

青蒿素哌喹片对昆明种小鼠灌胃给药的急性毒性试验

徐 勤¹, 李晓波², 刘 婵², 袁 征², 宋健平¹, 关业枝², 王 琪¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技产业园, 广东 广州 510445)

摘要: **目的** 研究青蒿素哌喹片(ATQ)对昆明种小鼠灌胃给药的急性毒性。**方法** 按 Bliss 法设计试验, 对小鼠单次灌胃 ATQ, 测定 ATQ 对小鼠半数致死量(LD₅₀)和 LD₅₀ 的 95 %可信限, 观察 14 d 内小鼠的毒性反应和死亡情况, 对小鼠进行大体解剖, 肉眼观察并进行组织病理学检查。**结果** ATQ 单次灌胃给药可使小鼠出现不同程度的毒性反应, 包括自发活动减少、闭眼、俯卧、运动失调、震颤、惊跳、强制性-阵挛性抽搐、角弓反张。小鼠 LD₅₀ 为 2802.38 mg·kg⁻¹, LD₅₀ 的 95 %可信限为 2343.51 ~ 3520.11 mg·kg⁻¹, 死亡小鼠肉眼观察未发现各脏器异常。**结论** ATQ 对小鼠单次灌胃给药具有一定的毒性, 涉及的毒性靶器官可能是中枢神经系统。

关键词: 青蒿素哌喹; 急性毒性; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0667-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.005

Acute Toxicity Test of Oral Administration of Artequick in KM mice

XU Qin¹, LI Xiaobo², LIU Chan², YUAN Zheng², SONG Jianping¹, GUAN Yezhi², WANG Qi² (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. New South Center of Drug Safety Evaluation, Science & Technology Industrial Park, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the acute toxicity of artequick after oral administration in mice. **Methods** By using the Bliss method, the LD₅₀ and its 95 % confidence of artequick in mice were determined after single oral administration for evaluation of the toxicity within 14 days. The gross anatomy and histopathological examination for the dead mice were also carried out. **Results** After single oral administration, the mice showed various degrees of toxic reaction, showing as less spontaneous activities, closing eyes, face lying, incoordination, tremor, terror, forced paroxysmal spasm, and opisthotonus. The LD₅₀ of artequick in mice was 2802.38 mg·kg⁻¹ and its 95 % confidence was 2343.51 ~ 3520.11 mg·kg⁻¹. No abnormal alteration was shown in the organs of all the postmortem mice after the gross anatomy. **Conclusion** Single oral administration of Artequick has some toxic effects in mice, and the target of toxic organs may be involved the central nervous system.

Keywords: Artequick; Acute toxicity; Mice

青蒿素(ART)是从菊科植物中药黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中提取出来的倍半萜内酯, 是继氯喹后在抗疟药中又一新的突破, 其杀灭原虫速度快, 与氯喹无交叉抗药性^[1], 但半衰期短, 杀虫不彻底, 原虫易复发; 哌喹(PQ)为 4-氨基喹啉抗疟化合物, 半衰期长, 杀虫彻底, 但与氯喹有交叉抗药性^[2]。青蒿素哌喹片(Artequick, ATQ)是从双氢青蒿素哌喹

片改进而来, 由 ART 和 PQ 组成, 是一种新的固定剂量的青蒿素复方制剂, 用于治疗无并发症的耐药性恶性疟疾, 研究^[3-4]证明青蒿素与哌喹对疟疾的治疗有协同增效作用, 具有速效、高效、短疗程、服用方便、副反应少等优点。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

收稿日期: 2014-04-29

作者简介: 徐勤, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物安全性评价及毒性病理。Email: xuqin@163.com。通讯作者: 宋健平, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治热带病。Email: songjipgz@sina.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B010500008); 广东省产业技术与研究开发入库项目(2012B010300003)。

症状^[9]。本研究通过 ATQ 对昆明种小鼠单次灌胃给药, 观察动物所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 材料与方法

1.1 动物 昆明种小鼠, 4~5 周龄, SPF 级, 雌雄各半, 体质量(22 ± 2)g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药品 ATQ, 含青蒿素 60.4 mg、哌嗪 367.1 mg, 广东新南方青蒿科技有限公司, 批号: 20110303。

1.3 供试品的配制 取适量 ATQ 于研钵中仔细研磨, 以纯净水配成系列浓度的 ATQ 溶液(150, 115.5, 88.9, 68.5, 52.7, 40.6, 31.3, 23.3 mg·mL⁻¹)。

1.4 预试验 参照《化学药物急性毒性试验技术指导原则》^[6], 小鼠 24 只, 按预编号及体质量分层随机分为 6 组, 每组 4 只, 雌雄各半, 分别用 ATQ 4500, 3700, 2800, 2000, 1000, 700 mg·kg⁻¹ 灌胃给药, 给药体积为 30 mL·kg⁻¹。药后连续观察 3 d。结果 4500 mg·kg⁻¹ 剂量组 4 只小鼠全部死亡, 死亡率为 100 %的最小剂量(Dm)为 4500 mg·kg⁻¹; 700 mg·kg⁻¹ 剂量组 4 只小鼠全部存活, 死亡率为 0 的最大剂量(Dn) 为 700 mg·kg⁻¹。所以, 确定 4500 mg·kg⁻¹ 剂量为试验的最高剂量, 700 mg·kg⁻¹ 剂量为试验最低剂量。

1.5 正式试验 参照《化学药物急性毒性试验技术指导原则》^[6], 根据最高剂量及最低剂量的公比系数($q=0.77$)设计中间剂量, 剂量分别为 4500.0, 3465.0, 2668.1, 2054.4, 1581.9, 1218.1, 937.9, 700.0 mg·kg⁻¹, 分别为 ATQ8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 组, 另设溶媒对照组。将小鼠按性别及体质量分层随机分为 9 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 按上述剂量灌胃给药, 给药体积为 30 mL·kg⁻¹。立即观察并记录给药后 6 h 内小鼠毒性反应和死亡情况, 然后每天观察 1 次小鼠, 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。在药后第 1, 4, 7, 14 天分别称量存活小鼠体质量。统计各组小鼠死亡数, 用 SPSS 软件(Bliss 法)计算半数致死量(LD₅₀)和 LD₅₀ 的 95 %可信限^[7]。在药后第 14 天对所有的实验小鼠进行大体解剖, 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。

1.6 统计学处理方法 结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表

示, 采用 SPSS17.0 统计软件, 组间比较用单因素方差分析方法, 检验水准为 $\alpha=0.5$ 。

2 结果

2.1 一般观察 小鼠毒性症状随 ATQ 剂量增加而逐渐加重, 700.0 mg·kg⁻¹ 剂量组仅见 2 只雌性小鼠眼睑闭合, 自发活动减少; 4500.0 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠可见震颤、强制性 - 阵挛性抽搐、角弓反张、死亡等症状。且随着剂量的增加, 症状持续时间逐渐延长, 700.0 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠药后 24 h 即恢复至正常状态, 4500.0 mg·kg⁻¹ 剂量组药后 144 h 存活小鼠才恢复至正常状态, 表明随着 ATQ 剂量的增加, 小鼠的毒性反应加剧且持续时间延长。大部分存活动物出现症状后可逐渐缓解。溶媒对照组小鼠未见异常。

2.2 动物死亡情况 给药后, 700.0, 937.9 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠未出现死亡; 1218.1, 1581.9, 2054.4 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠 6 h 内各死亡 1 只; 2668.1 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠 6 h 内死亡 6 只; 3465.0 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠 6 h 内死亡 4 只, 6~24 h 内死亡 1 只, 第 4 天死亡 1 只; 4500.0 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠在给药后 6 h 内死亡 2 只, 给药后 6~24 h 内死亡 2 只, 第 2 天死亡 1 只, 第 6 天死亡 3 只; 溶媒对照组小鼠未出现死亡。

2.3 体质量变化 试验期间, 各组动物的体质量增长变化趋势相似, 但给药组的体质量低于溶媒对照组, 表明 ATQ 可抑制小鼠体质量的增长, 剂量越高对小鼠体质量的抑制作用越明显, 且体质量恢复增长的时间越长。各剂量组雄性小鼠体质量在药后第 1 天、第 4 天均明显低于溶媒对照组($P<0.01$); 4500.0, 3465.0, 2668.1, 2054.4, 1581.9 mg·kg⁻¹ 剂量组雄性小鼠体质量在药后第 7 天及第 14 天均明显低于溶媒对照组($P<0.01$, $P<0.05$); 700.0, 1581.9 mg·kg⁻¹ 剂量组雌性小鼠体质量在药后第 1 天明显低于溶媒对照组($P<0.01$, $P<0.05$), 见表 1。

2.4 病理学检查 对肉眼观察发生异常改变脏器进行组织病理学检查。700.0 mg·kg⁻¹ 剂量组 1 只小鼠大体解剖检查可见膀胱内有约龙眼核大小的白色沉积物, 膀胱底部尿道内口附近见少量乳白色沉积物。组织病理学检查显示, 膀胱黏膜移行上皮未见坏死、黏膜未见溃疡, 膀胱腔内可见少量嗜酸性蛋白质样物质沉积。2668.1 mg·kg⁻¹ 剂量组 2 只小鼠大体解剖检查可见肺脏轻度肿胀, 呈暗红色。组织病理学检查显示, 肺泡管及肺泡结构清晰, 肺泡壁毛细血管轻度扩张充血, 肺泡壁及肺泡腔内未见炎性细胞浸润。

表 1 ATQ 对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, g, $n=0 \sim 5$)

Table 1 Effect of ATQ on the weight of mice

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	性别	给药前	给药后天数/d			
				1	4	7	14
溶媒对照组		雌	20.84 ± 1.28	22.98 ± 1.46	25.82 ± 2.66	27.48 ± 2.93	29.92 ± 2.57
		雄	23.71 ± 0.78	26.33 ± 1.12	31.84 ± 1.73	34.33 ± 2.69	39.56 ± 3.24
ATQ1 组	700.0	雌	20.75 ± 1.00	18.73 ± 0.74**	23.26 ± 1.26	25.70 ± 0.66	28.50 ± 0.63
		雄	23.63 ± 0.97	23.94 ± 1.13**	28.16 ± 2.28**	32.23 ± 2.62	38.33 ± 3.40
ATQ2 组	937.9	雌	20.75 ± 1.02	20.97 ± 0.91	24.31 ± 1.29	26.51 ± 1.49	28.96 ± 1.93
		雄	23.57 ± 0.94	24.09 ± 1.45**	28.27 ± 1.12**	31.69 ± 1.67	37.05 ± 2.18
ATQ3 组	1218.1	雌	20.81 ± 0.88	20.05 ± 1.86	23.76 ± 2.29	26.20 ± 3.38	29.23 ± 3.12
		雄	23.73 ± 0.78	22.89 ± 1.22**	28.73 ± 1.75**	32.77 ± 2.15	38.67 ± 3.04
ATQ4 组	1581.9	雌	20.67 ± 1.03	18.75 ± 1.25*	20.85 ± 3.33	24.68 ± 3.48	29.46 ± 3.71
		雄	23.55 ± 0.90	22.91 ± 2.94**	26.17 ± 3.92**	28.81 ± 3.74**	34.54 ± 3.02**
ATQ5 组	2054.4	雌	20.93 ± 0.98	20.68 ± 1.76	22.68 ± 3.87	25.34 ± 2.93	29.24 ± 2.85
		雄	23.81 ± 0.76	20.91 ± 1.76**	23.75 ± 1.50**	28.05 ± 1.69**	35.86 ± 1.75*
ATQ6 组	2668.1	雌	20.76 ± 1.07	—	—	—	—
		雄	23.53 ± 0.84	21.20 ± 2.36**	23.22 ± 1.25**	27.17 ± 1.78**	34.15 ± 2.24**
ATQ7 组	3465.0	雌	20.84 ± 1.02	—	—	—	/
		雄	23.56 ± 0.87	22.15 ± 0.76**	21.58 ± 1.46**	24.24 ± 1.45**	32.08 ± 1.22**
ATQ8 组	4500.0	雌	20.82 ± 1.01	19.15 ± 2.09	17.40 ± 0.43	—	—
		雄	23.75 ± 0.71	22.02 ± 1.64**	22.65 ± 1.17**	26.00 ± 1.50**	33.26 ± 1.51**

注：与同性别溶媒对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；“—”为该组雌性或雄性小鼠全部死亡。

4500.0 mg·kg⁻¹ 剂量组 1 只小鼠大体解剖检查可见肝脏轻度肿胀，呈土黄色。组织病理学检查显示，肝小叶结构基本清晰，部分肝小叶中央静脉周围肝细胞轻度肿胀、肥大，胞浆淡染；另 1 只小鼠大体解剖检查可见空肠壁浆膜面有约粟粒大灰白色结节。组织病理学检查显示，空肠黏膜上皮未见变性、坏死、溃疡及出血，黏膜层可见 1 个淋巴小结，为正常形态。

以上结果均考虑为小鼠的自发性病变，不属于药物的毒性反应。其余在给药观察期死亡及观察期结束时处死的动物，大体解剖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、胸腔无积液，脏器位置正常；各组织器官的体积、颜色及质地等均无明显病变及异常。

2.5 LD₅₀ 计算 将试验所得数据用 Bliss 法 (SPSS 17.0 软件) 计算，ATQ 的小鼠 LD₅ 为 1264.96 mg·kg⁻¹，LD₅₀ 为 2802.38 mg·kg⁻¹，LD₉₅ 为 6208.38 mg·kg⁻¹，LD₅₀ 的 95 % 可信限为 2343.51 ~ 3520.11 mg·kg⁻¹。

3 讨论

急性毒性试验是在 1 d 内单次或多次 (2 ~ 3 次)

对动物给药后，在 7 d 内，连续观察动物所产生的毒性反应及死亡情况。急性毒性试验中如受试药物引起动物死亡，应测定药物毒性反应与剂量的关系，通常进行 LD₅₀ 测定^[6]。预试验中，ATQ 对小鼠的 Dn 和 Dm 分别为 700 mg·kg⁻¹ 和 4500 mg·kg⁻¹。正式试验时，700.0，937.9 mg·kg⁻¹ 剂量组死亡率为 0，动物表现为自发活动减少。其余剂量组给药后均出现自发活动减少、闭眼、俯卧、运动失调、震颤、惊跳、强制性 - 阵挛性抽搐、角弓反张等症状。由小鼠出现的各种症状推测 ATQ 毒性反应可能涉及的系统为神经系统。

LD₅₀ 作为对一个药物毒性大小的粗略估计，是一个非常有意义的指标，并且 LD₅₀ 与药物毒性呈反比关系^[8]。本实验按 Bliss 法设计，测定 ATQ 的 LD₅₀ 为 2802.38 mg·kg⁻¹，其 95% 可信限为 2343.51 ~ 3520.11 mg·kg⁻¹。存活动物大部分出现症状后逐渐缓解，阴性对照组小鼠未见异常。ATQ 在药后 1~14 d 对小鼠体质量有一定的抑制作用，其中雄性小鼠比较明显，剂量越高对小鼠体质量的抑制作用越明显，且体质量恢复增长的时间越长。对死亡小鼠进行大体解剖及肉眼观察，除 700.0，2668.1，4500.0 mg·kg⁻¹ 剂量组个别小鼠有自发性病变外，其余小鼠各组织器官的体积、颜色、质地无异常。

参考文献：

- [1] Lee S. Artemisinin promising lead natural product for various drug developments[J]. Mini Rev Med Chem, 2007, 7(4): 411-422.
- [2] Davis TM, Hung TR, Sim IK, et al. Piperazine a resurgent antimalarial drug[J]. Drugs, 2005, 65 (1): 75-87.
- [3] 宋健平, 谈博, Duong Socheat. 青蒿素哌嗪片治疗无并发症恶性疟的剂量探索试验[J]. 中国新药与临床杂志, 2008, 27(12): 908-911.
- [4] 邓长生, 谈博, Duong Socheat. 青蒿素哌嗪片治疗间日疟 62 例临床报道[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(3): 204-206.
- [5] 谈博, 宋健平, 何一卿, 等. 口服青蒿素哌嗪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.
- [6] 《化学药物急性毒性试验技术指导原则》课题组. 化学药物急性毒性试验技术指导原则[M]. 2005: 1-15.
- [7] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD₅₀[J]. 药学进展, 2003, 27 (5): 314-316.
- [8] Dewitt CR, Cleveland N, Dart RC, et al. The effect of amiodarone pretreatment on survival of mice with cocaine toxicity[J]. J Med Toxicol, 2005, 1(1): 11-18.

(编辑：梁进权)