

· 毒理 ·

青蒿素哌喹片对恒河猴经口给药急性毒性实验

郭起岳¹, 宋健平^{1,2*}, 茹丽¹, 袁征¹, 刘婵¹, 关业枝¹, 徐勤^{1,2}, 王琪^{1,2}, 郭嘉雯¹

(1. 广州中医药大学 科技产业园, 广州 510445; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 考察青蒿素哌喹片(ATQ)对恒河猴单次经口给药可能产生的毒性反应, 评价其安全性。方法: 采用近似致死量法进行实验。对恒河猴单次经口给予青蒿素哌喹片, 给药剂量为 168, 377, 849, 1 910, 4 296 mg·kg⁻¹, 每个剂量 1 只动物, 观察 14 d 内恒河猴的毒性反应和死亡情况, 求得 ATQ 对恒河猴的近似致死剂量范围, 称量体重、摄食量, 检测血液学及血液生化学, 对所有恒河猴解剖并进行大体病理观察。结果: 所有恒河猴 14 d 内未出现死亡。4 296, 1 910 mg·kg⁻¹ 剂量 ATQ 可使恒河猴出现呕吐及摄食减少, 其中 4 296 mg·kg⁻¹ 剂量组恒河猴体重减轻。结论: ATQ 对恒河猴单次经口给药的近似致死剂量大于 4 296 mg·kg⁻¹ (相当于临床剂量的 257 倍)。

[关键词] 青蒿素哌喹片; 急性毒性; 恒河猴; 血液学; 血液生化学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0167-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140167

Acute Toxicity Test of Artemisinin and Piperaquine Tablets in Rhesus Monkeys by Oral Administration

GUO Qi-yue¹, SONG Jian-ping^{1,2*}, RU Li¹, YUAN Zheng¹, LIU Chan¹, GUAN Ye-zhi¹,

XU Qin^{1,2}, WANG Qi^{1,2}, GUO Jia-wen¹

(1. Sci-tech Industrial Park, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible toxic reactions of Artemisinin and Piperaquine tablets in rhesus monkeys by oral administration, and evaluate its safety. **Method:** Approximate lethal dose method was used for the experiment. Artemisinin and Piperaquine tablet was given to 5 rhesus monkeys at the doses of 168, 377, 849, 1 910, 4 296 mg·kg⁻¹ respectively. Animals were observed with a period of 14 days for the toxic reactions and death. Their body weight, food intake, haematology and blood biochemistry indexes were measured, and gross pathological observation was conducted after anatomy in all rhesus monkeys, in order to calculate the range of approximate lethal dose. **Result:** No death appeared during 14 days observation. Vomiting and food intake reduction appeared in doses of 4 296, 1 910 mg·kg⁻¹, and decrease in body weight was observed in monkey at the dose of 4 296 mg·kg⁻¹. **Conclusion:** Approximate lethal dose of Artemisinin and Piperaquine tablets is greater than 4 296 mg·kg⁻¹ (equivalent to 257 times of clinical dose) in rhesus monkeys by oral administration.

[Key words] Artemisinin and Piperaquine tablets; acute toxicity; rhesus monkey; hematology; biochemics of blood

青蒿素哌喹片(artequick, ATQ)是由广州中医药大学李国桥教授带领的青蒿素抗疟团队开发出的

第 4 代青蒿素哌喹复方^[1], 由青蒿素和哌喹组成, 是一种新的固定剂量的青蒿素复方制剂, 属于化学

[收稿日期] 20150703(002)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011B010500008, 2012B010300003)

[第一作者] 郭起岳, 硕士, 主管中药师, 从事药物安全性评价研究, Tel: 020-87463700, E-mail: 404494807@qq.com

[通讯作者] * 宋健平, 博士, 教授, 从事中医药防治热带病研究, Tel: 020-87473318, E-mail: songjipgz@sina.com

1.5 类新药,用于治疗无并发症的抗药性恶性疟疾。该药是从双氢青蒿素哌啶片改进而来,临床研究证明具有高效、速效的特点,不良反应较少,疗程较短,药品稳定性较好^[2-3]。但是,若服用 ATQ 超过推荐临床剂量,不良反应发生率增加,反应程度加重,会出现头晕、疲倦、嗜睡、脸麻、恶心、呕吐等自限性症状^[4]。本研究采用近似致死剂量法观察恒河猴单次经口给予 ATQ 后产生的急性毒性反应,为 ATQ 的安全性评价及临床研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 恒河猴,普通级,6 只,雌雄各半,3~5 岁,体重 4~6 kg,由高要市康源实验动物科技有限公司提供,动物合格证号 SCXK(粤)2014-0025;动物在普通级环境适应性饲养 10 d 后进行实验,每天饲喂猴维持饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供,同时定量投喂新鲜干净的水果或蔬菜^[5]。

1.2 药物 ATQ 含青蒿素 61.4,哌啶 372.6 mg,由广东新南方青蒿科技有限公司提供,批号 20140101,临床用药途径为口服,成人每日服用量 2 片,每片 0.5 g。给药前以纯净水配成所需浓度的 ATQ 溶液。

1.3 仪器 EB60EDE-1 型电子台秤(德国赛多利斯集团),ADVIA 2120i 型全自动血液分析仪(Siemens),7080 型全自动生化分析仪(HITACHI 日立集团),Easylyte 型电解质分析仪(美国 MEDICA 公司)。

2 方法

2.1 采用近似致死剂量法^[6-7] ATQ 可配制的最大质量浓度为 $286 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,按猴最大给药体积 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[8] 计算,ATQ 对猴经口给药的最大量 $4296 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据 ATQ 对小鼠的 LD_{50} 为 $2\ 802.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[9],采用体表面积公式 $\lg S = 0.8762 + 0.6981 \text{ gW}$ 计算得出恒河猴的等效剂量约为 $565.79 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按 50% 递增法,设计出含数个剂量的序列。选取 5 只恒河猴(3 雄性,2 雌性),每间隔 1 个剂量给 1 只动物,共 5 个剂量(168,377,849,1 910,4 296 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别以 11,25,57,127,286 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度的 ATQ 药液按 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次经口给药,给药后 48 h,观察 5 个剂量下恒河猴死亡情况。如果 5 个剂量下恒河猴有死亡发生,以最低致死剂量和最高非致死剂量之间的剂量给予下一只恒河猴,求近似致死剂量范围。如果 5 个剂量下恒河猴无死亡发生,不再对其余恒河猴给药。

2.2 给药后立即观察并记录给药后 8 h 内恒河猴

毒性反应和死亡情况,然后每天上、下午各观察 1 次恒河猴,观察内容包括外观、行为、对刺激的反应、分泌物和排泄物等,连续观察 14 d。记录动物毒性出现时间及恢复时间、死亡情况以及死亡分布时间,对死亡动物进行尸检,肉眼观察主要脏器的改变。在给药前及药后第 1,7,14 天分别称量存活恒河猴体重。在给药前及药后第 0,6,12 天分别观察存活恒河猴摄食状况。在给药前及给药后第 14 天静脉采血,进行血液学及血液生化学检查。在药后第 14 天对所有的实验恒河猴进行大体解剖,肉眼观察主要脏器的改变;当器官出现体积、颜色、质地等改变时,进行组织病理学检查。

3 结果

3.1 一般观察 给药后 8 h 连续观察,各剂量组恒河猴均未见异常。给药后第 1 天(D_1)上午,ATQ 1 910,4 296 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴笼内见呕吐物(饲料,分别约为进食量的 1/2,1/4);其余时间点,各剂量组恒河猴均未见异常。

3.2 对恒河猴体重的影响 ATQ 4296 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴体重仅在给药后 D_1 有所降低;其余恒河猴体重在各时间点均未见异常。见表 1。

表 1 ATQ 对恒河猴体重的影响

Table 1 Effects of ATQ on weight of rhesus monkeys kg

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	性别	D_0	D_1	D_7	D_{14}
ATQ	168	雄性	4.096	4.140	4.148	4.152
	377	雌性	4.652	4.746	4.754	4.760
	849	雄性	5.826	5.856	5.872	6.042
	1 910	雌性	4.866	4.870	4.878	4.970
	4 296	雄性	5.036	4.860	5.198	5.202

3.3 对恒河猴摄食状况的影响 给药当天(D_0),ATQ 1 910 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴第 1 次摄食状况为中,第 2 次摄食状况为好;4 296 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴第 1 次、第 2 次摄食状况均为中。其余时间点,各剂量组恒河猴摄食状况均为好。见表 2。

3.4 对恒河猴血液学的影响 与给药前比较,在给药 D_{14} ,ATQ 377,1 910 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴白细胞总数(WBC)明显降低,ATQ 849 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组恒河猴白细胞总数(WBC)明显升高,其余组别恒河猴白细胞总数(WBC)无明显变化;各剂量组恒河猴红细胞总数(RBC),血红蛋白(HGB),白细胞总数(WBC),红细胞容积(HCT),平均红细胞容积(MCV),平均红细胞血红蛋白(MCH),平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC),血小板总数(PLT),网织红细胞计数(Ret)均明显变化。见表 3。

表 2 ATQ 对恒河猴摄食状况的影响

Table 2 Effects of ATQ on feeding status of rhesus monkeys

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	给药前				D ₀			
			第 1 次		第 2 次		第 1 次		第 2 次	
			摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况
ATQ	168	雄性	84.3	好	92.6	好	72.1	好	92.9	好
	377	雌性	86.0	好	94.5	好	92.9	好	80.0	好
	849	雄性	93.9	好	81.2	好	93.3	好	79.3	好
	1 910	雌性	75.8	好	77.7	好	46.8	中	72.6	好
	4 296	雄性	72.7	好	92.1	好	41.1	中	42.0	中
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	D ₆				D ₁₂			
			第 1 次		第 2 次		第 1 次		第 2 次	
			摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况	摄食量 /g	摄食状况
ATQ	168	雄性	94.8	好	94.4	好	98.5	好	96.2	好
	377	雌性	80.1	好	95.2	好	96.8	好	95.9	好
	849	雄性	91.4	好	94.5	好	93.6	好	98.7	好
	1 910	雌性	95.6	好	71.7	好	96.3	好	96.4	好

注:摄食状况进行评估,分为 3 级:好(摄食量 > 70 g),中(摄食量 35 ~ 70 g),差(摄食量 < 35 g)。

表 3 ATQ 对恒河猴血液学的影响

Table 3 Effects of ATQ on hematology of rhesus monkeys

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	时间	WBC × 10 ⁹ /L	RBC × 10 ¹² /L	HGB /g·dL ⁻¹	HCT /%	MCV /fL	MCH /Pg	MCHC /g·dL ⁻¹	PLT × 10 ⁹ /L	Ret /%
ATQ	168	雄性	D ₀	7.43	6.57	15.3	48.6	74.0	23.3	31.4	423	1.0
			D ₁₄	7.38	6.33	14.6	48.6	76.8	23.1	30.1	398	0.7
377	雌性	D ₀	14.40	5.10	12.1	37.0	72.5	23.7	32.6	241	1.3	
		D ₁₄	8.94	5.10	12.2	38.3	75.0	23.9	31.8	242	1.5	
849	雄性	D ₀	5.76	5.52	13.2	41.4	74.9	23.9	31.9	247	1.7	
		D ₁₄	8.19	5.45	13.3	42.0	77.0	24.4	31.6	229	1.6	
1 910	雌性	D ₀	17.69	5.72	14.2	45.5	79.6	24.8	31.2	351	1.4	
		D ₁₄	11.94	5.64	13.7	44.4	78.6	24.2	30.8	375	1.1	
4 296	雄性	D ₀	10.39	6.10	14.4	46.4	76.2	23.6	31.0	291	1.1	
		D ₁₄	11.03	5.62	13.3	43.0	76.5	23.7	31.0	270	1.0	

3.5 对恒河猴血液生化学的影响 与给药前比较,在给药 D₁₄, ATQ 168 mg·kg⁻¹ 组恒河猴 ALT, GLU 明显升高, ALP 明显降低;各剂量组恒河猴 UREA (除 4 296 mg·kg⁻¹ 组), TBIL 明显降低,无生物学意义,其余指标均未见明显变化。见表 4。

3.6 病理学检查 观察期结束,对所有实验恒河猴进行大体解剖及肉眼观察,其体表完整、被毛柔顺,无外伤及破溃等;皮下无出血点及色素沉着等;腹腔胸腔无积水、脏器位置正常;各组织器官的体积、颜色及质地等均未发现明显病变及异常。

4 讨论

近似致死剂量法 (ALD) 主要用于非啮齿类动物的急性毒性实验,可以用数目较少的动物获得较

充分信息^[10]。一般选用 6 只健康 Beagle 犬或猴,根据小动物的毒性实验结果、受试物的化学结构和其他相关资料,估计可能引起毒性和死亡的剂量范围,通常采用 50% 等量递增法设定数个剂量序列。

本实验采用近似致死量法研究 ATQ 对恒河猴经口给药的急性毒性,结果显示,给药后动物未出现死亡;1 910, 4 296 mg·kg⁻¹ 组恒河猴出现呕吐及摄食减少,分析可能与 ATQ 主要成分哌嗪、青蒿素引起胃部不适有关;4 296 mg·kg⁻¹ 组恒河猴出现体重下降,考虑为恒河猴给药后呕吐及摄食减少导致体重出现了一定的波动。部分恒河猴 WBC, ALT, GLU, ALP 等指标在给药 14 d 出现变化,但无明显的剂量依赖性,考虑无毒理学意义。综上所述,ATQ

表 4 ATQ 对恒河猴血液生化学的影响

Table 4 Effects of ATQ on biochemics of blood in rhesus monkeys

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	时间	ALT /U·L ⁻¹	CRE μmol·L ⁻¹	GLU /mmol·L ⁻¹	UREA /mmol·L ⁻¹	TBIL /μmol·L ⁻¹	ALP /U·L ⁻¹	CHOL /mmol·L ⁻¹	GGT /U·L ⁻¹
ATQ	168	雄性	D ₀	37.90	43.3	2.75	7.10	4.2	392.65	4.57	64.49
			D ₁₄	71.81	47.6	4.74	4.86	2.1	280.18	3.97	51.69
	377	雌性	D ₀	61.98	43.2	2.90	5.35	5.2	546.87	3.37	80.71
			D ₁₄	55.62	42.3	3.53	2.51	1.7	511.99	3.38	79.76
	849	雄性	D ₀	77.33	44.7	3.92	5.00	3.7	343.12	3.12	77.89
			D ₁₄	55.71	44.9	4.27	3.68	2.8	279.88	3.64	83.48
	1 910	雌性	D ₀	33.77	35.6	3.43	4.93	3.8	355.66	4.07	64.55
			D ₁₄	35.07	36.3	3.55	2.17	2.2	314.51	3.90	66.08
	4 296	雄性	D ₀	40.67	58.2	3.98	5.67	5.3	582.81	4.25	58.21
			D ₁₄	43.45	58.2	3.96	5.79	2.8	485.06	4.42	56.07

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	时间	TP /g·L ⁻¹	ALB /g·L ⁻¹	CK /U·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	Na /mmol·L ⁻¹	K /mmol·L ⁻¹	Cl /mmol·L ⁻¹
ATQ	168	雄性	D ₀	80.34	53.12	118.63	0.66	35.7	149.2	3.72	107.3
			D ₁₄	74.53	48.94	145.04	0.85	51.9	149.9	3.53	107.8
	377	雌性	D ₀	75.33	53.03	141.07	0.63	39.3	149.6	3.47	105.4
			D ₁₄	76.93	51.93	97.10	0.32	40.6	150.1	3.66	105.9
	849	雄性	D ₀	85.18	53.95	76.41	0.62	37.5	151.6	3.45	107.6
			D ₁₄	79.54	50.50	117.13	0.64	39.9	151.2	3.57	107.6
	1 910	雌性	D ₀	85.75	52.66	121.25	0.51	31.2	150.6	3.88	106.9
			D ₁₄	85.77	50.31	118.52	0.60	37.7	149.8	3.82	105.3
	4 296	雄性	D ₀	82.46	55.30	170.61	0.67	46.7	152.1	3.78	108.1
			D ₁₄	78.01	51.59	199.71	0.83	43.3	151.1	3.67	108.9

对恒河猴单次经口给药的近似致死剂量大于 4 296 mg·kg⁻¹ (相当于临床剂量的 257 倍), 其急性毒性主要表现为呕吐、摄食减少等消化系统反应。

[参考文献]

[1] 高岩, 陈颖, 宋健平, 等. 青蒿素、哌啶、青蒿素哌啶片的抗性培育[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(3): 372-374.

[2] 宋健平, 谈博, Duong S, 等. 青蒿素哌啶片治疗无并发症恶性疟的剂量探索实验[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(12): 908-911.

[3] 邓长生, 谈博, Duong Socheat. 青蒿素哌啶片治疗间日疟 62 例临床报道[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(3): 204-206.

[4] 谈博, 宋健平, 李国桥, 等. 口服青蒿素哌啶片在中国健康人体的耐受性[J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(5): 405-407.

[5] 孙靖. 实验动物学基础[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005. 72.

[6] 《化学药物急性毒性实验技术指导原则》课题组. 化学药物急性毒性实验技术指导原则[M]. 2005: 1-15.

[7] 《药物单次给药毒性研究技术指导原则》课题组. 药物单次给药毒性研究技术指导原则[M]. 2014: 1-12.

[8] Diehl K H, Hull R, Morton D, Pfister R, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes [J]. J Appl Toxicol, 2001, 21(1): 15-23.

[9] 徐勤, 李晓波, 宋健平, 等. 青蒿素哌啶片对昆明种小鼠灌胃给药的急性毒性实验[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(6): 667-669.

[10] 刘爱杰, 张文胜, 马汉祥, 等. Beagle 犬静脉注射乳化异氟醚的急性毒性[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 30(7): 772-773.

[责任编辑 周冰冰]