0.399±0.031
	肝重量(g) Liver weight	♂ ♀	11.665±1.460 7.905±1.123	12.982±2.520 7.842±0.705	11.596±1.648 7.847±0.662	12.701±1.879 8.519±0.624
	肝系数(%) Liver coefficient	♂ ♀	2.727±0.142 2.961±0.217	2.772±0.349 3.019±0.262	2.687±0.144 2.957±0.147	2.865±0.104 3.083±0.134
	脾重量(g) Spleen weight	♂ ♀	0.790±0.115 0.622±0.049	0.876±0.135 0.629±0.067	0.795±0.072 0.625±0.111	0.784±0.117 0.663±0.104
	脾系数(%) Spleen coefficient	♂ ♀	0.185±0.016 0.236±0.032	0.188±0.022 0.242±0.021	0.188±0.035 0.236±0.038	0.177±0.017 0.239±0.026
	肾重量(g) Kidney weight	♂ ♀	3.143±0.353 2.017±0.269	3.407±0.593 2.024±0.181	3.183±0.299 2.109±0.158	3.252±0.401 2.180±0.154
	肾系数(%) Kidney coefficient	♂ ♀	0.735±0.033 0.755±0.027	0.731±0.118 0.778±0.033	0.742±0.066 0.796±0.050	0.735±0.025 0.790±0.053
恢复期结束检查 End of recovery period	胸腺重量(g) Thymus weight	♂ ♀	0.350±0.052 0.394±0.077	0.529±0.066** 0.406±0.069	0.503±0.099** 0.394±0.105	0.434±0.067 0.420±0.089
	胸腺系数(%) Thymus coefficient	♂ ♀	0.082±0.015 0.149±0.030	0.115±0.025* 0.156±0.021	0.118±0.028* 0.148±0.037	0.100±0.022 0.152±0.028

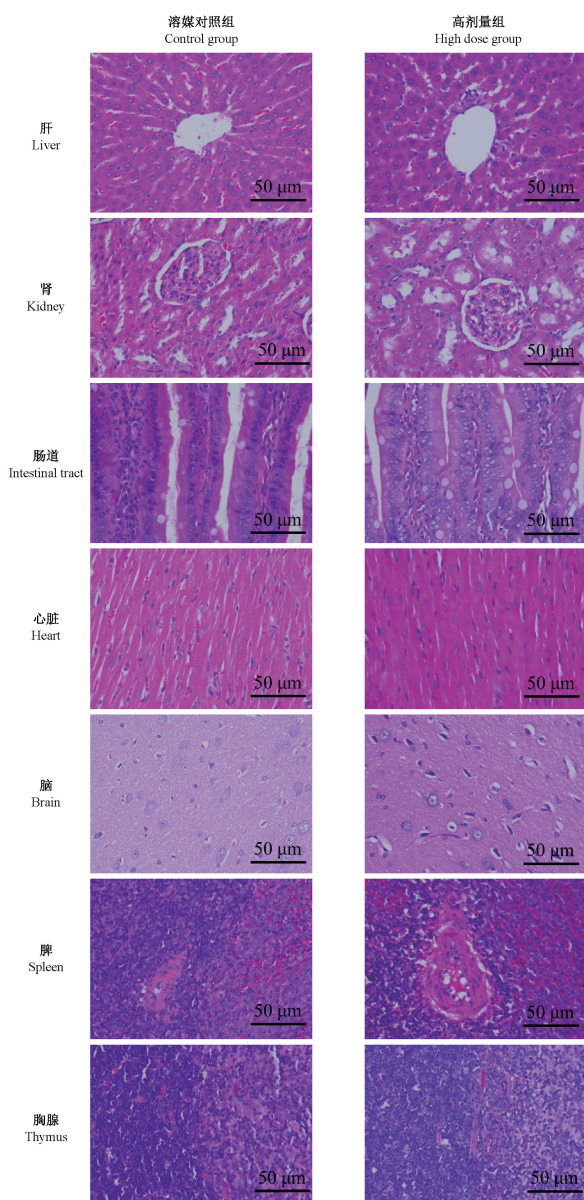


图3 停药检查时溶媒对照组和

高剂量组幼龄大鼠各重要脏器病理学图片(HE染色)

Figure 3 Histopathological images of important organs of juvenile SD rats in control group and high-dose group at the time of drug withdrawal(HE staining)

于目前尚未见灵芝孢子粉在儿童及幼龄动物安全性方面的相关报道,本研究考察评估了去壁灵芝孢子粉对幼龄动物的重复给药毒性及发育相关性,为临床用于儿童提供安全性参考依据。

近年来,欧美国家开展不断完善相关指导原则,推动了儿科药物的开发^[22],如国际人用药品注册技术协调委员会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)于2020年3月

31日颁布了《ICH S11 协调指导原则:支持儿科药物开发的非临床安全性评价》^[23]。在幼龄动物试验中,需要关注特殊的靶器官和指标,包括中枢神经系统、生殖功能、性发育标志等^[24]。与化学药相比,中药非临床安全性评价中,应针对适应症及其处方组成和特性进行设计,加强激素水平检测,采用已知的临床提示指标并开展毒代动力学研究^[24]。同时,在选择实验动物种属时还应考虑到发育毒性研究中所关注的机体器官系统与目标儿科人群经历同一阶段或相似的发育过程^[25-26],根据ICH S11 指导原则,一般首选啮齿类动物(多选用大鼠)^[27]。此外,非临床安全性评价可评估儿科药物对实验动物毒性反应(发育毒性)、剂量与毒性效应的关系、主要毒性靶器官、毒性反应是否可逆、能否很好地预测药物对人体的不良反应等,为临床安全用药的剂量设计提供参考依据,对开展相应临床研究具有一定的风险提示^[28]。

在幼龄动物毒性实验设计中,幼龄动物的起始给药年龄及给药期限的选择需满足支持评估相应临床应用的儿童年龄范围及治疗周期。本实验主要为了预测2岁以上儿童服用去壁灵芝孢子粉可能产生的不良反应,基于各主要系统发育阶段的跨种属年龄对比,大鼠PND21~45 d相当于人类的儿童期(2~12岁)^[25],故本研究幼龄大鼠选择PND24(约对应2岁儿童)开始给药至PND65(相当于已成年),此年龄段的大鼠发育阶段覆盖2岁儿童至成年的发育阶段,足以支持2岁以上儿童的临床实验及临床应用。根据临床拟用剂量为每人每次2克,用Meeh-Rubner体表面积计算公式进行剂量换算(以2岁儿童12 kg体重、幼龄大鼠80 g体重计),幼龄大鼠等效剂量约为0.76 g/kg,故取整以0.8 g/kg作为本试验的低剂量,即相当于幼龄大鼠的临床等效剂量;高剂量选择最大合适给药浓度0.4 g/mL及最大给药体积10 mL/kg,即4.0 g/kg;而中剂量等比设置1.8 g/kg。

本实验结果显示,幼龄SD大鼠(PND24)连续4周(PND24~PND65)重复经口给予去壁灵芝孢子粉(最高达4.0 g/kg)后,一般反应(临床症状)、体重、摄食、性征发育、行为学、血液学、血清生化学、眼科、生长激素、性激素、骨骼系统发育、免疫学、组织病理学等指标均未见明显毒性影响,提示预测去壁灵芝孢子粉在儿童中应用无明显安全性担忧。

实验中行为学检测是为了评价给药后潜在的中枢神经系统发育影响及长期神经毒性^[24]。Morris

水迷宫是应用最广泛的研究和评价动物空间学习记忆能力的经典行为学实验^[29];在 5 种迷宫中(Morris 水迷宫、Y 迷宫、八臂迷宫、T 迷宫、Barnes 迷宫),Morris 水迷宫准确性更高^[30],且已被应用于药物毒理学^[31]和药物对学习记忆障碍的改善研究^[32-33]以及对啮齿类动物神经认知疾病模型的验证和神经认知治疗可行性的评估^[34]等。在本研究 Morris 水迷宫试验结果显示,停药 4 周后各剂量组大鼠可以用更短的时间找到平台或在目标象限内的活动时间更多,提示学习记忆能力增强,并且有明显的剂量-反应关系,考虑不排除可能为灵芝孢子粉的药理学作用表现。

综上所述,幼龄 SD 大鼠连续 4 周(PND24~PND65)重复经口给药毒性试验中,去壁灵芝孢子粉对幼龄 SD 大鼠未见明显一般毒性及发育毒性影响,NOAEL 确定为 4.0 g/kg(相当于 80 g 幼龄大鼠临床等效剂量的 5 倍,200 g 大鼠等效剂量的 6.6 倍),提示预测去壁灵芝孢子粉在儿童应用中无明显安全性担忧,为去壁灵芝孢子粉应用于儿科提供科学参考依据;同时本试验提示去壁灵芝孢子粉可能具有提高学习记忆能力作用。

参考文献:

- [1] 刘艳荣,黄厚今. 灵芝孢子粉功能作用的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2016, 22(4): 65-69.
- [2] 李静静,胡晓琴,张新风,等. 赤芝孢子粉和子实体主要化学成分变异规律研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4246-4251.
- [3] 宋柏捷,朱孝娟,魏丽娜. 灵芝孢子粉对小鼠的免疫调节及抑瘤作用研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(5): 464-466.
- [4] Wang PY, Zhu XL, Lin ZB. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of *ganoderma lucidum* [J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 135.
- [5] 闫征,王宏旭,刘莉莹,等. 灵芝三萜类化合物的体外抗肿瘤活性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(5): 633-634, 637.
- [6] Fukuzawa M, Yamaguchi R, Hide I, et al. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *ganoderma lucidum* (reishi houshi) to its anti-tumor activity [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(10): 1933-1937.
- [7] 甄作均,王峰杰,计勇,等. 灵芝孢子对原发性肝癌术后肝功能影响的研究[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2012, 6(3): 219-222.
- [8] 陈宝田,龙亚秋,李华,等. 灵芝孢子粉的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1439-1440.
- [9] 赵洁胜,魏联,虞燕萍,等. 灵芝孢子粉破壁率的检验方法研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(5): 431-434.
- [10] Li Z, Shi Y, Zhang X, et al. *Ganoderma lucidum* screening immunoactive compounds of spores by mass spectrometry molecular networking combined with zebrafish assays [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 287.
- [11] 黄芳华,王庆利,Jim Ridings,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.
- [12] 杨阳,崇立明,侯祯雯,等. 刚离乳大鼠给予百蕊草浸膏粉的重复给药毒性评价方法探索[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1841-1848.
- [13] Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, et al. Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review [J]. Neurology, 1987, 37(3): 379-385.
- [14] Weiss CF, Glazko AJ, Weston JK. Chloramphenicol in the newborn infant. A physiologic explanation of its toxicity when given in excessive doses [J]. N Engl J Med, 1960, 262: 787-794.
- [15] Gunter JB. Benefit and risks of local anesthetics in infants and children [J]. Paediatr Drugs, 2002, 4(10): 649-672.
- [16] 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.
- [17] 刘晓岩,孙曼琴,侯杰. 环丙沙星对幼龄大鼠软骨的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(6): 457-461.
- [18] Duarte DM. Use of juvenile animal studies to support oncology medicine development in children [J]. Reprod Toxicol, 2015, 56: 97-104.
- [19] Brent RL. Utilization of juvenile animal studies to determine the human effects and risks of environmental toxicants during postnatal developmental stages [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2004, 71(5): 303-320.
- [20] 罗娜,唐怡. 升麻柴胡复方对幼龄雌性小鼠性成熟的影响[J]. 中药与临床, 2016, 7(3): 50-52.
- [21] 周晓冰,郭隽,曹兆军,等. 热炎宁合剂的非临床幼年动物毒理学研究[J]. 中国药事, 2020, 34(9): 1040-1046.
- [22] 井潇,高杰,吴纯启,等. 儿童药物安全性评价研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(4): 608-614.
- [23] 周莉,郭隽,孙祖越. 儿科用中药发育毒理学研究及评价进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(8): 568-574.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 黄芳华,王庆利,Jim Ridings,等. 幼龄动物毒理学研究:试验设计、实施和结果分析[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(2): 151-161.
- [27] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals S11 [EB/OL]. (2020-04-14), https://database.ich.org/sites/default/files/S11_Step4_FinalGuideline_2020_0310.pdf.
- [28] 杨娜,韩玲. 儿科中药新药临床研究安全性考虑[J]. 中国药

- 理学与毒理学杂志, 2020, 34(11): 811-816.
- [29] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用 [J]. 神经药理学报, 2014, 4(5): 30-35.
- [30] 杨玉洁, 李玉姣, 李彬彬, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 129-134.
- [31] 田栋, 徐晓虹, 洪星, 等. 成年期双酚 A 暴露对小鼠行为的影响 [J]. 心理学报, 2011, 43(5): 534-543.
- [32] Malm T, Koistinaho J, Kanninen K, et al. Utilization of APPswe/PS1dE9 transgenic mice in research of alzheimer's disease: focus on gene therapy and cell-based therapy applications [J]. Int J Alzheimers Dis, 2011, 2011: 517160.
- [33] 刘卓, 金英, 刘婉珠, 等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10): 1362-1366.
- [34] 陆彩霞, 罕园园, 全品芬, 等. 水迷宫实验中不同性别树鼩学习记忆能力的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 74-76, 79.
- [收稿日期] 2021-03-04

临床前研究中的癌症模型: 癌症研究进展回顾

癌症是当今威胁人类健康最可怕的疾病之一, 每年在全球范围内造成近 800 万人死亡。最新统计数据显示恶性肿瘤已成为世界上主要的致死性疾病之一。可靠且具有代表性的癌症模型在肿瘤学研究中起着关键性作用。然而, 癌症并不是具有单一特征性疾病, 而是一种具有遗传异质性的系统性疾病。如何选择反映肿瘤系统的最优模型一直是肿瘤研究所要面对的主要困难之一。

目前科学家们对癌症模型进行了大量研究, 以进一步了解癌症的扩散、发展等机制和早期检测方法。这些模型为深入研究肿瘤的病因学、分子基础、与宿主相互作用、微环境对肿瘤的影响以及肿瘤的异质性在肿瘤转移中的作用提供了帮助。这些模型也被用于预测新的癌症标记物、靶向治疗以及药物研发。来自巴基斯坦真纳大学的 Muhammad Zia 团队在综述中探讨了癌症模型在药物筛选和治疗方法研究中的重要作用, 癌症模型的建立为癌症治疗带来了更光明的前景。

本文介绍了不同种类的癌症模型, 例如增殖快、易于监控的癌细胞系, 可以模拟体内微环境和肿瘤异质性类器官癌症模型、人源化肿瘤异体移植小鼠模型 (patient-derived xenografts, PDXs)、基因编辑小鼠模型 (genetically engineered mouse models, GEMMs)、果蝇模型、猪模型、斑马鱼模型和以基因组学为基础的计算模型等。

本文同时讨论了现有癌症模型的不足: 细胞系难以模仿真实的体内环境; PDX 模型由于使用免疫缺陷小鼠, 不能研究免疫调控对肿瘤的影响; GEMM 模型价格昂贵, 同时难以分析复杂基因调控的肿瘤影响; 其他动物模型也存在着饲养困难、与人类存在解剖学差异等问题; 现有的计算模型也不足以完全模拟复杂肿瘤的发生发展过程。

这些体内、体外和计算模型能够帮助研究人员搜集分析相关数据, 为癌症研究提供帮助。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学〈英文〉》期刊 (*Animal Model & Experimental Medicine*, 2021, 4: 87-103.)