

青紫颗粒单次及重复给药毒性试验研究

赵文文^{1a}, 张萌^{1a}, 张艳菊^{1a}, 杨燕^{1b}, 庞丽丽², 田永章², 王景雁^{1a}, 张欢^{1a}, 梅冬^{1a*}, 王晓玲^{1a*}(1.国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院, a.药学部, b.中医科, 北京 100045; 2.国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850)

摘要: 目的 观察青紫颗粒单次给药以及重复给药13周对大鼠产生的毒性反应, 评价临床前安全性。方法 单次给药毒性试验: SD大鼠随机分为溶媒对照组(去离子水), 青紫颗粒组(18 g·kg⁻¹), 给药体积为每次30 mL·kg⁻¹, 24 h内灌胃给药2次(间隔至少4 h), 给药后观察14 d, 通过临床观察体质量变化和病理解剖等确定毒性反应。重复给药毒性试验: 幼龄SD大鼠(4日龄)随机分为溶媒对照组(去离子水), 低、中、高剂量青紫颗粒组(1, 2, 4 g·kg⁻¹), 给药13周, 给药体积每次10 mL·kg⁻¹, 每天给药2次, 恢复期4周。检查项目包括临床观察、体质量、摄食量、血液学、生物化学、免疫学和尿液分析检测、激素水平、幼鼠发育指标、组织病理学检查等。结果 单次给药毒性试验: 青紫颗粒灌胃给予SD大鼠, 无明显毒性, 最大耐受量>18 g·kg⁻¹。重复给药毒性试验: 幼龄SD大鼠灌胃给予青紫颗粒重复给药13周, 最大无毒性反应剂量为2 g·kg⁻¹。潜在毒性靶器官为肝脏, 主要毒性作用表现为肝细胞炎症性坏死, 没有剂量依赖关系。结论 青紫颗粒对受试动物在拟临床使用剂量范围内未见有明显的毒性作用。

关键词: 青紫颗粒; 医院制剂; 单次给药毒性; 重复给药毒性; 幼龄动物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)13-1833-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221551

引用本文: 赵文文, 张萌, 张艳菊, 等. 青紫颗粒单次及重复给药毒性试验研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(13): 1833-1839.

Study on the Single and Repeated Dose Toxicity of Qingzi Granules

ZHAO Wenwen^{1a}, ZHANG Meng^{1a}, ZHANG Yanju^{1a}, YANG Yan^{1b}, PANG Lili², TIAN Yongzhang², WANG Jingyan^{1a}, ZHANG Huan^{1a}, MEI Dong^{1a*}, WANG Xiaoling^{1a*}(1.National Center for Children's Health, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, a.Department of Pharmacy, b.Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100045, China; 2.Beijing National Center for Drug Safety Evaluation and Research, Beijing 100850, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the toxic effects of single administration and repeated administration of Qingzi granules for 13 weeks on rats, and to evaluate their preclinical safety. **METHODS** For the single dose toxicity experiment, SD rats were randomly divided into two groups, vehicle control group(deionized water) and Qingzi group(18 g·kg⁻¹), which were given in a volume of 30 mL·kg⁻¹ per time, twice in 24 h(interval more than 4 h), and observation was performed for 14 d after administration. The toxicity reaction was evaluated through observation of body weight change and pathological anatomy. For the repeated dose toxicity experiment, juvenile SD rats(postnatal day, PND 4) were randomly divided into vehicle control group (deionized water) and low, medium and high dose of Qingzi groups(1, 2 and 4 g·kg⁻¹). The rats were orally administered twice daily with vehicle or Qingzi for 13 weeks in a volume of 10 mL·kg⁻¹ per time. A recovery period of 4 weeks was followed. Test items included clinical observations, body weight measurement, food intake measurement, hematology test, biochemical test, urinalysis, sex hormone level determination, cellular immune function assay, growth indexes and histopathology test. **RESULTS** For the single dose toxicity experiment, Qingzi granules were orally administered to SD rats without significant toxicity, and the maximum-tolerated dose was greater than 18 g·kg⁻¹. In the repeated dose toxicity test, juvenile SD rats were given Qingzi granules by gavage and repeated administration for 13 weeks, the no observed adverse effect level was 2 g·kg⁻¹. The target organ of toxicity was the liver and the main toxic effect was inflammatory necrosis of hepatocytes, no dose-dependent relationship. **CONCLUSION** No overt toxicity of Qingzi granules was observed on the tested animals within the intended clinical dosage range.

KEYWORDS: Qingzi granules; hospital preparation; single dose toxicity; repeated dose toxicity; juvenile animal

青紫颗粒是以首都医科大学附属北京儿童医院的院内制剂青紫合剂为基础, 经剂型改良而成

的中药复方制剂。该方由青黛、紫草、丹参等药味组成, 具有祛风解毒、凉血消斑的功效, 广泛

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项项目(2018ZX09721003); 北京市自然科学基金-海淀原始创新联合基金资助(L212013); 首都医科大学附属北京儿童医院儿童用药专项(MYZD202203)

作者简介: 赵文文, 女, 博士, 药师 E-mail: wenwenzhao1994@163.com *通信作者: 梅冬, 女, 博士, 副主任药师, 副教授 E-mail: meidong11290926@126.com 王晓玲, 女, 硕士, 主任药师, 副教授 E-mail: wangxiaoling@bch.com.cn

用于治疗过敏性紫癜及合并症,临床应用 20 余年,疗效确切,临床优势显著^[1]。>6 岁患儿每日服用青紫合剂的剂量较大(90 mL),且需要长期服用,液体制剂(每瓶 100 mL)不便于携带和保存。基于临床需求,项目组对青紫合剂(瓶装液体制剂)进行剂型改良,开发颗粒剂,并进行矫掩味,使其便于携带和保存,并提升患儿服药依从性,已完成了制备工艺及质量控制体系的研究工作^[2]。药理实验表明,青紫颗粒可有效改善卵蛋白诱导的过敏性紫癜大鼠的炎症反应和肾脏组织病理学损伤,对麦胶蛋白所致过敏性紫癜小鼠也有保护作用,其机制与减轻免疫球蛋白 A1 异常糖基化有关^[3-4]。本研究通过开展青紫颗粒的单次给药和重复给药毒性试验研究,以期为该药的临床前安全性评价、临床剂量设计和合理用药提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号 110324210100833968。动物饲养于国家北京药物安全评价研究中心屏障设施内,实验动物使用许可证号为 SYXK-(军)2017-0012,采用人工光照,12 h 明暗周期,环境温度维持在 20~26 °C,湿度 40%~70%,自由饮食。动物实验由国家北京药物安全评价研究中心的动物福利委员会审查批准,伦理审查编号 IACUC-2021-007(单次给药毒性试验)、IACUC-2020-043(重复给药毒性试验)。

1.2 试药

青紫颗粒(悦康药业集团股份有限公司,批号:202001171;1 g 干膏粉相当于生药 5.78 g,由青黛、紫草、绵马贯众、丹参、白芷、寒水石、威灵仙、茵陈等组成)。主要适应证:祛风解毒,凉血消斑;用于风毒入络,血热妄行,血溢脉外,皮肤紫斑,色泽鲜红或紫红,伴有腹痛、关节痛,烦热口渴,大便秘结;过敏性紫癜见上述证候者。拟用剂量:(生药)0~3 岁,每次 6.3 g;4~6 岁,每次 12.6 g;>7 岁,每次 18.9 g;1 日 3 次。

采用 HPLC 定量测定青紫颗粒供试品浓度^[5],以绿原酸为检测成分,经检测,配制后的青紫药物溶液的准确度、均一性、稳定性和浓度均符合要求,溶液配制系统合格。

1.3 仪器

XT-2000iv 和 XN-1000v 型全自动血液分析

仪、CS-5100 型全自动血凝仪、UF-500i&Arkray AX4030 尿液工作站均购自日本 Sysmex 公司;7180 型自动生化分析仪(日本日立公司);PB3001-S 型电子分析天平[梅特勒-托利多公司(常州)称重设备系统有限公司]等。

2 方法

2.1 青紫颗粒的单次给药毒性试验^[6-8]

2.1.1 动物分组 SPF 级 SD 大鼠 20 只,6~7 周龄,随机分为 2 组,每组 10 只,雌雄各半。溶媒对照组(去离子水)、青紫颗粒组(18 g·kg⁻¹,临床剂量 55 倍),按每次 30 mL·kg⁻¹的给药体积灌胃,24 h 给药 2 次(2 次给药间隔≥4 h)。

2.1.2 观察及检测指标 给药结束即刻观察大鼠的反应情况,包括饮食、外观、行为、分泌物、排泄物、死亡情况及中毒反应等,以后每天观察 1 次,连续观察 14 d,在第 1, 8, 15 天各称重 1 次(给药当天为 d1)。试验观察结束后,脱颈椎处死并剖检,检查大鼠体质量、发育和营养状况等,检查脏器的位置、大小、色泽、有无黏连、质地、有无积液和肿瘤等。剖检异常的大鼠进行组织病理学检查,经固定后修切,石蜡包埋后切片(3~5 μm)和制片,脱水后染色,最后进行显微镜阅片。

2.2 青紫颗粒重复给药毒性试验^[9-11]

2.2.1 动物分组 SPF 级 SD 大鼠 128 只,4 日龄,随机分为 4 组,每组 32 只,雌雄各半。溶媒对照组(去离子水)、青紫颗粒低剂量组(1 g·kg⁻¹,临床剂量 3 倍)、中剂量组(2 g·kg⁻¹,临床剂量 6 倍)和高剂量组(4 g·kg⁻¹,临床剂量 12 倍)。按每次 10 mL·kg⁻¹给药体积灌胃,每天给药 2 次,连续给药 13 周,恢复期 4 周。

2.2.2 观察及检测指标 每日观察记录大鼠的行为活动、精神状况、外观体征、腺体分泌、粪便性状、皮肤黏膜,每周检测体质量和摄食量。给药期间进行身体发育、反射发育、生殖发育指标和自发活动进行检测。

分别在给药结束(92 d)及恢复期结束(120 d)进行大鼠眼科检查。麻醉后腹主动脉取血及脏器组织。检测①血液学指标:红细胞计数、血红蛋白、红细胞容积、红细胞平均容积、红细胞平均血红蛋白含量、红细胞平均血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、网织红细胞、白细胞计数、白细胞分类、血小板计数、红细胞分布宽度、血小板平均体积、血小板分

布宽度(platelet distribution width, PDW)等。②血清生化指标:天门冬氨酸氨基转换酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转换酶(alanine aminotransferase, ALT)、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰基转移酶、肌酸磷酸激酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖(blood sugar, Glu)、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、钠离子(Na^+)、钾离子(K^+)、氯离子(Cl^-)等。③免疫学指标:血清免疫球蛋白、血清补体(complement 3, C3; complement 4, C4)、淋巴细胞分类(cluster of differentiation 3, CD3; cluster of differentiation 4, CD4; cluster of differentiation 8, CD8)。④尿液分析指标:颜色、浊度、比重、pH值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、亚硝酸盐、潜血或隐血、白细胞、红细胞、白细胞、上皮细胞、管型、细菌。⑤激素:睾酮、雌二醇(estradiol, E2)、生长激素、三碘甲状腺原氨酸、甲状腺素。⑥骨检查:股骨(右后肢)骨密度和长度。称量脑、心脏、肝脏、肾脏、肾上腺、胸腺、脾脏、睾丸、附睾、卵巢、子宫的绝对重量,计算脏器指数。⑦病理组织学检查:溶媒对照组和青紫颗粒高剂量组主要器官组织进行病理组织学检查,青紫颗粒中、低剂量组进行肝、肾组织病理学检查,组织经固定后修切,石蜡包埋后切片(3~5 μm)和制片,脱水后染色,进行显微镜阅片。

2.3 统计学处理

实验结果采用 SPSS 19.0 软件进行统计学方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较,方差齐性用单因素方差分析,采用 Dunnett-*t* 检验进行青紫颗粒给药组与溶媒对照组的组间比较,方差不齐用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 青紫颗粒的单次给药毒性试验结果

给药期间连续观察 14 d,青紫颗粒给药组第 2 天可见大鼠轻度黑便和稀便,其他自主活动、体表完好。大鼠摄食摄水量、体质量增长无异常,

青紫颗粒组与溶媒对照组比较差异无统计学意义。试验结束后各组无大鼠死亡,未见明显毒性反应症状,剖检均未见明显异常。结果见表 1。

3.2 青紫颗粒的重复给药毒性试验结果

3.2.1 对大鼠一般生理指标的观察 在整个试验期间无大鼠非计划死亡。给药组在给药初期出现稀便,几天后好转,给药组粪便颜色变深,未发现与受试物相关的症状或行为学改变。

与溶媒对照组相比,雄性高剂量组大鼠的体质量在给药的 1~7 周内显著低于溶媒对照组(第 1~6 周, $P < 0.01$; 第 7 周, $P < 0.05$),中剂量组大鼠给药后的 1, 3, 5, 6 周体质量显著低于溶媒对照组(第 1 周, $P < 0.01$; 第 3, 5, 6 周, $P < 0.05$),低剂量大鼠给药后的第 1, 2 周体质量显著低于溶媒对照组($P < 0.05$);雌性大鼠高剂量组大鼠的体质量在给药的 1~5 周内显著低于溶媒对照组($P < 0.01$),中剂量组大鼠给药后的 3, 4, 5 周体质量显著低于溶媒对照组(第 3 周, $P < 0.01$; 第 4, 5 周, $P < 0.05$),低剂量大鼠给药后的第 1~4 周体质量显著低于溶媒对照组($P < 0.05$)。给药 7 周后,各给药组大鼠的体质量与溶媒对照组均无显著差异,见图 1。

与溶媒对照组相比,雄性中剂量组大鼠给药第 3~5 周的摄食量显著降低(第 3, 4 周, $P < 0.05$; 第 5 周, $P < 0.01$),高剂量组大鼠给药第 3~6 周的摄食量显著降低($P < 0.01$);雌性低剂量组大鼠给药 3~6, 9, 10 周的摄食量显著降低(第 3~6, 9 周, $P < 0.01$; 第 10 周, $P < 0.05$),中剂量组大鼠给药 3~5, 9 周的摄食量显著降低($P < 0.01$),高剂量组大鼠给药 3, 4 周的摄食量显著降低($P < 0.01$)。后逐渐恢复,结果见表 2~3。

3.2.2 血液学检查 给药结束雌、雄大鼠各剂量组与溶媒对照组相比,红细胞计数、血红蛋白、红细胞容积、红细胞平均容积、红细胞平均血红蛋白含量、MCHC、Ret、白细胞计数、网织红细胞、白细胞计数、白细胞分类、血小板计数、红细胞分布宽度等未见显著差异。

表 1 青紫颗粒单次给药毒性试验大鼠体质量变化($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Body weight change of rats after single dose toxicity of Qingzi granules($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

分组	d1	d8	d15	分组	d1	d8	d15
溶媒对照组	197.42 \pm 7.14	281.28 \pm 11.30	331.62 \pm 18.69	溶媒对照组	191.82 \pm 7.10	242.92 \pm 6.12	258.80 \pm 6.21
低剂量组(δ)	196.24 \pm 5.37	281.74 \pm 7.69	334.22 \pm 9.24	低剂量组(φ)	193.58 \pm 5.92	244.68 \pm 7.57	262.42 \pm 11.97
高剂量组(δ)	195.44 \pm 7.67	284.68 \pm 6.79	342.82 \pm 14.49	高剂量组(φ)	194.06 \pm 7.88	234.88 \pm 13.60	254.18 \pm 14.82

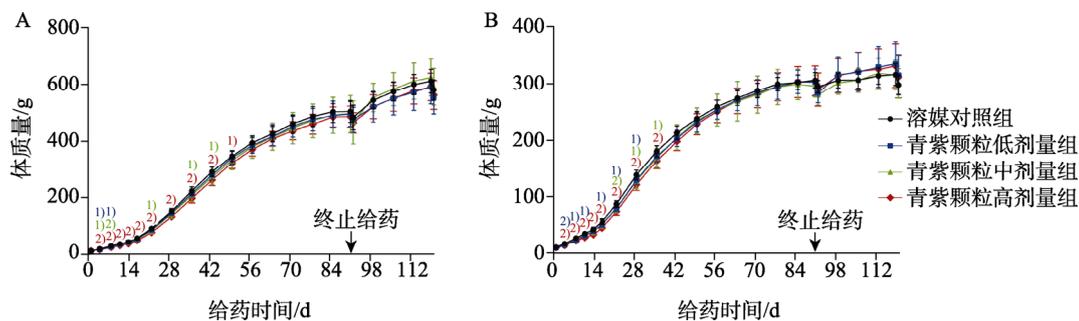


图1 青紫颗粒重复给药毒性试验期间幼龄大鼠的体质量

A-雄性大鼠; B-雌性大鼠。与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Body weight of juvenile rats during repeated dose toxicity of Qingzi granules

A-male rats; B-female rats. Compared with the vehicle control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表2 青紫颗粒重复给药毒性试验雄性幼龄大鼠摄食量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Food consumption of male juvenile rats after repeated dose toxicity of Qingzi granules($\bar{x} \pm s$)

时间	溶媒对照组	低剂量组(δ)	中剂量组(δ)	高剂量组(δ)
第3周(n=16)	10.5±0.6	10.2±0.4	9.9±0.8 ¹⁾	9.6±0.4 ²⁾
第4周(n=16)	16.4±0.8	16.3±0.7	15.2±1.5 ¹⁾	15.0±0.3 ²⁾
第5周(n=16)	22.8±1.0	22.4±0.7	21.9±0.8 ²⁾	20.7±0.6 ²⁾
第6周(n=16)	25.9±1.0	25.9±0.9	25.9±1.1	24.9±0.6 ²⁾
第7周(n=16)	26.8±0.7	27.8±0.8	27.1±0.9	26.4±0.5
第8周(n=16)	26.7±0.9	27.1±1.1	27.9±1.3	26.8±1.0
第9周(n=16)	26.5±1.2	27.8±0.3	27.1±1.2	26.9±0.8
第10周(n=16)	27.4±1.2	27.9±0.9	27.7±1.6	27.0±1.2
第11周(n=16)	27.6±1.9	27.8±1.1	27.8±1.1	27.9±1.7
第12周(n=16)	24.9±1.0	25.9±0.9	26.9±0.9	25.0±3.2
第13周(n=16)	26.3±1.0	26.2±1.8	26.5±1.0	25.5±1.2
第14周(n=6)	29.5±2.6	27.3±2.9	31.1±4.1	30.1±2.9
第15周(n=6)	31.8±3.3	29.5±2.8	33.3±4.5	31.9±3.0
第16周(n=6)	32.3±2.9	30.0±3.6	34.0±5.1	31.7±2.1
第17周(n=6)	30.8±2.7	29.1±3.0	33.1±4.5	31.3±2.0

注: 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with vehicle control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表3 青紫颗粒重复给药毒性试验雌性幼龄大鼠摄食量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Food consumption of female juvenile rats after repeated dose toxicity of Qingzi granules($\bar{x} \pm s$)

时间	溶媒对照组	低剂量组(δ)	中剂量组(δ)	高剂量组(δ)
第3周(n=16)	10.1±0.4	9.0±0.4 ²⁾	9.3±0.4 ²⁾	9.5±0.3 ²⁾
第4周(n=16)	14.9±0.2	14.3±0.2 ²⁾	14.1±0.5 ²⁾	13.9±0.6 ²⁾
第5周(n=16)	18.1±0.4	17.2±0.5 ²⁾	17.3±0.4 ²⁾	17.7±0.6
第6周(n=16)	19.5±0.5	18.5±0.8 ²⁾	19.3±0.3	19.0±1.0
第7周(n=16)	19.6±0.8	19.0±0.7	20.0±0.7	19.8±0.9
第8周(n=16)	19.6±0.5	19.5±0.9	19.5±0.8	20.0±1.0
第9周(n=16)	20.7±1.1	19.6±1.0 ²⁾	19.3±0.4 ²⁾	20.1±1.3
第10周(n=16)	20.2±1.0	19.2±1.0 ¹⁾	19.4±0.6	20.2±1.3
第11周(n=16)	20.0±1.0	19.2±0.5	19.9±1.5	20.0±1.0
第12周(n=16)	18.1±0.8	18.9±0.8	18.7±0.6	18.9±0.9
第13周(n=16)	17.6±3.6	18.4±0.6	18.9±0.3	18.7±0.8
第14周(n=6)	17.9±1.1	17.6±1.4	18.2±0.7	18.5±1.4
第15周(n=6)	17.1±1.1	17.9±1.8	18.4±0.9	19.6±3.1
第16周(n=6)	17.5±0.8	19.0±2.1	18.5±0.9	18.8±2.1
第17周(n=6)	17.8±1.2	18.3±1.8	17.2±1.1	18.2±2.2

注: 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with vehicle control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

恢复期结束, 雄性大鼠高剂量组中性粒细胞比例、淋巴细胞百分比显著变化($P<0.05$), 白细胞总数未见异常。雌性大鼠低剂量组 PDW 显著升高($P<0.05$), MCHC 显著升高($P<0.01$), 低、高剂量组大鼠的血小板水平显著下降($P<0.05$), 无剂量依赖关系。其他指标未见明显差异。

3.2.3 血液生化检查 给药结束雌性大鼠高剂量组 ALT、AST 显著降低($P<0.05$), 雄性大鼠高剂量组也有下降趋势, 恢复期恢复正常。碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰基转移酶、肌酸磷酸激酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、IgA、IgG、IgM、C3、C4 等指标未见显著差异。

恢复期雄性高剂量组大鼠的 Glu 含量显著降低($P<0.01$), Na^+ 含量显著升高($P<0.01$), 雌性高剂量组补体蛋白 C4 显著升高($P<0.05$), 见表 4~5, 上述变化在实验室背景数据范围内, 且无时效关系。碱性磷酸酶、AST、ALP、 γ -谷氨酰基转移酶、肌酸磷酸激酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、 K^+ 、 Cl^- 、IgA、IgG、IgM、C3 等未见异常。

3.2.4 尿液检查 给药结束高剂量组大鼠尿液颜色加深, 浊度、比重、pH 值、尿糖、尿蛋白、尿胆红素、尿胆原、酮体、亚硝酸盐、潜血或隐血、白细胞、红细胞、白细胞、上皮细胞、管型、细

菌等指标未见明显差异。

3.2.5 血清激素检查 与溶媒对照组相比, 恢复期结束, 雄性高剂量组大鼠的血清 E2 显著升高($P<0.01$), 无时效关系; 雌性大鼠无显著改变见表 4~5。睾酮、GH、T3、T4 未见明显差异。

3.2.6 细胞免疫指标 给药结束, 与溶媒对照组相比, 雄性低、高剂量组大鼠 CD3^+ 亚群细胞比例明显降低($P<0.05$), 低、中、高剂量组大鼠 CD8^+ 亚群细胞比例均显著降低($P<0.01$), 雌性大鼠低剂量组 CD8^+ 亚群细胞比例显著降低($P<0.01$), $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 未见显著差异, 恢复期恢复正常, 见表 6。

3.2.7 幼鼠发育指标 各剂量组大鼠的睁眼达标日、张耳达标日、生殖功能发育指标(睾丸下降、阴道张开、阴道张开达标日等)、反射发育指标(空中翻正反射、听觉惊愕反射、负趋地性反射达标日等)、自发活动检测指标(休息次数、休息时间、活动次数、活动时间、平均速度等), 未见显著性差异。

3.2.8 病理组织学检查 给药结束, 低、中、高剂量组大鼠均可见肝细胞局灶性变性坏死, 发生率为 1/20、1/20、1/20, 发生率和病变程度一致, 高剂量组发生 1 例(1/20)肝细胞多灶性炎性坏死, 均为轻度, 未表现出剂量相关性, 见图 2。恢复期, 低剂量组 1 只大鼠出现肝细胞局灶性变性坏死, 中、高剂量组大鼠未见肝细胞变性坏死。肝脏的脏器质量和脏器系数无统计学意义。

表 4 青紫颗粒重复给药毒性试验幼龄大鼠给药结束后血液学指标($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Hematologic indexes of juvenile rats after administration of Qingzi granules of repeated dose toxicity($n=10, \bar{x} \pm s$)

分组	中性粒细胞 比例/%(δ)	淋巴细胞 百分比/%(δ)	$\text{Na}^+/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{Glu}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{C4}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{E2}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}(\delta)$
溶媒对照组	24.30 \pm 7.00	69.80 \pm 7.90	144.60 \pm 1.90	6.56 \pm 0.81	0.06 \pm 0.01	15.60 \pm 5.10
低剂量组	25.30 \pm 11.60	69.50 \pm 11.50	144.50 \pm 1.80	6.52 \pm 0.86	0.06 \pm 0.01	16.20 \pm 6.00
中剂量组	24.00 \pm 6.60	70.90 \pm 6.30	144.20 \pm 1.90	6.12 \pm 0.74	0.06 \pm 0.01	16.50 \pm 5.10
高剂量组	26.20 \pm 8.60	68.00 \pm 8.40	144.50 \pm 1.00	6.97 \pm 1.22	0.06 \pm 0.02	16.70 \pm 3.70

表 5 青紫颗粒重复给药毒性试验幼龄大鼠恢复期结束后血液学指标($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Hematological indexes of juvenile rats after recovery period of repeated dose toxicity of Qingzi granules($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组	中性粒细胞 比例/%(δ)	淋巴细胞 百分比/%(δ)	$\text{Na}^+/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{Glu}/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{C4}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}(\delta)$	$\text{E2}/\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}(\delta)$
溶媒对照组	38.00 \pm 10.20	54.20 \pm 9.20	144.10 \pm 1.30	9.80 \pm 1.02	0.05 \pm 0.01	7.20 \pm 1.50
低剂量组	40.80 \pm 9.90	52.30 \pm 10.80	144.70 \pm 2.10	8.76 \pm 1.21	0.05 \pm 0.01	5.70 \pm 0.50
中剂量组	38.60 \pm 11.20	53.20 \pm 10.10	146.60 \pm 1.80	9.12 \pm 1.06	0.05 \pm 0.01	7.20 \pm 1.60
高剂量组	55.50 \pm 11.10 ¹⁾	38.60 \pm 10.20 ¹⁾	148.90 \pm 3.00 ²⁾	7.46 \pm 1.27 ²⁾	0.06 \pm 0.01 ¹⁾	19.20 \pm 2.90 ²⁾

注: 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the vehicle control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 6 青紫颗粒重复给药毒性试验幼龄大鼠给药结束后细胞免疫指标($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Cellular immunity indexes of juvenile rats after administration of Qingzi granules of repeated dose toxicity($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

分组	CD3 ⁺ %(♂)	CD4 ⁺ %(♂)	CD8 ⁺ %(♂)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (♂)	CD3 ⁺ %(♀)	CD4 ⁺ %(♀)	CD8 ⁺ %(♀)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (♀)
溶媒对照组	50.40±7.74	29.03±4.79	23.29±4.30	1.27±0.22	46.12±9.77	27.75±7.15	20.10±4.45	1.40±0.29
低剂量组	38.95±11.29 ¹⁾	25.10±7.28	15.62±5.48 ²⁾	1.74±0.47	37.55±8.08	24.88±5.59	13.77±3.73 ²⁾	1.87±0.49
中剂量组	44.29±6.40	28.94±7.20	16.68±4.55 ²⁾	1.96±1.18	47.93±5.24	31.00±5.15	18.06±3.63	1.84±0.71
高剂量组	39.80±9.89 ¹⁾	25.82±7.01	15.01±3.73 ²⁾	1.74±0.37	47.36±7.88	30.68±8.11 ¹⁾	18.93±3.74	1.70±0.65

注: 与溶媒对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the vehicle control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

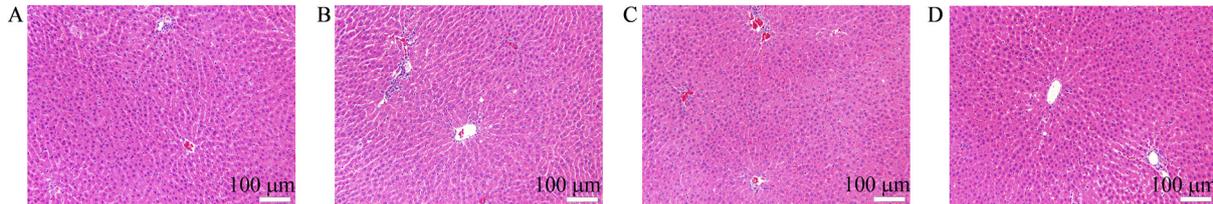


图 2 青紫颗粒重复给药给药结束后各组幼龄大鼠肝组织病理切片(HE, 200×)

A-溶媒对照组; B-低剂量组; C-中剂量组; D-高剂量组。

Fig. 2 Hepatic tissue sections of juvenile rats after long-term administration of Qingzi granules(HE, 200×)

A-vehicle control group; B-low dose group; C-medium dose group; D-high dose group.

给药结束, 溶媒对照组和高剂量组大鼠出现轻微心肌炎细胞灶、肾小管嗜碱性变和肾脏间质慢性炎症, 溶媒对照组和高剂量组发生率相当或发生率较低, 考虑为 SD 大鼠自发性病变。其他脏器组织未见明显病理学改变。

4 讨论

由于儿童处于生长发育时期, 各器官功能及免疫系统尚未完全成熟, 药物的药动学参数与成人差异较大, 因此, 用传统的成人经典方的剂量推测儿童用量, 往往会使不良反应发生率增加^[10]。为保障儿童用药安全, 美国 FDA 和欧洲 EMA 分别于 2006 和 2008 年颁布了幼龄动物安全性评价指导原则, 用以指导临床前研究^[12]。2017 年中国公布《儿科用药非临床安全性研究技术指导原则》(征求意见稿), 目前中国全面遵循 ICH S11 指导原则, 推进了儿科用药监管要求与国际接轨^[13]。本研究通过观察青紫颗粒的单次给药以及重复给药对大鼠的毒性反应, 探索合适的评价指标和无毒反应的安全剂量, 为儿童临床用药提供实验依据。

在青紫颗粒的单次给药毒性试验中, 采用最大给药量法, 给药浓度为青紫颗粒的最大可行溶解度^[14]。由于幼龄动物的给药量有限, 因此单次给药毒性试验选取成年动物^[15-16]。青紫颗粒给药组大鼠在第 2 天出现黑便和稀便, 可能是该给药浓度下给药体积较大导致的。此部分结果提示该

剂量下青紫颗粒对 SD 大鼠无明显毒性, 最大耐受量 $>18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (即生药 $104 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 提示临床拟用剂量是安全的。

在青紫颗粒的重复给药毒性试验中, 除了常规毒理指标, 也开展了针对幼龄大鼠发育相关终点检测, 如睁眼达标日、张耳达标日、生殖功能发育指标等, 选择的研究方法和指标可以满足中药幼龄动物毒性评价需求^[13,17]。

重复给药毒性试验结果发现, 给药初期大鼠的摄食量和体质量均显著低于溶媒对照组, 且出现稀便, 逐渐恢复正常, 这可能与幼龄大鼠胃肠道发育不完善有关; 青紫颗粒给药组在给药期间出现黑便, 给药结束后高剂量组尿液颜色加深, 但组织病理未见消化系统和肾脏出现与青紫颗粒相关的明显毒性改变, 考虑与药物颜色较深有关。各组大鼠的血液生化指标, 在给药结束未见与青紫颗粒相关的异常, 恢复期雄性大鼠高剂量组中性粒细胞比例、 Na^+ 显著升高, 淋巴细胞百分比、血糖显著降低, 雌性高剂量组补体蛋白 C4 显著升高, 上述变化缺少时效关系, 并且没有剂量依赖关系, 无毒理学意义, 但以上变化均出现在高剂量组, 临床应用时建议加强对血糖、 Na^+ 、C4 的监测。给药结束后, 与溶媒对照组相比, 低、高剂量组雄性大鼠的 CD3⁺亚群细胞比例明显降低, 低、中、高剂量组大鼠的 CD8⁺亚群细胞比例均显著降低, 雌性大鼠低剂量组 CD8⁺亚群细胞比例均

显著降低, 而 CD4⁺/CD8⁺未见显著差异, 恢复期恢复正常, 表明青紫颗粒对 T 细胞亚群分类有一定的影响, 但剂量效应关系不明显, 且具有可恢复性, 故不认为是毒性损害。给药结束后, 低、中、高剂量组大鼠各有 1 例(1/20, 1/20, 1/20)肝细胞局灶性变性坏死, 程度为轻度, 恢复期低剂量组发生 1 例(1/12)局灶性肝细胞变性坏死, 剂量效应关系不明显, 临检肝功能和肝损伤相关指标也未出现异常, 不能排除与青紫颗粒的相关性, 但并非有害损伤。在中药重复给药毒性试验中, 常出现肝脏的局限性坏死, 频率较低(1/40~2/40), 程度轻微/轻度, 多不影响肝功能^[10]。由于局灶性坏死的发生部位随机且发生率不一, 除非给药组动物局灶性肝细胞坏死病变程度明显加重, 否则通常认为给药组动物该病变的发生频率轻微增加与给药无关^[18]。为保障用药患儿安全, 临床应用时建议加强对肝功能指标的监测。综上, 重复给药毒性试验中, 部分指标如中性粒细胞比例、淋巴细胞百分比、Na⁺、血糖、C4 及性激素雌二醇在给药结束未表现出显著差异, 但是在恢复期结束高剂量组出现显著差异, 虽然未见与青紫颗粒相关的组织病理学改变, 但考虑到青紫颗粒为儿童用药, 为保障儿童正常的生长发育, 本实验最大无毒性反应剂量(no observed adverse effect level, NOAEL 值)拟定为青紫颗粒中剂量组 2 g·kg⁻¹(即生药 11.56 g·kg⁻¹)。

综上所述, 可预测以青紫颗粒的临床剂量连续用药 14 d, 是比较安全的。青紫颗粒在临床上值得进一步推广开发, 为中药制剂治疗过敏性紫癜提供支撑。

REFERENCES

- [1] HUANG J, YANG Y. Clinical observation and mechanism of Qingzi Heji treating children's HSP[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2014, 32(7): 1789-1792.
- [2] MA B R, NI J, PANG L N, et al. Study on the preparation technology and quality control of Qingzi granules[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2021, 37(2): 18-23.
- [3] MIAO F, FENG C R, DONG L L, et al. Protective effect of Qingzi granules on gliadin-induced kidney injury in mice[J].

Chin Pharm(中国药师), 2021, 24(11): 1967-1974.

- [4] MIAO F, DONG L L, FENG C R, et al. Qingzi granules inhibit serum immune complex and protect renal tissues in rats with Henoch-Schonlein Purpura induced by ovalbumin[J]. Centr South Pharm(中南药学), 2020, 18(5): 756-760.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2020: 251.
- [6] 国家药品监督管理局. 药物单次给药毒性研究技术指导原则[S]. 2014: 1-12.
- [7] 国家药品监督管理局. 药物非临床研究质量管理规范[S]. 2017.
- [8] LU H J, ZHANG X X, LIANG Z X, et al. Study on acute toxicity and long-term toxicity of Jianshen granules[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2021, 30(9): 824-830.
- [9] 国家药品监督管理局. 药物重复给药毒性试验技术指导原则[S]. 2014: 1-12.
- [10] WANG Y, WANG R, LUO Y W, et al. Repeated dose toxicity study and strategies for safety assessment of Compound Yizhihao particles in juvenile rats[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(14): 1660-1666.
- [11] HUANG F H, WANG Q L, RIDINGS J, et al. Juvenile animal toxicity study: Design, conduct, and report[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(2): 151-161.
- [12] FDA. Guidance for industry on nonclinical safety evaluation of pediatric drug products[S]. 2019: 1-13.
- [13] International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. Nonclinical safety testing in support of development of paediatric pharmaceuticals[S]. 2020: 1-43.
- [14] YE K, YE X F, HUANG J J, et al. Comparative study on acute toxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta, Pinelliae Rhizoma Praeparatumcum Zingibere et Alumine formula granule and decoction[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(9): 1347-1350.
- [15] HE T D, CHEN Y Z, WANG Y L, et al. Study of acute and long-term toxicity of Xiaozhike granules[J]. Glob Tradit Chin Med(环球中医药), 2014, 7(S2): 1-2.
- [16] 温慧敏, 尹小娟, 杨沙, 等. 小儿伤科方配方颗粒、泡腾颗粒的急性毒性和亚慢性毒性试验[J]. 四川中医, 2019, 37(11): 50-53.
- [17] ZHANG C D, SONG Y S, HU R, et al. Repeated dose toxicity of compound *Taraxacum mongolicum* extract in juvenile rats[J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2020, 30(2): 33-42.
- [18] SAHOTA P S, POPP J A, HARDISTY J F, 等. 毒理病理学: 非临床安全性评价[M]. 吕建军等主译. 北京: 北京科学技术出版社, 2018.

收稿日期: 2022-04-28

(本文责编: 陈怡心)