

连翘颗粒剂的急性亚急性毒性试验研究

吴悦, 陈俭清, 赵玉莲, 李贤贤, 李鹤, 李艳华*

(东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030)

[收稿日期] 2012-10-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0023-04 [中图分类号] S853.74

[摘要] 为了评价连翘颗粒剂的安全性, 对其进行了急性、亚急性毒性试验研究。首先, 急性毒性试验确定最大给药剂量为 100 g/kg; 亚急性毒性试验选用昆明小鼠 80 只随机分为四组: 对照组及连翘各剂量组 (100 g/kg、33.3 g/kg、10 g/kg), 分别在给药的第 7 日和第 14 日时, 对各组小鼠进行一般症状观察并分别检测血液中的血红蛋白、红细胞数、白细胞数和血清中的谷草转氨酶 (GOT)、谷丙转氨酶 (GPT)、肌酐 (CR)、尿素氮 (BUN) 和碱性磷酸酶 (AKP)。结果表明, 各项指标与正常组相比无显著差异, 连翘颗粒剂的毒性较低, 临床用药安全可靠。

[关键词] 连翘颗粒剂; 昆明系小鼠; 急性毒性试验; 亚急性毒性试验

Research of Acute and Subacute Toxicity for Forsythiae Granules

WU Yue, CHEN Jian-qing, ZHAO Yu-lian, LI Xian-xian, LI He, LI Yan-hua*

(Northeast Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to evaluate the security of forsythiae granules, the acute and subacute toxicity of forsythiae granules was tested in mice. The acute toxicity test selected 100 g/kg as the maximum dosage firstly. The subacute toxicity test used 80 mice, randomly divided into four groups: control group, forsythiae granules each does groups (100 g/kg, 33.3 g/kg, 10 g/kg). At the 7 th day and the 14 th day of giving medicines, the common symptom of the mice was observed in each group. Then detection hemoglobin, erythrocytes number, leukocyte number and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)、glutamic-pyruvic transaminase (GPT)、creatinine (CR)、blood urea nitrogen (BUN)、alkaline phosphatase (AKP) in serum. The results showed that the blood physiological and biochemical indexes compared with the normal group were no significant differences. It also demonstrated that the forsythiae granules had lower toxicity and were safety for clinical application.

Key words: forsythiae granules; Kunming mice; acute toxicity test; subacute toxicity test

连翘颗粒剂是针对现阶段细菌的广泛耐药性^[1,2], 而研制出的能减少耐药性的中成药制剂, 具有清热解毒之功效, 主要用于预防和治疗猪链球菌引起的疾病, 有效的解决了猪链球菌耐药性的问题^[3-6]。其主要成分连翘是木犀科连翘属^[7], 具有抗菌、强心、利尿、清热解毒等功效。为了对连翘颗粒剂的安全性进行客观评价, 根据农业部新兽药一

般毒性试验技术要求^[8], 对其进行了急性毒性试验和亚急性毒性试验研究, 为新药的临床阶段提供理论依据。

1 材料

1.1 试验动物 清洁级昆明系小鼠, 体重在 17 ~ 20 g 之间, 雌雄各半, 雌性未产无孕, 购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题“防治猪流感中兽药的研制与开发”国家科技支撑项目 (2011BAD34B01-03)

作者简介: 吴悦, 硕士研究生, 从事兽医药理与毒理学方面研究。

通讯作者: 李艳华。E-mail: liyanhua_1970@163.com

1.2 试验药物及化学试剂 连翘颗粒剂,自行研制的耐药抑制剂其主要成分是连翘酯苷。具有清热解毒,散结消肿之功效,临用前用蒸馏水配成相应的浓度;测定生化指标(GPT、GOT、AKP、肌酐和尿素氮)的试剂盒(批号:20111010),南京建成生物工程研究所。

1.3 试验仪器 BT224S 型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;7504 型紫外分光光度计,上海精科实业有限公司;DK-8D 型电热恒温水槽,上海精宏实验设备有限公司;TGL-16G 离心机,湖南星科科学仪器有限公司;DH6000A 型恒温箱,天津市泰斯特仪器有限公司;光学显微镜等。

2 方 法

2.1 急性毒性试验 取 20 只小鼠随机分为两组,每组雌雄各半。试验组一次性灌胃给药 100 g/kg (最大给药剂量),对照组灌以等容积的生理盐水。连续观察 7 d。根据上下法^[9],找出 0% 和 100% 的死亡率的药物浓度。

2.2 亚急性毒性试验

2.2.1 动物分组及给药剂量 将 80 只小鼠随机分成四组,每组 20 只,雌雄各半。分别为连翘颗粒剂高剂量组、中剂量组、低剂量组和对照组,给药剂量根据预试验结果,按最大给药量从高到低分别给药为 100 g/kg、33.3 g/kg、10 g/kg,对照组灌于等量的生理盐水。用金属灌胃器经口给药,每天 2 次。试验期间所有小鼠标准饮食,自由饮水。

2.2.2 检测指标 分别在给药的第 7 日和第 14 日时,对各组小鼠进行一般症状检查。将小鼠断尾采血,然后对其血液生理指标(血红蛋白、红细胞、白细胞、白细胞分类计数)进行测定。将小鼠进行眼球采血后,分离血清,进行血液生化指标(GPT、GOT、AKP、肌酐和尿素氮)的检测。

2.3 统计学处理 对一般症状检查采用 *t* 检

验^[10]方法进行统计学分析。血液生理生化试验结果数据均采用平均值±标准差($\bar{X} \pm s$)的形式表示。用 Spss 17.0 中 One-way ANOVA 的 LSD 法进行差异显著性分析。

3 结 果

3.1 急性毒性试验最大耐受量测定结果 当给药量 5000 mg/kg 时,致死量仍然为 0%,无法测出半数致死量(LD50),因受试药物的浓度或体积限制,只能测出最大耐受量。

以 100 g/kg 的药物浓度给小鼠灌胃,给药当天小鼠被毛光滑,有腹泻症状,粪便呈黄褐色,采食、活动减少;第 2 日后小鼠采食量、活动量及粪便情况都恢复正常,与空白组无明显差异。到第 7 日时,小鼠未出现死亡状况。

3.2 亚急性毒性试验结果

3.2.1 连翘颗粒剂对昆明系小鼠一般症状的影响

在试验期间,均未发现有小鼠因药物原因而出现的死亡状况。试验中各组小鼠的进食量、饮水量、精神状况、被毛光泽度无异常变化。各组小鼠的体重均在正常范围内变化。结果表明各组差异不显著,见表 1。

3.2.2 连翘颗粒剂对昆明系小鼠血液生理指标的影响

连翘颗粒剂对昆明系小鼠生理指标的影响结果见表 2。3 个剂量组的血红蛋白、红细胞数、白细胞数、淋巴细胞百分比、中性粒细胞百分比与对照组间差异均不显著($P > 0.05$)。红细胞计数各组 14 d 比 7 d 相比较,除高剂量组外其他三组的值略有升高,其中中低剂量组增加幅度较大。白细胞计数 7 d 和 14 d 各组比较变化均不明显,14 d 与 7 d 各剂量组相比较均有不同程度的降低。淋巴细胞百分比和中性粒细胞百分比在第 14 日时都比第 7 日时有较大幅度的增加。血红蛋白在第 14 d 时除高剂量组降低外,其他三组均有不同程度的增加。

表 1 连翘颗粒剂对昆明系小鼠体重的影响 (n = 20)

组别	初体重/g	7 d 的体重/g	7 d 变化量/g	14 d 体重/g	14 d 变化量/g
对照组	17.86 ± 4.51	18.52 ± 3.45	+0.66	19.11 ± 3.56	+0.59
高剂量组	17.55 ± 2.35	18.86 ± 2.25	+1.31	19.36 ± 2.58	+0.50
中剂量组	17.43 ± 2.44	18.60 ± 2.11	+1.17	18.93 ± 2.54	+0.33
低剂量组	18.09 ± 1.99	18.90 ± 1.83	+0.81	19.12 ± 2.20	+0.22

表2 连翘颗粒剂对昆明系小鼠血液部分生理指标的影响($\bar{X} \pm s, n = 20$)

组别	白细胞计数	红细胞计数	淋巴细胞百	中性粒细胞	血红蛋白	
	WBC/(10 ⁹ · L ⁻¹)	RBC/(10 ¹² · L ⁻¹)	分比 w - scr	百分比 w - lcr	HB/(g · L ⁻¹)	
7 d	对照组	5.97 ± 0.94	4.87 ± 0.39	76.33 ± 11.68	19.67 ± 5.86	153.70 ± 16.20
	高剂量组	6.87 ± 2.89	5.56 ± 2.22	82.00 ± 8.00	21.00 ± 2.65	132.60 ± 37.24
	中剂量组	7.48 ± 2.37	4.74 ± 0.71	73.67 ± 1.16	24.67 ± 2.08	114.40 ± 7.83
	低剂量组	6.55 ± 0.98	4.84 ± 0.38	74.00 ± 14.00	19.00 ± 1.73	111.00 ± 32.63
14 d	对照组	5.85 ± 0.78	5.20 ± 0.35	97.00 ± 43.84	29.50 ± 23.34	186.24 ± 12.74
	高剂量组	6.47 ± 2.00	4.68 ± 0.53	98.67 ± 11.72	39.00 ± 13.08	101.98 ± 14.17
	中剂量组	5.45 ± 2.30	6.78 ± 1.03	93.33 ± 25.93	39.67 ± 13.58	123.79 ± 19.64
	低剂量组	5.95 ± 3.60	6.29 ± 1.10	80.50 ± 28.35	23.50 ± 6.56	138.14 ± 35.90

注: * 表示差异显著($P < 0.05$); * * 表示差异非常显著($P < 0.01$);无星号表示组间差异不显著($P > 0.05$). 下表同

3.2.3 连翘颗粒剂对昆明系小鼠生化指标的影响
连翘颗粒剂对昆明系小鼠生化指标的影响结果见表3。第7日高剂量组的GOT值高于其他三组,在第14日时高剂量组的GOT与对照组差异显著($P < 0.05$);在第14日,各组的GPT均有不同程度的增加;除中剂量组的CR值减少,其他三组的CR

值有增加;BUN的值均有不同程度的增加,其中对照组和中剂量组的增加幅度较大;空白组和高剂量组的AKP增加,而中低剂量组的AKP减少。除第14日的GOT高剂量组与对照组差异显著($P < 0.05$)外,其他各组的各项指标均差异不显著($P > 0.05$)。

表3 连翘颗粒剂对昆明鼠部分生化指标的影响($\bar{X} \pm s, n = 20$)

	组别	GOT	GPT	CR/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	BUN/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	AKP/(金氏单位 $\cdot \text{mL}^{-1}$)
7 d	对照组	60.00 $\pm$ 6.24	21.67 $\pm$ 7.64	113.10 $\pm$ 14.10	145.80 $\pm$ 26.81	14.16 $\pm$ 2.23
	高剂量组	72.00 $\pm$ 8.54	57.33 $\pm$ 6.43	92.17 $\pm$ 43.80	114.30 $\pm$ 47.69	20.97 $\pm$ 12.95
	中剂量组	68.00 $\pm$ 2.65	30.33 $\pm$ 4.62	120.60 $\pm$ 4.97	190.90 $\pm$ 24.56	27.28 $\pm$ 9.76
	低剂量组	68.33 $\pm$ 3.06	53.67 $\pm$ 9.07	65.29 $\pm$ 53.05	180.40 $\pm$ 21.48	23.44 $\pm$ 10.2
14 d	对照组	63.00 $\pm$ 9.64	36.67 $\pm$ 11.60	119.12 $\pm$ 29.44	226.97 $\pm$ 124.73	16.80 $\pm$ 3.04
	高剂量组	84.00 $\pm$ 6.08 *	60.33 $\pm$ 7.37	113.42 $\pm$ 22.62	150.70 $\pm$ 9.57	21.87 $\pm$ 9.88
	中剂量组	77.33 $\pm$ 6.66	46.33 $\pm$ 5.13	91.95 $\pm$ 23.53	222.77 $\pm$ 100.58	26.87 $\pm$ 9.88
	低剂量组	69.67 $\pm$ 4.51	60.67 $\pm$ 6.03	103.73 $\pm$ 26.16	191.73 $\pm$ 31.29	22.67 $\pm$ 9.27

注: GOT 谷草转氨酶; GPT 谷丙转氨酶; CR 肌酐; BUN 尿素氮; AKP 碱性磷酸酶。

4 讨 论

连翘颗粒剂为自主研发的耐药抑制剂,主治猪链球菌引起的相关疾病。连翘颗粒剂是向连翘提取物中加入乙醇,经滤过、回收、浓缩等步骤后,加入糊精和糖粉所得到的混合物制备成颗粒状所制成的^[11-12]。连翘是我国传统中药,已被载入药典,用于治疗风热感冒、高热烦渴等症状,但目前,连翘在用于动物疾病的防治方面的研究较少^[13]。所以连翘颗粒剂的研发,目的是要解决由猪链球菌所引起的相关疾病的耐药性问题。
从连翘颗粒剂的急性、亚急性毒性试验结果分析,在用药期间各剂量组的昆明系小鼠均未出现因药物原因而死亡的情况。根据新兽药一般毒性试验技术要求,短期给予药物毒性较低,比较安全。在试验期间,小鼠的体重均有不同程度的增加。各剂量组之间差异不显著,表明药物对小鼠的食欲及健康状况没有影响。

血液生理指标是检验药物毒性的很重要的指标,试验结果表明,红细胞数、白细胞数、中性粒细胞数和淋巴细胞数、血红蛋白的含量与对照组比较差异均不显著,故判断药物的毒性低。已有研究表明,根据化学物急性毒性(LD50)剂量分级表,连翘酯苷分级为低毒^[14]。而连翘酯苷不止对实验动物本身,对胚胎、胎儿和致畸性也均无明显毒性^[15]。由此可见,连翘酯苷作为连翘颗粒剂的主要成分,在以往的实验中证实了其低毒安全的特性。
血液生化指标是测定药物对肝肾的毒性作用,本试验结果表明,除第14日的谷草转氨酶(GOT)测定项的高剂量组出现了差异显著($P < 0.05$)外,其他各剂量组的血液生化指标均无明显差异。因转氨酶是反映肝脏功能的重要指标,且只有肝脏受到严重伤害时谷草转氨酶才会出现偏高,可以看出,长期服用高浓度的该药物对肝脏有一定的损害,但中、低剂量组与对照组相比差异不显著,说明中、低剂量比较安全。

苦参苍术口服液的抗炎与止泻作用研究

高艳艳¹, 张志伟², 康 慧²

(1. 国家兽用药品工程技术研究中心, 河南洛阳 471003; 2. 河南新正好生物工程有限公司, 郑州 451162)

[收稿日期] 2012-09-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 04-0026-03 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为研究苦参苍术口服液的抗炎、止泻作用, 观察了不同剂量苦参苍术口服液对二甲苯致小鼠耳肿胀及蓖麻油致小鼠腹泻的影响。结果显示, 苦参苍术口服液能抑制二甲苯导致的小鼠耳肿胀, 减轻蓖麻油造成的小鼠腹泻, 并呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$), 提示其具有明显的抗炎和止泻作用。该试验可为参苍术口服液的进一步研究与临床应用提供参考。

[关键词] 苦参苍术口服液; 止泻; 抗炎; 小鼠

Study on the Anti-inflammatory and Anti-diarrhea Effects of Kushencangzhu Oral Liquid in Mice

GAO Yan-yan¹, ZHANG Zhi-wei², KANG Hui²

(1. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471003, China;

2. Henan Xinzhenghao Bioengineering Co. Ltd, Zhengzhou 451162, China)

Abstract: In order to study the anti-inflammatory and anti-diarrhea effects of Kushencangzhu oral liquid, the experiment was conducted in mice. Xylene-induced ear edema model mice were used to test the anti-inflammatory

作者简介: 高艳艳, 硕士, 从事新兽药研发工作。E-mail: gyy2009@foxmail.com

研究发现连翘酯苷在体内外实验中对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和链球菌均有较好的抑制作用^[16-17], 应用前景广泛。近期研究表明, 连翘中苯乙醇苷类成分具有较强抗菌活性, 在评价连翘及其以抗菌为主要功效的制剂质量时, 以连翘酯苷作为主要特征成分比连翘苷更合适^[18], 但其抗菌作用机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 郑 璇, 郑育洪. 国内外超级细菌的研究进展及防控措施[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 1(28): 69-75.
- [2] 李明雁, 王 敏, 崔 琳, 等. 阿莫西林-泰乐菌素复方药物的安全性试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(9): 66-68.
- [3] 边 栋, 崔 阳, 崔 琳, 等. 连翘-阿莫西林的急性亚急性毒性试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(6): 47-48.
- [4] 周德刚, 张晓会, 刘兴金, 等. 双黄连口服液的急性毒性试验研究[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(12): 29-30.
- [5] 唐一鸣, 姜中其, 陈 俭. 乳酸恩诺沙星对小鼠的急性毒性试验[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(4): 29-30, 60.
- [6] 张东玲, 张秀英, 陈晓霞. 中药复方口服液的急性毒性与蓄积性毒性实验研究[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(7): 16-18.

- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版[S].
- [8] 中华人民共和国农业部. 新兽药一般毒性试验技术要求[S].
- [9] 国家食品药品监督管理局·化学药物指导原则(药理毒理部分各论)GPT1-1, 化学药物急性毒性试验技术指导原则[S].
- [10] 谢 庄. 兽医统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [11] 李艳华. 连翘颗粒剂的制备方法[P]. 中国: CN101653481, 2010-02-24
- [12] 刘 逊, 陈俭清, 李明雁, 等. 星点设计-效应面法优化连翘颗粒剂的制备工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 130-133
- [13] 刘世旺, 徐艳霞, 郑永良. 连翘乙醇提取物对细菌生长曲线的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7383-7384.
- [14] 毛东有, 张中文, 杨 明, 等. 连翘酯苷对小鼠的急性毒性及体内诱导 IFN- α 的研究[J]. 动物医学进展, 2009, 30(6): 15-17.
- [15] 朱江波, 邱建平, 朱玉平, 等. 连翘酯苷冻干粉对 SD 大鼠的致畸作用[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(7): 570-573.
- [16] 王宏军, 蒋 红, 吴国娟. 连翘酯苷在体外与体内的抑菌效果研究[J]. 中国饲料, 2005, 10: 26-27.
- [17] 冯淑怡, 李先荣, 孙建宁. 连翘酯苷抗感染、解热作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 73-75.
- [18] 刘 明. 中药连翘药理作用的研究近况[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(16): 2438-2439.

(责任编辑: 陈 希)