

徐聪,杨正标,王海苹,等. 安儿宁颗粒在幼年大鼠临床前安全性评价研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1050-1057.

Xu C, Yang ZB, Wang HP, et al. Safety evaluation of oral administration of An'erning granules in young rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1050-1057.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.005

安儿宁颗粒在幼年大鼠临床前安全性评价研究

徐聪^{1,2}, 杨正标^{1,2}, 王海苹³, 李怀平³, 郑高利^{1,2}, 宣尧仙^{1,2}, 陈颖^{1,2*}

(1. 杭州医学院安全性评价研究中心, 杭州 310053; 2. 浙江省药物安全性评价技术研究重点实验室, 杭州医学院, 杭州 310053; 3. 金诃藏药(山东)健康产业有限公司, 济南 250104)

【摘要】 目的 研究安儿宁颗粒单次给药和3个月重复给药对幼年大鼠的毒性影响, 评估安儿宁颗粒对临床儿童患者的长期使用安全性。**方法** 20只幼年大鼠(3~4周龄), 按最大给药量法, 单次给予安儿宁颗粒240 g生药/kg体重的剂量, 观察大鼠的毒性反应和死亡情况; 200只幼年大鼠(3~4周龄)按体重均衡随机分为溶媒对照组、唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组, 每组40只, 雌雄各半, 分别灌胃给予纯水、唐古特乌头5.5 g生药/kg体重、安儿宁颗粒3、11、40 g生药/kg体重, 每天1次, 连续91 d, 于给药中期(给药1.5个月)、停药(给药3个月)和恢复期结束(停药后4周)分别抽样剖检大鼠40只(每组10只, 雌雄各半)、80只(每组20只, 雌雄各半)和40只(每组10只, 雌雄各半), 检测体重、摄食、血液学、血清生化学、凝血、尿液、眼科及组织病理学等相关指标。**结果** 幼年大鼠单次经口给予最大给药量的安儿宁颗粒, 未见明显急性毒性; 重复经口给予安儿宁颗粒91 d, 仅见高剂量雄鼠摄食量减少和体重增长减缓, 唐古特乌头组和给药组雄鼠中性粒细胞和单核细胞数、血清白蛋白均可逆性升高, AST、Na⁺、Cl⁻可逆性下降, 其余指标均未见显著毒性反应。**结论** 安儿宁颗粒对幼年大鼠无显著毒性反应。相对安全剂量为40 g生药/kg体重, 未观察到有害作用(NOEL)剂量为11 g生药/kg体重。

【关键词】 安儿宁颗粒; 儿科用药; 幼年大鼠; 毒性实验

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1050-08

Safety evaluation of oral administration of An'erning granules in young rats

XU Cong^{1,2}, YANG Zhengbiao^{1,2}, WANG Haiping³, LI Huaiping³, ZHENG Gaoli^{1,2}, XUAN Yaoxian^{1,2}, CHEN Ying^{1,2*}

(1. Center of Safety Evaluation, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China. 2. Key Laboratory of Drug Safety Evaluation and Research of Zhejiang Province, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053.

3. Arura Tibetan Medicine (Shandong) Health Industry Co., Ltd, Jinan 250104)

Corresponding author: CHEN Ying. E-mail: chenyingap@163.com

【Abstract】 Objective To study the toxicity of a single administration and 3-month repeated administration of An'erning (AEN) granules in juvenile SD rats, and evaluate the long-term safety in children. **Methods** 20 juvenile SD rats (3~4 weeks) were given the maximum administration dosage (240 g crude drug/kg). This was followed by an observation of toxicity reactions and death for 15 days. Juvenile SD rats (200) were divided into vehicle control, *Aconitum tanguticum* control, low-dose, middle-dose, and high-dose groups. Each group was composed of 40 rats (half male and half female), each of which was given purified water, *A. tanguticum* (5.5 g crude drug/kg), and AEN (3, 11, and 40 g crude drug/kg), all in a volume of 10 mL/kg, for 91 days. Food intake and body weight were measured, and hematology,

【基金项目】 国家科技重大专项(2011ZX0931-003), 青海省重大科技专项(2020-SF-A3-2), 浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY105)。Funded by the National Science and Technology Major Project of China(2011ZX0931-003), Major Science and Technology Projects in Qinghai Province(2020-SF-A3-2), Medical Health Science and Technology Project of Zhejiang Provincial Health Commission(2020KY105)。

【作者简介】 徐聪(1987—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 药物毒理学。Email: xiaoxue-87@163.com

【通信作者】 陈颖(1967—), 女, 高级实验师, 大专, 研究方向: 药物毒理学。Email: chenyingap@163.com

biochemistry, coagulation, urine, ophthalmologic, and histopathology examinations of 5, 10 and 5 rats for each sex in each group were conducted mid-administration, upon drug withdrawal, and 4 weeks after withdrawal. **Results** No obvious toxic effects or deaths were recorded after the single administration of AEN. After the 3-month repeated administration of AEN, male rats in the high-dose group had decreased body weights, decreased food intake, reversibly increased NEUT count, NEUT ratio, MONO count, MONO ratio, and ALB, and reversibly decreased AST, Na^+ , and Cl^- . **Conclusions** There were no obvious toxicity reactions in young rats given AEN granules. The relative safe dosage of AEN was 40 g crude drug/kg, and the no observed adverse effect level (NOAEL) is 11 g crude drug/kg. The clinical administration of AEN is safe.

【Keywords】 An'erning granule; pediatric drugs; juvenilerat; toxicity test

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

安儿宁颗粒为经典藏医儿科用药“久协更卓”的现代剂型,处方由天竺黄、红花、人工牛黄、岩白菜、甘草、高山辣根菜、洪连、檀香、唐古特乌头九味藏药组成^[1]。安儿宁颗粒具有清热祛风、化痰止咳功效,临床上主要用于治疗小儿风热感冒、咳嗽有痰、发热咽痛等上呼吸道感染^[2-3]。处方中青藏高原特有药材唐古特乌头,为毛茛科乌头属,含有内酯型二帖生物碱,文献报道对小鼠具有一定的急性毒性^[4-5];另红花,为活血化瘀药材,可显著延长凝血酶原和凝血酶时间,可能具有潜在的安全风险^[6]。安儿宁颗粒上市近 20 年,据 2018 ~ 2020 年国家药品不良反应数据库数据反馈显示^[7],安儿宁颗粒使用患儿约为 1480 万,其中有 122 例报告发生腹泻或皮疹等不良反应。虽然其不良反应报告率 < 0.01%,但鉴于安儿宁颗粒正逐渐被联合用药用于其他小儿适应症^[8-13],且目前缺少安儿宁颗粒对幼龄动物的相关毒理学数据,本文特开展大剂量安儿宁颗粒在幼年大鼠的单次给药以及 3 个月重复给药的毒性研究,进一步评价其儿科用药安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

240 只 3 ~ 4 周龄健康 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重为 40 ~ 60 g,购自上海市西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0016】。饲养期间各组大鼠自由饮水(经 LAWS-2000 实验动物反渗透纯水机处理纯水和摄食(钴 60 辐照的全价营养颗粒饲料),给药前大鼠禁食不禁水,温度 20.5 ~ 25.5℃,相对湿度 50% ~ 68%,每小时通风次数 ≥ 15 次,12 h 光照明暗交替,饲养于杭州医学院安全性评价研究中心屏障系统【SYXK(浙)2017-0010】。实验机构通过国家 GLP 认证和 AAALAC 认证,实验遵循 GLP 原则。本研究方案获得本机构实验动物伦理委员会的批准(GLP-A-003)。

1.1.2 主要试剂与仪器

安儿宁颗粒(清膏),黄棕色胶状物,3.1 g 生药/g 清膏,批号:20160201,金诃藏药股份有限公司提供;人工牛黄,批号:150731,青海九康中药饮片有限公司生产;临用前,按处方量比例 1 g 安儿宁颗粒清膏加 34.2 mg 人工牛黄,配制成“安儿宁颗粒”原液,用于高剂量组给药,中、低剂量组受试物取“原液”按比例用纯水配制成相应的给药浓度。唐古特乌头提取清膏(3.57 g 生药/g,金诃藏药股份有限公司,批号:20160201),棕褐色粘稠液体,用纯水配制成给药浓度。

CA-1500 全自动血凝分析仪(Sysmex,日本);7100 全自动生化分析仪(Hitachi,日本);N-600 尿液分析仪(长春迪瑞);ADVIA2120 全自动血细胞分析仪(Bayer,德国);IMS-972 电解质分析仪(深圳希莱恒);YZ6EI 检眼镜(苏州医疗器械厂)。

1.2 方法

1.2.1 单次给药毒性实验

幼年大鼠按体重随机分为给药组和溶媒对照组,每组 20 只,雌雄各半。给药组大鼠灌胃给予安儿宁颗粒 240 g 生药/kg 体重,分 2 次(间隔 4 h)给予最大适用浓度(每毫升 4 g 生药)、最大给药体积(30 mL/kg);溶媒对照组灌胃等体积纯水。

观察给药后大鼠的一般反应(外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便及其颜色、皮毛、鼻、眼、口有无异常分泌物等)及死亡情况,死亡动物及时尸检,若肉眼观察有病变脏器则进行病理组织学检查。给药后第 1、2、3、4、7、9、11、15 天称体重;第 15 天所有大鼠剖检,观察主要脏器的大小、形态、颜色和质地等。

1.2.2 重复给药毒性实验

幼年大鼠按体重随机分为溶媒对照组、唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组,每组 40 只,雌雄各半,分别灌胃给予纯水、唐古特乌头 5.5 g 生药/kg 体重、安儿宁颗粒 3 g/kg 体重、11 g/kg 体重

和 40 g/kg 体重(按生药计),给药体积 10 mL/kg,每天给药 1 次,连续 91 d,停药后恢复观察 4 周。

实验期间每天观察大鼠的一般反应:外观、行为、活动、精神状态、食欲、大小便及其颜色、皮毛、鼻、眼、口有无异常分泌物等,每周称体重和摄食量 1 次;给药前、给药中期、停药后 1 d 和恢复期结束检测大鼠眼科和尿液指标。在给药中期(给药 45 d)、停药次日和恢复期结束,每组分别随机取 10、20、10 只大鼠(雌雄各半),进行血液学(RBC、WBC、HGB、PLT、HCT、MCV、MCH、MCHC、MPV、RDW、#NEUT、% NEUT、#LYMPH、% LYMPH、# MONO、% MONO、# EOS、% EOS、# BASO、% BASO、# LUC、% LUC、# RETIC、% RETIC、MCV_r、CHr、CHCM_r)、血清生化学(含电解质)(AST、ALT、ALP、CK、LDH、BUN、Crea、T. P、ALB、GLU、T. BIL、T. CHO、TG、 γ -GT、K⁺、Na⁺、Cl⁻、TCa)、凝血功能(PT、TT、Fbg、APTT)检测,心脏、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、脑、生殖器官(雄性为睾丸和附睾,雌性为卵巢和子宫)等主要脏器的称重、大体剖检和组织病理学检查。综合评估“安儿宁颗粒”对幼年大鼠的毒性情况。

1.3 统计学分析

选用 SPSS 统计分析软件进行数据统计分析。计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,选用单因素方差(One-way ANOVA)进行显著性分析;计数资料采用卡方检验(χ^2)进行显著性分析。显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 单次给药毒性实验

溶媒对照组幼龄大鼠未见明显异常反应;给药

组幼龄大鼠在给药后约 30 min 陆续出现流涎、活动减少、闭眼,至给药后约 3 h 消失,同时出现着色尿、软便、稀便、肛周污浊,给药后 48 h 所有反应基本消失,未出现死亡或濒死。给药组大鼠体重随实验时间延长而增加,但增长速度低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见图 1。实验结束后剖检显示,给药组和溶媒对照组大鼠各脏器组织的外观形态均未见明显异常。以上反应主要为短时间内空腹给予高浓度、大体积中药混悬液后的常见反应,不排除对大鼠体重增长率有减缓影响。

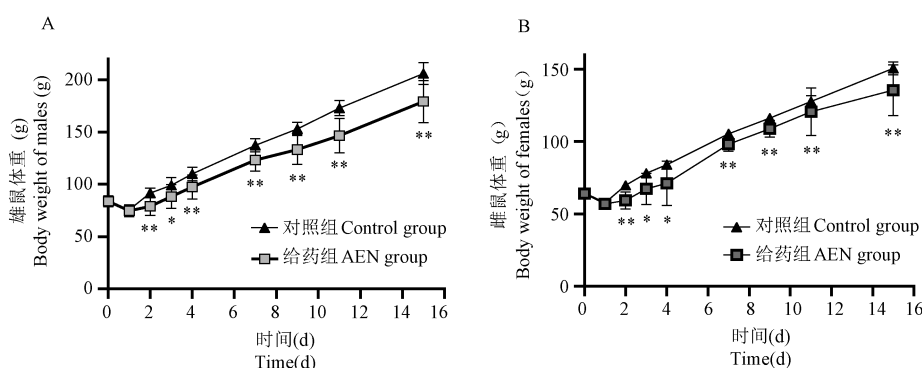
2.2 重复给药毒性实验

2.2.1 一般反应、体重和摄食量

实验期间,各组大鼠外观、行为和活动等一般反应均未见明显异常,无死亡或濒死。安儿宁颗粒高剂量组大鼠给药后第 2 周(♀)、第 1 ~ 7 周(♂)和 13 周(♂)体重均显著低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其余各组大鼠的体重和溶媒对照组无明显差异(见图 2)。安儿宁颗粒低剂量组大鼠给药后第 8、11、12 周(♂)和第 13 周(♀)、中剂量组大鼠给药后第 8、11 周(♂)和第 2、11、12 周(♀)、高剂量组大鼠给药后第 1 ~ 5、7、9、11 ~ 13 周(♂)和第 1 ~ 3、9、12 ~ 13 周(♀)摄食量显著低于溶媒对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其余各组大鼠的摄食量和溶媒对照组无明显差异(见图 2)。唐古特乌头组大鼠的摄食量和体重未见明显影响。

2.2.2 血液学

停药次日,和对照组比,唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、中、高剂量组雄鼠的中性粒细胞数显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),唐古特乌头组、安儿宁颗粒低、高剂量组雄鼠的单核细胞数显著升高($P <$



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

图 1 单次经口给予安儿宁颗粒对幼年大鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Effects of single oral administrated AEN on body weight of juvenile SD rats

0.01 或 $P < 0.05$), 上述指标至恢复期结束后均回归正常, 说明是可逆的。另出现个别指标波动, 停药次日: 唐古特乌头组雄鼠和安儿宁颗粒中剂量雌

鼠的嗜酸性粒细胞数、高剂量组雌鼠的淋巴细胞数 ($P < 0.01$) 有效幅度的降低, 且无剂量相关性, 结合实验室背景数据, 判断其无毒理学意义 (表 1)。

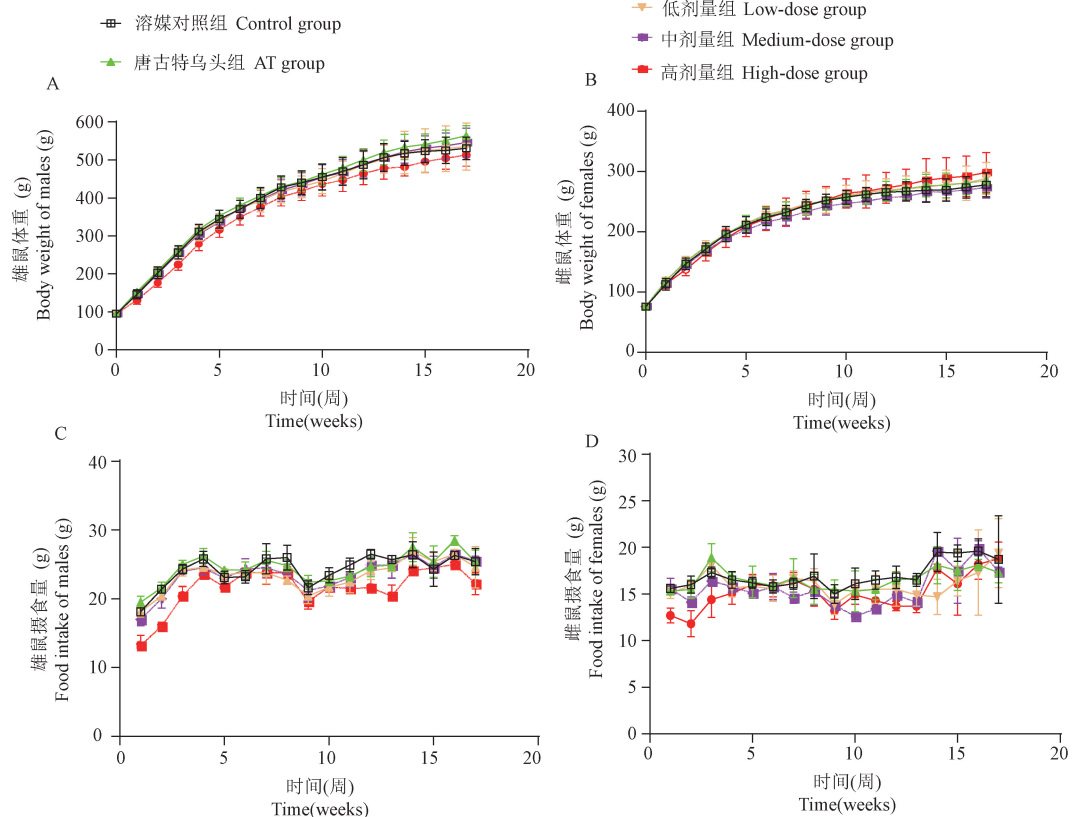


图 2 重复经口给予安儿宁颗粒对幼年大鼠体重和摄食量的影响

Figure 2 Effects of repeated oral administrated AEN on body weight and food intake of juvenile SD rats

表 1 安儿宁颗粒对幼年大鼠血液学指标的影响 (停药检查阶段) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of AEN on hematology in juvenile SD rats (Drug withdrawal) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	中性粒细胞 ($10^3/\mu\text{L}$) NEUT ($10^3/\mu\text{L}$)	单核细胞 ($10^3/\mu\text{L}$) MONO ($10^3/\mu\text{L}$)	嗜酸性粒细胞 ($10^3/\mu\text{L}$) EOS ($10^3/\mu\text{L}$)		淋巴细胞 ($10^3/\mu\text{L}$) LYMPH ($10^3/\mu\text{L}$)
	♂	♂	♂	♀	♀
溶媒对照组 Control group	0.56 ± 0.16	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	2.72 ± 0.52
唐古特乌头组 AT group	$1.36 \pm 0.57^*$	$0.13 \pm 0.05^{**}$	$0.09 \pm 0.03^{**}$	0.05 ± 0.02	2.87 ± 0.75
低剂量组 Low-dose group	$0.84 \pm 0.19^*$	$0.10 \pm 0.03^*$	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02	2.77 ± 0.82
中剂量组 Medium-dose group	$0.82 \pm 0.26^*$	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	$0.06 \pm 0.01^{**}$	2.81 ± 0.40
高剂量组 High-dose group	$1.24 \pm 0.42^{**}$	$0.14 \pm 0.08^{**}$	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.01	$3.55 \pm 0.78^{**}$

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 in the following tables)

2.2.3 血清生化

停药检查, 唐古特乌头组和安儿宁颗粒高剂量组雄鼠的血清白蛋白显著高于溶媒对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 停药 4 周恢复正常, 提示可能与唐古特乌头给药剂量有关; 停药时, 安儿宁颗粒低、

中、高剂量组雄鼠的 AST、 Na^+ 、 Cl^- 显著低于溶媒对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 呈一定的剂量反应关系, 停药 4 周后均恢复正常, 可能与给药有关; 另停药时高剂量雄鼠 ALT 和唐古特乌头组雌鼠 GLU 小幅降低 ($P < 0.01$), 考虑为无毒理学意义 (见表 2)。

表 2 安儿宁颗粒对幼年大鼠血清生化指标的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of AEN on serum biochemistry in juvenile SD rats (Drug withdrawal) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	血清白蛋白(g/L)	钠离子(mmol/L)	氯离子(mmol/L)	谷草转氨酶(IU/L)	谷丙转氨酶(IU/L)	血糖(mmol/L)
	ALB(g/L)	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	GLU(mmol/L)
	♂	♂	♂	♂	♂	♀
溶媒对照组 Control group	41.98 ± 1.15	143.6 ± 1.5	105.8 ± 2.2	171.34 ± 24.83	42.55 ± 5.14	5.979 ± 0.602
唐古特乌头组 AT group	43.82 ± 1.42 *	143.8 ± 2.8	105.4 ± 1.9	158.06 ± 22.77	41.84 ± 4.27	4.775 ± 0.449 **
低剂量组 Low-dose group	42.61 ± 1.10	141.8 ± 1.1 *	103.7 ± 1.1 **	147.53 ± 30.30	41.63 ± 3.34	5.637 ± 0.520
中剂量组 Medium-dose group	42.77 ± 1.72	141.0 ± 1.0 **	103.1 ± 1.5 **	136.57 ± 17.55 **	39.56 ± 4.39	5.643 ± 0.504
高剂量组 High-dose group	43.95 ± 2.13 **	138.9 ± 1.1 **	100.8 ± 1.5 **	132.04 ± 23.87 **	36.84 ± 2.21 **	5.670 ± 0.692

2.2.4 凝血功能

停药时高剂量组雄鼠和安儿宁颗粒中、高剂量组雌鼠的 APTT 和 TT 均较溶媒对照组有小幅降低

($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但均在实验室背景数据范围内, 未表现明显的剂量-反应关系, 综合考虑其无毒理学意义。具体见表 3。

表 3 安儿宁颗粒对幼年大鼠凝血指标的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of AEN on coagulation index in juvenile SD rats (Drug withdrawal) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	部分活化凝血酶原时间(s) APTT(s)		凝血酶时间(s) TT(s)	
	APTT(s)		TT(s)	
	♂	♀	♂	♀
溶媒对照组 Control group	14.0 ± 0.8	13.7 ± 2.3	64.9 ± 6.1	65.8 ± 7.4
唐古特乌头组 AT group	13.4 ± 1.4	12.5 ± 0.7	64.9 ± 8.3	60.8 ± 5.2
低剂量组 Low-dose group	12.9 ± 0.9	12.2 ± 1.5	64.2 ± 5.2	58.3 ± 11.1
中剂量组 Medium-dose group	14.1 ± 1.1	11.3 ± 1.6 **	64.2 ± 5.2	53.1 ± 9.5 **
高剂量组 High-dose group	11.0 ± 2.5 *	11.4 ± 2.3 **	53.1 ± 9.7 **	54.9 ± 10.3 *

2.2.5 眼科和尿液检查

各检查阶段中, 唐古特乌头和安儿宁颗粒各剂量组的眼科检查和尿液检查指标均与对照组大鼠相似($P > 0.05$), 无统计学差异。

肝、肾重量和系数均高于溶媒对照组($P < 0.01$), 但病理组织学检查未见明显病变, 判断为无毒理学意义的无规律个体差异。各组其他脏器的重量和系数均与相应时间的对照组相似($P > 0.05$) (见表 4)。

2.2.6 脏器重量和系数以及组织病理学检查

停药检查时高剂量组雄鼠的肝、肾系数及雌鼠的

各组大鼠各脏器的组织病理学检查, 均未出现与药物有关的明显的实质性病变(见图 3)。

表 4 安儿宁颗粒对幼年大鼠脏器重量和脏器系数的影响(停药检查阶段)($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of AEN on organ weight and coefficient in juvenile SD rats (Drug withdrawal) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	肝重量(g)	肾重量(g)	肝系数(%)		肾系数(%)	
	Liver weight(g)	Kidney weight(g)	Liver coefficient(%)		Kidney coefficient(%)	
	♀	♀	♂	♀	♂	♀
溶媒对照组 Control group	6.647 ± 0.497	1.813 ± 0.146	2.514 ± 0.133	2.455 ± 0.107	0.641 ± 0.040	0.668 ± 0.034
唐古特乌头组 AT group	6.583 ± 0.446	1.835 ± 0.134	2.500 ± 0.148	2.421 ± 0.098	0.632 ± 0.021	0.676 ± 0.046
低剂量组 Low-dose group	6.678 ± 0.739	1.824 ± 0.156	2.545 ± 0.154	2.422 ± 0.145	0.649 ± 0.051	0.663 ± 0.024
中剂量组 Medium-dose group	6.291 ± 0.396	1.797 ± 0.174	2.587 ± 0.168	2.436 ± 0.124	0.643 ± 0.051	0.695 ± 0.055
高剂量组 High-dose group	7.665 ± 0.554 **	2.015 ± 0.156 **	2.971 ± 0.214 **	2.786 ± 0.228 **	0.735 ± 0.042 **	0.731 ± 0.045 **

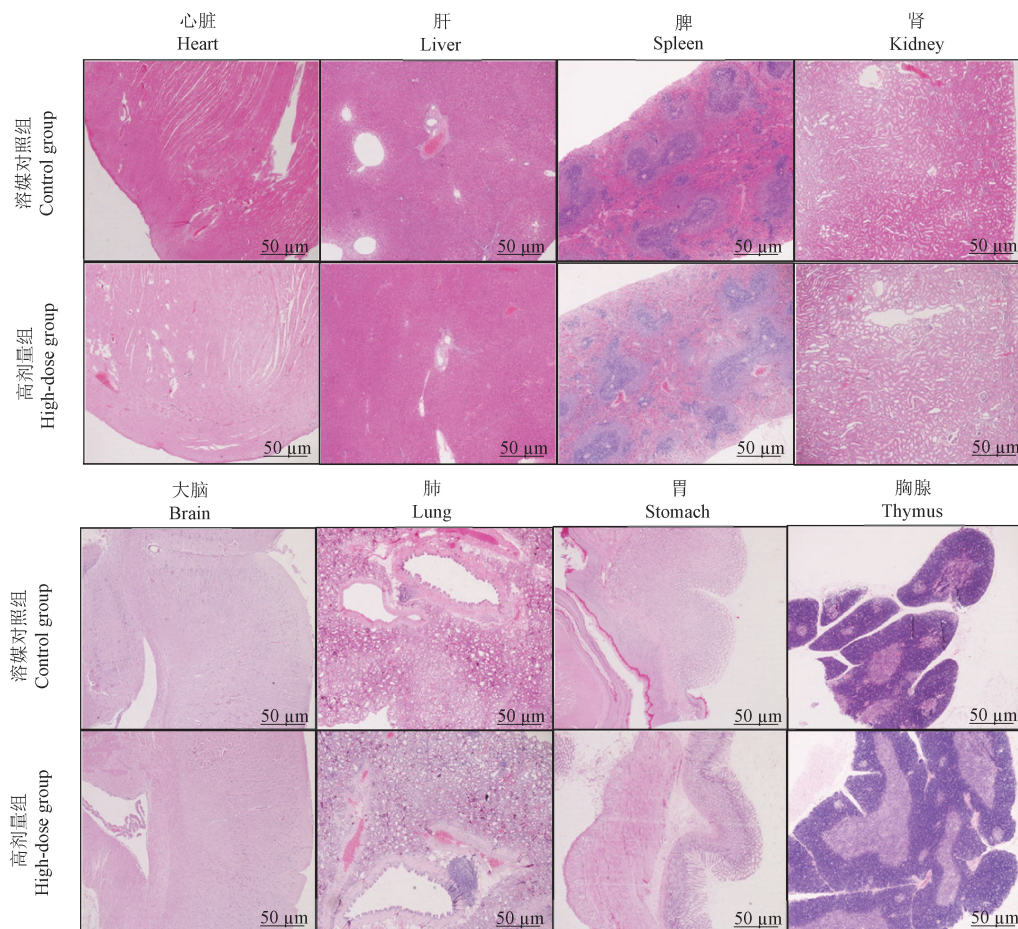


图3 重复经口给予安儿宁颗粒后幼年大鼠主要脏器的病理学图片(停药检查阶段)

Figure 3 Histopathological images of main organs of juvenile SD rats after repeated oral administrated AEN (Drug withdrawal)

3 讨论

儿童的各器官和系统处于发育过程中,其脏器结构、生理功能与成人存在差别,可能会对药物毒性或对毒性的耐受程度产生不同的影响^[14-16]。因此,需要采用幼年动物的非临床试验安全性数据,以充分评估儿科药物的临床长期使用安全性^[17]。安儿宁颗粒作为藏医经典儿科用药,方中多含藏医特有药材,其中唐古特乌头为青藏高原特有毛茛科植物唐古特乌头和船盔乌头的干燥全草。传统藏医认为唐古特乌头无毒且具有清热解毒功效,但现代有研究发现唐古特乌头中的总生物碱对小鼠具有一定的心脏毒性^[5],且由于唐古特乌头不是内地常用药材,易被认为属于有大毒的乌头类中药(川乌、草乌等)。为明确安儿宁颗粒中唐古特乌头的毒性,并充分评估安儿宁颗粒在临床使用中儿童患者的安全性,有必要开展安儿宁颗粒对幼年动物的单次给药毒性和重复给药毒性实验。

据《儿科用药非临床安全性研究技术指导原

则》,幼龄动物毒理学实验首选啮齿类动物^[18],本研究采用传统动物品系 SD 大鼠。重复给药毒性实验中设计 SD 大鼠的起始给药年龄为 3 ~ 4 周,相当于人类的儿童期(2 ~ 12 岁),给药结束年龄为 16 ~ 17 周,相当于已成年,用以支持 2 岁儿童至成年的发育阶段中药物的毒性评价^[19-20]。

据 2020 版《中华人民共和国药典》记载,每 1 g 安儿宁颗粒含生药材 0.485 g,临床用量为每次 1.5 g(< 1 岁),3 g/次(1 ~ 5 岁),6 g/次(> 5 岁),每日 3 次,儿童(按标准体重 30 kg 计)临床日用量为 0.144 g 生药/kg 体重,按体表面积折算成年大鼠(按 100 g 体重计)日用量为 0.864 g 生药/kg 体重。本研究单次给药毒性实验的剂量为临床日用量的 277.8 倍,重复给药毒性实验低、中、高剂量分别为临床日剂量的 3.5、12.7、46.3 倍;唐古特乌头组剂量与安儿宁颗粒高剂量所含唐古特乌头的剂量相同(临床日剂量的 46.3 倍),以充分暴露安儿宁颗粒及唐古特乌头的毒性。

本研究考虑成药颗粒剂含有较多辅料成分,无

法提高动物实验给药剂量,为了加大毒性暴露和保证给药剂量的准确性,故采用特制高浓度安儿宁颗粒(清膏)和人工牛黄临用前按比例配制。研究结果显示,幼年大鼠单次给予最大给药量的安儿宁颗粒,体重随实验时间延长而增加,但增长速率低于溶媒对照组;重复 3 个月给予安儿宁颗粒,一般观察及凝血、尿液、眼科、组织病理学检查等均未见明显毒性反应,可见高剂量雄鼠摄食量小幅减少和体重增长略有减缓,嗜中性粒细胞(%NEUT、#NEUT)和单核细胞数(%MONO、#MONO)、血清白蛋白(ALB)可逆性升高,天门冬氨酸转氨酶(AST)、 Na^+ 、 Cl^- 可逆性下降,上述变化偏离本实验室背景数据幅度较小,且停药后基本恢复正常,组织病理学检查也未见毒性靶器官。因此,安儿宁颗粒在幼年大鼠的单次给药毒性和重复给药毒性实验中,基本无显著毒理学意义的反应,但由于均可见体重速率的减缓,提示临床上患儿大剂量使用安儿宁颗粒可能会有降低摄食和体重减轻的风险。综合评价,安儿宁颗粒的相对安全剂量为 40.0 g 生药/kg 体重,未观察到有害作用(NOAE)剂量为 11.0 g 生药/kg 体重。临床上,儿童按每日最大服用量(18 g 成品药),3 ~ 5 d 的临床用药疗效安全。

值得注意的是,本研究中单次给药毒性和重复给药毒性实验唐古特乌头生药材的剂量分别为 33 g/kg 体重和 5.5 g/kg 体重,相当于标准体重儿童日服用唐古特乌头生药材 156 g 和 26 g,是法定标准日服用量(0.6 ~ 1.2 g)^[7]上限的 120 和 20 多倍。仅表现为重复给药毒性实验中唐古特乌头组嗜中性粒细胞和单核细胞数、血清白蛋白可逆性升高,未出现文献中的毒性反应^[5]。考虑文献中总生物碱采用乙醇提取得到,而安儿宁颗粒采用水提取工艺,经加热煎煮,有毒成分可能被降解,毒性显著降低^[7]。且有文献指出虽然唐古特乌头与有毒中药乌头均属毛茛科乌头属植物,但其主要活性成分为内酯型生物碱,基本无毒且具有清热解毒功效,其药效物质基础、药理作用、安全性,与传统中药乌头(川乌、草乌、雪上一枝蒿等)完全不同^[7]。结合本研究结果,安儿宁颗粒中藏药唐古特乌头的临床使用具有安全性。

本研究充分评估了安儿宁颗粒对幼年动物的毒性反应,更进一步论证其长期使用的安全性,同时也为安儿宁颗粒用于儿童手足口病和哮喘等适应症提供一定的理论基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 王海萍. 安儿宁颗粒药理作用及临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2014, 12(3): 160-161.
Wang HP. Pharmacological effects and clinical applications on Anerning particles [J]. Chin Med Mod Distance Educ Chin, 2014, 12(3): 160-161.
- [2] 陈卓. 藏药安儿宁颗粒治疗小儿喉感冒的临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(4): 7-8.
Chen Z. Clinical observation on the treatment of children's throat cold with Zang an'erning Granule [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2021, 27(4): 7-8.
- [3] 刘帆, 张颖颖, 侯林. 安儿宁颗粒的体外抗菌、抗炎和免疫增强活性研究[J]. 中国药房, 2019, 30(16): 2221-2225.
Liu F, Zhang YY, Hou L. Study on *in vitro* antibacterial, anti-inflammatory and immunopotentiating activity of an'erning granules [J]. Chin Pharm, 2019, 30(16): 2221-2225.
- [4] 杨丽华, 林丽美, 王智民, 等. 藏族药榜嘎研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(10): 43-49.
Yang LH, Lin LM, Wang ZM, et al. Research progress on *Aconitum tanguticum* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2016, 22(10): 43-49.
- [5] 吴国泰, 牛亭惠, 刘五州, 等. 藏药唐古特乌头总生物碱的急性毒性及抗炎镇痛作用[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(10): 28-32.
Wu GT, Niu TH, Liu WZ, et al. Acute toxicity and anti-inflammatory or analgesic effects of total alkaloids of *Aconitum tanguticum* in mice [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2017, 26(10): 28-32.
- [6] 江山山, 蒋锦燕, 李桥桥, 等. 西红花与红花的抗血栓作用研究[J]. 中草药, 2021, 52(12): 3584-3590.
Jiang SS, Jiang JY, Li QQ, et al. Anti-thrombotic effect of *Crocus sativus* and *Carthamus tinctorius* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(12): 3584-3590.
- [7] 黄海涛, 彭毛卓玛, 程晓辉, 等. 藏成药安儿宁颗粒的历史沿革和中医解读[J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(2): 57-60.
Huang HT, Peng MZM, Cheng XH, et al. Historical evolution and TCM interpretation of Tibetan medicine Anerning Granules [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2022, 28(2): 57-60.
- [8] 时富枝, 唐蕾, 李丹凤. 安儿宁颗粒联合乳糖酸红霉素治疗儿童上呼吸道感染的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(5): 873-876.
Shi FZ, Tang L, Li DF. Clinical study on Anerning Granules combined with erythromycin lactobionate in treatment of upper respiratory tract infection in children [J]. Drugs Clin, 2020, 35(5): 873-876.
- [9] 张金华. 藏药安儿宁颗粒联合双黄连口服液治疗小儿风热感冒配合全面护理的效果探析[J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(5): 69-71.
Zhang JH. Effect of Zang'an'erning granule combined with Shuanghuanglian oral liquid in treating children's wind-heat cold

- and comprehensive nursing [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2021, 27(5): 69-71.
- [10] 李晓慧. 安儿宁颗粒联合双歧杆菌四联活菌片治疗儿童肺炎继发性腹泻的临床疗效分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(20): 3205-3207.
- Li XH. Clinical efficacy analysis of Anning Granule combined with *Bifidobacterium* quadruple viable tablets in the treatment of secondary diarrhea of pneumonia in children [J]. Mod Diagn Treat, 2021, 32(20): 3205-3207.
- [11] 袁嫣琪. 安儿宁+顺尔宁联合鼻腔冲洗治疗儿童上呼吸道感染临床研究 [J]. 中国医学创新, 2020, 17(17): 60-64.
- Yuan YY. Clinical study on the treatment of children with upper respiratory tract infection by nasal irrigation combined with anerning and shunerning [J]. Med Innov Chin, 2020, 17(17): 60-64.
- [12] 于新巧, 米艳丽. 安儿宁颗粒合阿奇霉素颗粒治疗咳嗽变异性哮喘 20 例临床疗效观察 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(22): 36.
- Yu XQ, Mi YL. Clinical observation on 20 cases of cough variant asthma treated with Anning Granule and Azithromycin Granule [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2013, 22(22): 36.
- [13] 于祥. 金河安儿宁颗粒治疗小儿手足口病(普通型)213 例疗效观察 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2012, 4(2): 143-144.
- Yu X. Clinical observation on 213 cases of children's hand-foot-mouth disease (common type) treated with Jin He An Er Ning Granule [J]. Chin Pediatr Integr Tradit West Med, 2012, 4(2): 143-144.
- [14] Duarte DM. Use of juvenile animal studies to support oncology medicine development in children [J]. Reprod Toxicol, 2015, 56: 97-104.
- [15] 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.
- Zhou L, Guo J, Sun ZY. Progress in study and evaluation of developmental toxicology for pediatrics traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34(8): 568-574.
- [16] 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.
- Yang N, Han L. Safety evaluation of traditional Chinese medicine in pediatric populations [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2020, 34(11): 811-816.
- [17] 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.
- [18] 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.
- Huang FH, Wang QL, Jim R, et al. Juvenile animal toxicity study: design, conduct, and report [J]. Chin J New Drugs, 2017, 26(2): 151-161.
- [19] 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.
- [20] 张城达, 宋翼升, 扈荣, 等. 复方蒲公英制剂幼龄大鼠重复给药毒性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 33-42.
- Zhang CD, Song YS, Hu R, et al. Repeated dose toxicity of compound *Taraxacum mongolicum* extract in juvenile rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(2): 33-42.

[收稿日期] 2022-06-02