

DOI 10.19656/j.cnki.1002-2406.20230706

灯盏花素对正常和眼底病变模型大鼠影响的比较研究

谭莹^{1,2}, 廖文平^{1,2}, 高启龙³, 李勇^{1,2}, 史新辉^{1,2}, 王京昆^{1,2}, 苏敏^{1,2}✉

(1. 云南省药物研究所, 云南 昆明 650111; 2. 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111; 3. 昆明市中医医院, 云南 昆明 650031)

【摘要】目的:通过比较灯盏花素对正常和眼底病变大鼠的影响,探索以模型动物评价中药安全性的可行性及注意事项。方法:将160只SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、灯盏花素(正常动物)2.0 g/kg组(简称正常-高组)、灯盏花素(模型动物)0.8 g/kg(简称模型-低组)、灯盏花素(模型动物)2.0 g/kg组(简称模型-高组),每组32只,雌雄各半。各组的给药容积均为15 mL/kg,1次/d,连续给予灭菌动物饮用水和浓度为0.05、0.13 g/mL的灯盏花素混悬液9 d后,模型组和模型-低、高组以0.06 g/kg剂量腹腔注射碘酸钠(NaIO_3)溶液1次造模,空白对照组、正常-高组同法注射氯化钠注射液。造模次日各组继续给药,实际给药天数分别为11、15、29、36 d,停药后继续观察至造模后第41、62天。试验期间每天观察动物一般体征、每周称量体质量,于造模后第3、7、21、28、41、62天随机抽取大鼠腹主动脉采血进行血清生化指标检测,主要脏器称重和组织病理学检查。结果:灯盏花素对大鼠体质量和正常大鼠一般体征均没有影响,但可减少因注射 NaIO_3 引起稀便的大鼠数量;正常-高组大鼠血清生化指标无毒理学意义的轻微波动,但模型-低组和模型-高组大鼠造模初期血清生化指标升高。连续给药11 d可使模型-高组雌鼠肾上腺重量和正常-高组雄鼠胸腺重量增大,给药15 d可使正常雌鼠肾上腺重量减轻,上述指标组间比较均具有显著性差异($P < 0.05$)。灯盏花素两个剂量对正常大鼠脏器组织形态均没有影响,但可明显减轻模型大鼠的视网膜病变。结论:灯盏花素模型大鼠重复给药的无毒性反应剂量(NOEL)低于正常动物,以模型动物开展临床前安全性评价存在降低受试物安全剂量范围的可能性,在模型动物的选择方面应排除造模药物的影响,包括考虑造模药物和评价药物之间的相互作用和模型背景数据的建立等。

【关键词】灯盏花素;眼底病变;比较研究;无毒性反应剂量

【引用格式】

谭莹,廖文平,高启龙,等.灯盏花素对正常和眼底病变模型大鼠影响的比较研究[J].中医药信息,2023,40(7):36-46.

TAN Y, LIAO W P, GAO Q L, et al. Comparative study of breviscapine on normal fundus and fundus lesion in rats[J]. Information on TCM, 2023, 40(7):36-46.

灯盏花又名灯盏细辛,系菊科飞蓬属植物短葶飞蓬[*Evigeron obreviscapus* (Vant.) Hand. Mazz.]的全草,首载于《滇南本草》,主要分布于我国西南部地区。灯盏花素为灯盏花中的黄酮类成分,具有改善微循环、抗

血栓,提高肝脏抗氧化能力等作用,已被开发成多种制剂广泛使用^[1-3]。药代和药效学研究发现,灯盏花素口服的效果虽不及静脉注射,但仍能发挥良好的治疗作用^[4],且针对需要长期用药的疾病,如眼底病变、糖尿

基金项目:云南省重大科技专项项目(2017ZF002-08)

第一作者简介:谭莹(1979-),女,正高级工程师,主要研究方向:新药研发和药物安全性评价。

✉通信作者简介:苏敏(1965-),女,正高级工程师,主要研究方向:新药研发和药物安全性评价。

病肾病、慢性肾衰竭、肝损伤等,口服给药的顺应性更加符合临床用药的需求。本研究以灯盏花素预防和治理眼底病变为切入点,在获得适宜的药效学剂量(300 mg/kg)和重复给药28 d无毒性反应剂量(NOEL)(2.0 g/kg及以下)的基础上,以正常和眼底病变模型大鼠为实验系统,通过综合比较大剂量重复给药后两种动物的毒性反应情况,探索将适应证动物模型用于中药临床前安全性评价需要关注的问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2016-0006],6.5~7.5周龄,体质量145.0~177.9 g(雌)、182.3~212.2 g(雄)。动物饲养于云南省药物研究所药物安全性评价中心(GLP中心)动物实验室一区屏障环境实验室,温度23.5~24.6℃,湿度46%~64%,昼夜各半循环照明,动物使用许可证:SYXK(滇)K2017-0004,实验动物环境及设施检测报告编号:YNXR-C-2019-163。试验期间,动物自由摄食、饮水,动物饲料、垫料、饮用水和实验室环境技术指标均符合国家规范和要求;试验所用动物数量、饲养管理方式、操作方法和动物牺牲方式等均通过云南省药物研究所实验动物福利伦理委员会(IACUC)审查合格,审查表编号:动(伦)IACUC-2020-011-01。

1.2 受试药物与给药制剂制备

灯盏花素,批号HB20190601,含野黄芩苷93.7%,由云南植物药业有限公司生产。据《云南白药集团创新研发中心检验报告》显示,该批次药物各项检测结果均符合规定。给药制剂在给药当天使用灭菌后的配制器具在净化工作台以灭菌动物饮用水为溶媒常温配制后传入屏障环境实验室使用。

1.3 主要试剂与仪器

碘酸钠(NaIO_3 , SIGMA-ALDRICH,批号:MKCG64

91);氯化钠注射液(浙江国镜药业有限公司,批号:A19091901B);丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、甘油三酯、总胆固醇、总胆红素、乳酸脱氢酶、肌酐、肌酸激酶、尿素氮、 γ -谷氨酰转移酶检测试剂(Beckman Coulter)、肌酸激酶同工酶测定试剂盒均来自SENTINEL CH. SpA;Unicel DxC600全自动生化分析仪、ASP200脱水机、EG1160包埋机、RM2255切片机、HI1210摊片机、ST5020染色机、CV5030盖片机、DM6000B显微镜均来自德国Leica公司;CX21FSI显微镜(日本奥林巴斯株式会社);江丰KF-PRO-005数字病理切片扫描仪(宁波江丰生物信息技术有限公司),JJ2000型电子天平[美国双杰兄弟(集团)有限公司常熟市双杰测试仪器厂];AB104电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];VD-650型桌上式(垂直)净化工作台(苏州博莱尔净化设备有限公司)。

1.4 动物分组、模型制备及给药剂量、方法

1.4.1 分组

适应性饲养后,选择一般状况良好的健康成年SD大鼠160只,称重后用Excel进行随机区组设计法随机分为空白对照组、模型组、灯盏花素(正常动物)2.0 g/kg组(简称正常-高组)、灯盏花素(模型动物)0.8 g/kg组(简称模型-低组)、灯盏花素(模型动物)2.0 g/kg组(简称模型-高组),每组32只,雌雄各半。

1.4.2 模型制备及给药剂量、方法

于给药第9天后造模,动物称重后按10 mL/kg的给药容积腹腔注射用0.9%氯化钠注射液配制的浓度为6 mg/mL的碘酸钠溶液1次,空白对照组和正常-高组同法注射0.9%氯化钠注射液。造模用制剂于净化工作台常温配制。给药方式为“预防”(造模前给药9 d)+“治疗”(造模后继续给药)。给药剂量据本项目前期药效学和毒理学研究确定。给药剂量和给药周期见表1。

表1 剂量设置和给药周期

组别	给药容积/(mL/kg)	给药浓度/(g/mL)	给药剂量/(g/kg)	药效学剂量倍数	解剖时间点及给药周期
空白对照组	15	—	—	—	—
模型组	15	—	—	—	造模后第3天:[共给药(9+2)d]
正常-高组	15	0.13	2.0	7	造模后第7天:[共给药(9+6)d]
模型-高组	15	0.13	2.0	7	造模后第21天:[共给药(9+20)d]
模型-低组	15	0.05	0.8	3	造模后第28天:[共给药(9+27)d]

注:药效学模型动物制备方法与本试验一致。

1.5 评价指标

1.5.1 一般体征、体质量

每天观察动物一般体征;造模后第1~28天每周

称重2次,停药后每周称重1次。

1.5.2 血清生化学指标

分别于造模后第3、7、21、28、41、62天随机抽取大

鼠(造模后第28天动物数为12只,其余均为4只,雌雄各半),麻醉后腹主动脉采血检测血清生化学指标。包括:天门冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆红素(TBIL)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG);尿素氮(BUN)、肌酐(CREA);肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)。

1.5.3 系统解剖和脏器重量、系数

采血结束的动物进行系统解剖,观察各器官有无异常,摘取主要脏器并称取脑、胸腺、心脏、肝脏、脾脏、肾脏和肾上腺重量,根据动物禁食后体质量计算脏器系数。

$$\text{脏器系数}(\%) = \frac{\text{脏器湿重}(g)}{\text{体质量}(g)} \times 100\%$$

1.5.4 组织病理学检查

摘取主要脏器后,眼和哈氏腺使用改良Davidson's固定,其余置于10%中性缓冲福尔马林液中固定,切片、HE染色。以病变发生率和病变评分为主要指标,评价动物视网膜病变情况。病变评分用半定量分级法,病变1:视网膜呈波浪状改变,没有改变(阴性)计0分,轻微改变计1分,轻度改变计2分,中度改变计3分,重度改变计4分。病变2:视网膜呈异常心电

图样改变、各层排列紊乱,外核层局灶性变薄,该病变等级分数均乘以2。其他可见病变仅进行描述不评分。各组总分除以动物总例数,得出平均分为该组的最终评分。

$$\text{病变发生率}(\%) = \frac{\text{发生病变动物数}}{\text{该组剖检动物数}} \times 100\%$$

1.6 统计学方法

使用IBM SPSS 24进行给药期间体质量和造模后第28天血清生化学指标(单因素方差分析或Kruskal-Wallis H检验,雌、雄分开比较),组织病理学病变发生率(χ^2 检验)和病变程度评分(单因素方差分析)的组间比较;造模后第3、7、21、41、62天因样本量少仅用t-TEST进行初步比较后再根据个体数据分析指标变化趋势。统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05/0.01$ 。

2 结果

2.1 一般体征

除造模当天模型组28只,模型-低组19只,模型-高组20只动物于注射NaIO₃后陆续出现稀便并于注射次日恢复正常,试验期间各组动物均未见异常。各组动物体征见表2。

表2 各组动物造模后症状汇总表

组别	症状		出现动物数/n		发生率/%		出现时间/min	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
空白对照组	—	—	0	0	0	0	—	—
模型组	稀便	稀便	12	16	75	100	19~94	16~622
正常-高组	—	—	0	0	0	0	—	—
模型-高组	稀便	稀便	12	8	75	50	43~231	40~231
模型-低组	稀便	稀便	9	10	56	63	38~259	33~65

注:“—”表示未观察到异常体征。

2.2 体质量

各组体质量呈现持续增长趋势,雌鼠组间比较没有显著性差异($P > 0.05$);模型组、模型-高组雄鼠造模后第1天(连续给药10d)、造模后第7天(连续给药15d)体质量均低于空白对照组和正常-高组,组间比较有显著性/非常显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。雄鼠体质量统计结果见表3。

表3 各组雄鼠体质量统计结果($\bar{x} \pm s, g$)

组别	给药10d(n=16)	给药14d(n=14)
空白对照组	291.87 ± 11.62	320.21 ± 15.73
模型组	280.34 ± 18.21 ^{▲▲}	309.15 ± 22.47 ^{▲▲}
正常-高组	297.68 ± 17.66	331.46 ± 21.23
模型-高组	276.65 ± 14.15 ^{**▲▲}	313.21 ± 14.31 [▲]
模型-低组	283.74 ± 18.62 [▲]	318.55 ± 19.78

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常-高组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$ 。

2.3 血清生化学指标

造模后第3天(连续给药11d),正常-高组雌鼠LDH、雄鼠TG和模型-高组雄鼠CK、CK-MB、LDH均高于模型组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组、正常-高组雌鼠AST均高于模型-低组,正常-高组雌鼠CHOL和模型-高组雌鼠CREA均低于模型-低组,与模型-低组比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第7天(连续给药15d),正常-高组、模型-低组雌鼠TBIL均高于空白对照组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05$)。模型-低组雌鼠CREA高于空白对照组,正常-高组、模型-低组雄鼠CREA均低于空白对照组,与空白对照组比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第21天(连续给药29d),模型-高组雌鼠AST高于空白对照组,模型-高组雄鼠CREA分别高于模型组,组间比较均具有统计学意义

($P < 0.05$)。造模后第28天(连续给药36 d),模型雄鼠BUN高于空白对照,模型-高组雌鼠BUN低于空白对照,模型-高组雄鼠的BUN低于模型组,组间比较均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。造模后第41天(停药14 d),所有指标组间比较均没有统计学意义($P >$

0.05)。造模后第62天(停药35 d),模型-高组雌鼠CK、CK-MB低于模型组,模型-低组雌鼠CHOL高于模型组,模型-低组雄鼠BUN低于模型组,与模型组比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。各组生化指标统计结果详见表4~9。

表4 各组造模后第3天(连续给药11 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	5.050 ± 5.020	106.50 ± 4.95 [#]	43.50 ± 3.54	5.000 ± 2.828	0.675 ± 0.417
	♂	5.750 ± 3.041	112.50 ± 30.41	41.00 ± 8.49	1.500 ± 2.121	0.840 ± 0.028
模型组	♀	4.750 ± 2.192	105.00 ± 7.07	35.00 ± 2.83	3.000 ± 1.414	1.325 ± 0.163
	♂	5.450 ± 1.202	98.00 ± 8.49	36.50 ± 2.12	1.000 ± 1.414	1.175 ± 0.134
正常-高组	♀	3.900 ± 4.243	117.50 ± 4.95 [#]	31.00 ± 4.24	2.500 ± 2.121	0.720 ± 0.000 [#]
	♂	6.100 ± 3.536	127.50 ± 2.12	63.50 ± 16.26	1.500 ± 0.707	1.025 ± 0.219
模型-高组	♀	6.500 ± 1.556	97.00 ± 16.97	37.50 ± 4.95	2.500 ± 0.707	0.905 ± 0.417
	♂	6.600 ± 2.263	149.50 ± 16.26	44.00 ± 4.24	4.000 ± 2.828	1.280 ± 0.806
模型-低组	♀	3.800 ± 1.838	78.50 ± 4.95	48.00 ± 19.80	2.500 ± 2.121	0.885 ± 0.007
	♂	4.600 ± 1.838	95.00 ± 14.14	39.50 ± 0.71	2.000 ± 1.414	1.235 ± 0.163

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.150 ± 0.057	7.100 ± 0.424	27.60 ± 3.25	766.00 ± 80.61	588.95 ± 7.28	1033.00 ± 117.38
	♂	0.315 ± 0.120	4.400 ± 0.990	19.20 ± 4.10	722.50 ± 381.13	512.95 ± 241.62	1232.50 ± 526.79
模型组	♀	0.230 ± 0.071	6.650 ± 1.485	27.65 ± 6.72	551.50 ± 153.44	454.55 ± 118.16	1367.50 ± 6.36
	♂	0.225 ± 0.035	9.250 ± 1.485	16.90 ± 0.71	452.50 ± 68.59	342.60 ± 10.04	770.00 ± 56.57
正常-高组	♀	0.210 ± 0.057	5.050 ± 1.202	23.05 ± 2.48	779.00 ± 106.07	591.00 ± 0.85	1453.50 ± 10.61 [△]
	♂	0.450 ± 0.028 [△]	4.000 ± 0.849	18.35 ± 4.60	728.50 ± 331.63	512.90 ± 176.92	1207.00 ± 612.35
模型-高组	♀	0.195 ± 0.078	5.600 ± 0.707	23.80 ± 0.42 [#]	764.00 ± 230.52	567.75 ± 108.68	1049.50 ± 443.36
	♂	0.375 ± 0.191	6.400 ± 0.000	21.25 ± 4.60	1444.50 ± 19.09 [△]	1013.15 ± 77.00 [△]	2355.50 ± 188.80 [△]
模型-低组	♀	0.205 ± 0.106	7.750 ± 0.495	28.85 ± 0.64	402.50 ± 166.17	344.30 ± 127.14	631.00 ± 173.95
	♂	0.355 ± 0.148	4.200 ± 1.414	22.50 ± 4.53	512.00 ± 192.33	374.65 ± 121.98 [#]	860.50 ± 430.63

注:与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与模型-低组比较,[#] $P < 0.05$ 。

表5 各组造模后第7天(连续给药15 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	2.350 ± 0.495	90.00 ± 8.49	40.50 ± 3.54	1.500 ± 0.707	0.695 ± 0.021
	♂	3.000 ± 4.243	101.50 ± 17.68	44.50 ± 0.71	2.500 ± 0.707	0.870 ± 0.071
模型组	♀	4.550 ± 1.344	108.50 ± 7.78	45.50 ± 3.54	3.500 ± 0.707	0.885 ± 0.163
	♂	3.850 ± 2.333	97.00 ± 4.24	39.50 ± 7.78	1.000 ± 0.000	0.900 ± 0.127
正常-高组	♀	6.600 ± 0.849 [*]	124.00 ± 21.21	39.00 ± 0.00	2.500 ± 0.707	0.810 ± 0.396
	♂	5.000 ± 2.263	100.50 ± 4.95	46.50 ± 4.95	1.000 ± 0.000	0.860 ± 0.099
模型-高组	♀	3.750 ± 1.344	109.50 ± 9.19	43.00 ± 1.41	2.000 ± 0.000	0.825 ± 0.035
	♂	4.250 ± 2.899	103.50 ± 9.19	42.00 ± 9.90	2.000 ± 1.414	0.885 ± 0.035
模型-低组	♀	5.600 ± 0.566 [*]	95.00 ± 21.21	36.00 ± 4.24	1.500 ± 0.707	0.825 ± 0.092
	♂	5.150 ± 1.061	105.50 ± 13.44	45.50 ± 4.95	1.000 ± 0.000	0.925 ± 0.049

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.110 ± 0.057	5.550 ± 0.495	21.45 ± 0.07	378.50 ± 20.51	297.25 ± 41.93	579.50 ± 88.39
	♂	0.280 ± 0.085	4.950 ± 1.485	19.80 ± 0.28	447.50 ± 195.87	329.85 ± 136.83	755.50 ± 424.97
模型组	♀	0.225 ± 0.163	6.100 ± 0.424	26.50 ± 3.25	716.00 ± 356.38	506.65 ± 240.63	1094.00 ± 630.74
	♂	0.610 ± 0.424	4.150 ± 0.071	20.15 ± 3.75	487.00 ± 7.07	364.25 ± 13.65	603.50 ± 125.16
正常-高组	♀	0.180 ± 0.113	5.500 ± 0.283	24.70 ± 0.99	750.00 ± 429.92	547.10 ± 351.57	1174.50 ± 883.18
	♂	0.495 ± 0.304	3.700 ± 0.424	18.00 ± 0.42 [*]	442.00 ± 29.70	338.90 ± 22.34	536.00 ± 151.32
模型-高组	♀	0.210 ± 0.028	6.600 ± 0.283	23.90 ± 0.85	483.50 ± 101.12	358.10 ± 50.06	1006.00 ± 305.47
	♂	0.395 ± 0.021	6.000 ± 2.121	20.70 ± 0.99	492.00 ± 28.28	394.25 ± 48.30	779.00 ± 19.80
模型-低组	♀	0.235 ± 0.134	5.400 ± 0.849	24.70 ± 0.14 ^{**}	551.50 ± 306.18	408.20 ± 220.48	979.00 ± 462.45
	♂	0.425 ± 0.205	3.750 ± 0.495	16.95 ± 0.07 [*]	526.50 ± 160.51	389.00 ± 125.16	720.00 ± 182.43

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;模型-低组、模型组、正常-高组雄鼠GGT的SD = 0,上述组间无法进行t-TEST。

表6 各组造模后第21天(连续给药29 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	1.600 ± 1.414	104.00 ± 0.00	33.50 ± 0.71	0.000 ± 0.000	0.765 ± 0.205
	♂	0.000 ± 0.000	73.50 ± 17.68	35.50 ± 6.36	1.000 ± 0.000	0.815 ± 0.021
模型组	♀	0.000 ± 0.000	106.00 ± 21.21	29.00 ± 7.07	1.000 ± 0.000	0.765 ± 0.148
	♂	1.550 ± 0.495	92.00 ± 5.66	31.50 ± 3.54	1.000 ± 0.000	0.940 ± 0.580
正常-高组	♀	0.200 ± 0.283	106.50 ± 3.54	28.00 ± 7.07	2.000 ± 0.000	0.875 ± 0.134
	♂	3.550 ± 5.020	95.00 ± 9.90	38.00 ± 1.41	1.500 ± 2.121	0.875 ± 0.064
模型-高组	♀	0.350 ± 0.495	115.50 ± 0.71*	39.00 ± 7.07	2.000 ± 0.000	0.660 ± 0.099
	♂	1.350 ± 0.778	90.50 ± 4.95	36.00 ± 4.24	2.000 ± 1.414	0.890 ± 0.099
模型-低组	♀	0.000 ± 0.000	107.00 ± 9.90	35.50 ± 2.12	2.000 ± 1.414	1.000 ± 0.057
	♂	1.400 ± 0.566	83.50 ± 3.54	36.50 ± 2.12	1.000 ± 1.414	0.860 ± 0.014

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.280 ± 0.057	6.600 ± 0.849	35.10 ± 0.14	516.50 ± 77.08	463.55 ± 64.98	1 014.50 ± 164.76
	♂	0.440 ± 0.269	4.850 ± 0.919	23.60 ± 4.10	322.50 ± 219.91	275.60 ± 188.94	369.50 ± 409.41
模型组	♀	0.235 ± 0.035	5.550 ± 0.495	28.55 ± 3.75	801.00 ± 613.77	644.90 ± 458.63	1 252.500 ± 744.58
	♂	0.490 ± 0.127	4.800 ± 0.566	22.15 ± 0.78	507.00 ± 42.43	440.00 ± 43.70	739.00 ± 449.72
正常-高组	♀	0.285 ± 0.007	5.900 ± 0.849	32.50 ± 10.04	444.00 ± 113.14	410.80 ± 87.54	1 111.50 ± 153.44
	♂	0.550 ± 0.240	4.000 ± 0.283	27.60 ± 5.09	412.00 ± 141.42	362.35 ± 129.33	552.00 ± 482.25
模型-高组	♀	0.175 ± 0.177	5.850 ± 0.778	32.85 ± 5.73	814.50 ± 86.97	668.05 ± 87.89	1 371.00 ± 12.73
	♂	0.425 ± 0.346	4.950 ± 0.071	28.10 ± 1.27 [△]	340.50 ± 96.87	303.55 ± 89.31	495.50 ± 389.62
模型-低组	♀	0.210 ± 0.042	6.600 ± 0.424	34.80 ± 5.52	616.00 ± 199.40	503.00 ± 126.57	1 106.00 ± 234.76
	♂	0.475 ± 0.134	4.500 ± 0.990	22.05 ± 4.60	298.00 ± 8.49	262.05 ± 3.04	314.00 ± 128.69

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;空白对照组、模型组和正常-高组、模型-高组雌鼠GGT的SD = 0,上述组间无法进行t-TEST。

表7 各组造模后第28天(连续给药36 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	5.833 ± 3.329	95.33 ± 7.97	32.17 ± 3.76	1.333 ± 0.516	0.585 ± 0.071
	♂	5.850 ± 1.239	97.67 ± 8.48	36.00 ± 5.06	2.500 ± 1.378	0.765 ± 0.171
模型组	♀	6.417 ± 1.808	98.67 ± 12.44	31.50 ± 4.81	1.833 ± 0.753	0.548 ± 0.077
	♂	5.467 ± 1.436	112.83 ± 12.54	40.83 ± 4.67	1.333 ± 1.366	0.800 ± 0.122
正常-高组	♀	5.317 ± 2.053	103.33 ± 14.18	36.50 ± 3.73	1.667 ± 0.816	0.660 ± 0.157
	♂	5.150 ± 2.051	105.17 ± 13.66	39.67 ± 3.27	2.333 ± 0.816	0.727 ± 0.085
模型-高组	♀	5.983 ± 1.393	107.50 ± 17.93	36.00 ± 9.53	1.667 ± 1.033	0.767 ± 0.156
	♂	5.233 ± 2.584	105.50 ± 23.38	38.67 ± 3.72	2.000 ± 0.632	0.807 ± 0.130
模型-低组	♀	5.917 ± 1.514	114.00 ± 37.40	38.33 ± 7.23	1.500 ± 0.548	0.712 ± 0.206
	♂	5.917 ± 1.330	114.17 ± 13.45	35.50 ± 3.94	2.500 ± 0.837	0.718 ± 0.282

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.160 ± 0.059	7.317 ± 1.155	37.47 ± 1.81	505.67 ± 108.04	408.72 ± 89.78	801.33 ± 189.19
	♂	0.330 ± 0.183	5.450 ± 0.513	26.50 ± 2.92	500.00 ± 49.89	415.65 ± 44.57	943.17 ± 310.41
模型组	♀	0.127 ± 0.053	6.883 ± 0.794	35.75 ± 3.86	557.33 ± 100.76	466.65 ± 75.46	997.00 ± 275.69
	♂	0.253 ± 0.104	6.533 ± 0.933*	28.45 ± 2.65	642.00 ± 251.50	500.70 ± 166.28	1 192.67 ± 388.32
正常-高组	♀	0.202 ± 0.118	6.817 ± 0.870	36.20 ± 6.79	406.33 ± 117.81	336.45 ± 96.26	823.33 ± 317.26
	♂	0.338 ± 0.159	5.850 ± 0.771	26.92 ± 4.68	629.67 ± 310.01	485.53 ± 202.79	1 103.50 ± 609.35
模型-高组	♀	0.158 ± 0.028	5.817 ± 1.044*	35.63 ± 3.84	525.67 ± 200.73	413.33 ± 142.01	936.00 ± 406.06
	♂	0.322 ± 0.121	5.133 ± 0.677 ^{△△}	29.07 ± 3.98	657.50 ± 297.33	491.48 ± 186.12	1 009.17 ± 633.33
模型-低组	♀	0.177 ± 0.105	7.733 ± 1.268	35.58 ± 4.12	638.17 ± 376.84	499.27 ± 228.54	1 091.00 ± 455.48
	♂	0.395 ± 0.256	5.767 ± 0.547	29.08 ± 3.54	648.00 ± 217.90	484.18 ± 130.11	1 387.67 ± 339.65

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$;空白对照组、模型组雌鼠GGT的SD = 0,上述组间无法进行t-TEST。

表8 各组造模后第41天(停药14 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	2.850 ± 2.758	106.50 ± 0.71	37.50 ± 16.26	1.500 ± 0.707	0.740 ± 0.240
	♂	4.600 ± 3.536	99.50 ± 12.02	46.00 ± 2.83	1.500 ± 0.707	0.750 ± 0.170
模型组	♀	5.950 ± 3.606	100.50 ± 19.09	37.50 ± 14.85	1.000 ± 1.414	0.845 ± 0.021
	♂	4.900 ± 0.141	95.50 ± 14.85	39.00 ± 9.90	1.500 ± 0.707	0.835 ± 0.064
正常-高组	♀	3.900 ± 4.950	90.00 ± 2.83	34.00 ± 0.000	1.500 ± 0.707	0.775 ± 0.474
	♂	2.800 ± 2.970	87.50 ± 6.36	33.50 ± 3.54	1.500 ± 2.121	0.810 ± 0.113
模型-高组	♀	5.683 ± 1.193	97.50 ± 12.59	41.07 ± 10.31	1.250 ± 0.100	0.800 ± 0.205
	♂	3.450 ± 1.061	98.00 ± 9.90	45.50 ± 3.54	1.000 ± 0.000	0.850 ± 0.085
模型-低组	♀	5.650 ± 1.061	104.50 ± 30.41	43.00 ± 11.31	1.000 ± 0.000	0.750 ± 0.255
	♂	2.900 ± 0.849	88.00 ± 8.49	40.50 ± 9.19	2.000 ± 1.414	1.025 ± 0.247

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.205 ± 0.021	6.100 ± 0.849	37.20 ± 7.35	325.00 ± 63.64	286.70 ± 47.94	640.00 ± 111.72
	♂	0.495 ± 0.318	5.950 ± 0.778	32.25 ± 2.19	414.00 ± 8.49	368.70 ± 0.99	835.00 ± 338.00
模型组	♀	0.550 ± 0.453	6.850 ± 0.495	37.65 ± 5.59	419.00 ± 99.00	383.75 ± 113.35	859.50 ± 303.35
	♂	0.355 ± 0.219	8.100 ± 0.424	32.95 ± 4.60	425.50 ± 45.96	366.95 ± 50.84	877.00 ± 26.87
正常-高组	♀	0.160 ± 0.014	5.950 ± 0.071	36.65 ± 4.74	325.50 ± 12.02	274.40 ± 12.45	540.50 ± 118.09
	♂	0.265 ± 0.064	5.850 ± 1.061	30.90 ± 3.54	364.00 ± 67.88	314.20 ± 84.00	657.00 ± 422.85
模型-高组	♀	0.310 ± 0.123	7.088 ± 0.414	35.75 ± 7.55	344.50 ± 19.02	271.80 ± 18.95	755.50 ± 300.75
	♂	0.370 ± 0.113	6.900 ± 2.687	35.55 ± 1.77	482.50 ± 109.60	411.65 ± 112.64	721.50 ± 324.56
模型-低组	♀	0.305 ± 0.035	8.000 ± 0.566	40.50 ± 5.94	348.50 ± 55.27	260.15 ± 138.81	359.00 ± 190.92
	♂	0.725 ± 0.799	6.500 ± 0.283	32.90 ± 4.81	506.00 ± 186.68	438.00 ± 169.71	913.00 ± 330.93

表9 各组造模后第62天(停药35 d)生化指标统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

指标	性别	TBIL/($\mu\text{mol/L}$)	AST/(IU/L)	ALT/(IU/L)	GGT/(IU/L)	CHOL/(mmol/L)
空白对照组	♀	6.600 ± 0.283	161.00 ± 96.17	61.00 ± 38.18	1.500 ± 0.707	0.900 ± 0.212
	♂	5.200 ± 0.424	88.00 ± 18.39	36.50 ± 0.71	2.000 ± 0.000	1.050 ± 0.000
模型组	♀	6.250 ± 1.626	103.00 ± 24.04	41.00 ± 5.66	1.000 ± 1.414	0.620 ± 0.057
	♂	6.000 ± 2.828	91.50 ± 9.19	41.50 ± 9.19	2.500 ± 0.707	1.025 ± 0.332
正常-高组	♀	5.650 ± 1.202	79.50 ± 12.02	34.00 ± 1.41	1.000 ± 1.414	0.640 ± 0.127
	♂	7.500 ± 2.404	88.00 ± 5.66	32.50 ± 6.36	1.000 ± 0.000	0.945 ± 0.134
模型-高组	♀	8.350 ± 1.768	84.00 ± 12.73	33.00 ± 7.07	1.500 ± 0.707	0.860 ± 0.071
	♂	5.400 ± 0.566	89.50 ± 19.09	34.50 ± 7.78	2.500 ± 0.707	0.720 ± 0.113
模型-低组	♀	8.150 ± 2.758	103.00 ± 7.07	37.00 ± 8.49	1.000 ± 1.414	0.990 ± 0.042 [△]
	♂	4.500 ± 2.121	74.00 ± 15.56	27.50 ± 4.95	1.500 ± 0.707	0.730 ± 0.127

指标	性别	TG/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	CREA/($\mu\text{mol/L}$)	CK/(IU/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(IU/L)
空白对照组	♀	0.255 ± 0.078	7.200 ± 0.566	41.70 ± 4.53	497.00 ± 154.15	411.30 ± 124.17	1052.50 ± 221.32
	♂	0.445 ± 0.134	6.800 ± 0.566	34.20 ± 6.08	453.50 ± 198.70	355.95 ± 154.64	821.50 ± 444.77
模型组	♀	0.340 ± 0.170	7.100 ± 0.424	41.05 ± 0.35	324.00 ± 9.90	271.15 ± 13.22	579.00 ± 130.11
	♂	0.905 ± 0.94	6.800 ± 0.141	34.00 ± 1.70	393.00 ± 134.35	314.00 ± 102.25	630.50 ± 180.31
正常-高组	♀	0.225 ± 0.021	6.700 ± 0.424	38.10 ± 3.68	329.50 ± 38.89	268.80 ± 22.49	703.50 ± 238.29
	♂	0.800 ± 0.552	5.700 ± 0.990	29.80 ± 3.11	384.50 ± 16.26	315.30 ± 0.28	713.50 ± 243.95
模型-高组	♀	0.220 ± 0.071	6.350 ± 2.333	39.55 ± 9.83	244.50 ± 13.44 [△]	200.20 ± 10.89 [△]	445.50 ± 85.56
	♂	0.435 ± 0.304	6.350 ± 1.202	28.95 ± 5.02	403.00 ± 31.11	324.20 ± 23.90	817.00 ± 260.22
模型-低组	♀	0.385 ± 0.049	6.400 ± 0.424	40.85 ± 1.48	705.50 ± 125.16	547.75 ± 60.03	1310.00 ± 46.67
	♂	0.295 ± 0.064	5.650 ± 0.212 [△]	33.10 ± 1.41	245.00 ± 48.08	196.50 ± 35.36	498.50 ± 31.82

注:与模型组比较,[△] $P < 0.05$;空白对照组、模型组雄鼠GGT的SD = 0,上述组间无法进行t-TEST。

2.4 脏器重量、系数

造模后第3天(连续给药11 d),模型-高组雌鼠肾上腺重量和正常-高组雄鼠胸腺重量均大于模型组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05$);模型-高组雌鼠肾上腺重量大于模型-低组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05$)。造模后第7天(连续给药15 d),正

常-高组雌鼠肾重量小于空白对照组,肾系数小于模型组,组间比较均具有统计学意义($P < 0.05$)。模型组雄鼠肾上腺重量、胸腺系数均大于空白对照组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05$)。此后的所有时间点雌、雄鼠所有脏器重量、系数组间比较均没有统计学意义($P > 0.05$)。见表10。

表10 各组不同时间点脏器重量、系数统计结果($\bar{x} \pm s, n = 2$)

组别	造模后第3天(连续给药11 d)					
	肾上腺重量(♀)	肾上腺系数(♀)	胸腺重量(♂)	胸腺系数(♂)	胸腺重量(♂)	胸腺系数(♂)
空白对照组	0.053 5 ± 0.004 5	0.331 ± 0.028	0.585 ± 0.103	2.164 ± 0.498		
模型组	0.050 2 ± 0.000 3	0.282 ± 0.024	0.455 ± 0.056	1.849 ± 0.014		
正常-高组	0.065 5 ± 0.002 8	0.358 ± 0.015	0.702 ± 0.049 [△]	2.661 ± 0.101		
模型-高组	0.075 8 ± 0.001 5 ^{△#}	0.389 ± 0.014	0.663 ± 0.022 [△]	2.632 ± 0.120		
模型-低组	0.047 9 ± 0.004 4	0.285 ± 0.047	0.561 ± 0.045	2.380 ± 0.223		

组别	造模后第7天(连续给药15 d)					
	肾重量(♀)	肾系数(♀)	肾上腺重量(♂)	肾上腺系数(♂)	胸腺重量(♂)	胸腺系数(♂)
空白对照组	1.510 ± 0.025	8.369 ± 0.802	0.046 2 ± 0.001 4	0.167 ± 0.013	0.488 ± 0.008	1.760 ± 0.053
模型组	1.524 ± 0.099	7.837 ± 0.119	0.057 9 ± 0.001 1 [*]	0.203 ± 0.015	0.620 ± 0.075	2.169 ± 0.056 0 [*]
正常-高组	1.307 ± 0.005 [*]	6.955 ± 0.165 [△]	0.051 1 ± 0.006 5	0.169 ± 0.032	0.586 ± 0.127	1.913 ± 0.293
模型-高组	1.460 ± 0.057	7.932 ± 0.788	0.043 8 ± 0.005 5	0.153 ± 0.022	0.603 ± 0.254	2.090 ± 0.843
模型-低组	1.412 ± 0.117	7.889 ± 0.512	0.051 0 ± 0.006 6	0.174 ± 0.015	0.576 ± 0.066	1.972 ± 0.312

注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$;与模型-低组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.5 组织病理学检查

空白对照组和正常-高组动物造模后各时间点系统解剖和组织病理学检查均未见异常;模型组、模型-低组、模型-高组除眼外,其余脏器亦未见异常,模型组、模型-低组、模型-高组视网膜病变发生率和病变评分与空白对照组比较均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。

注射碘酸钠动物视网膜可见病变1(视网膜呈波浪状改变)和病变2(视网膜呈异常心电图样改变、各层排列紊乱,外核层局灶性变薄),病变2可认为由病变1发展而来,最严重的病变为视网膜外核层局灶性萎缩消失,但仅偶见。造模后第3~28天病变呈加重趋势,至造模后第41天有一定程度缓解,但至造模后第62天仍未恢复。造模后第3天(连续给药11 d)所有

动物均可见病变1,模型-低组和模型-高组病变评分低于模型组,模型-高组与模型组间比较有统计学意义($P < 0.05$)。注射后第7天(连续给药15 d),模型-低组和模型-高组病变1的评分高于模型组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);模型-低组和模型-高组病变2的发生率、评分均低于模型组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),提示模型组病变加重的速度和程度均较快。造模后第21、28天(连续给药29、36 d),模型-低组病变2的评分和模型-高组病变2的发生率、评分均低于模型组,组间比较具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。病变评分结果显示,连续给药对视网膜病变有明显的预防和治疗效果,停药后效果亦可维持。组织病理学图片见图1~6,病变发生率和评分见表11。

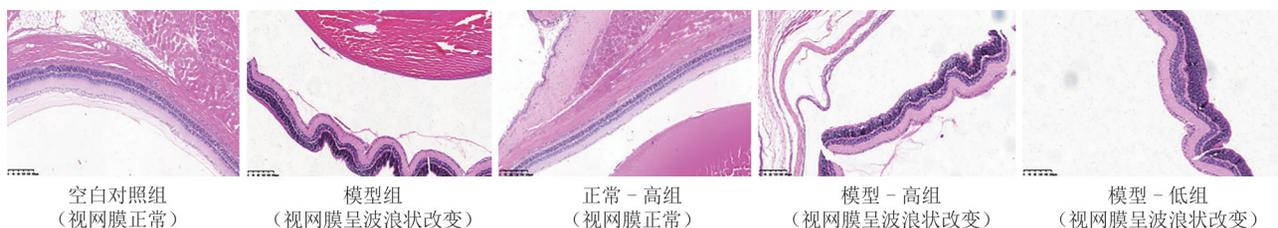


图1 各组造模后第3天(连续给药11 d)视网膜变化图

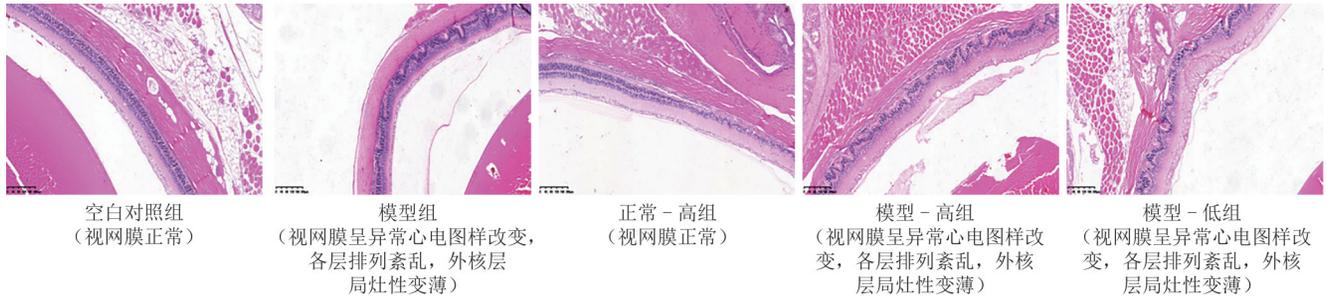


图2 各组造模后第7天(连续给药15 d)视网膜变化图

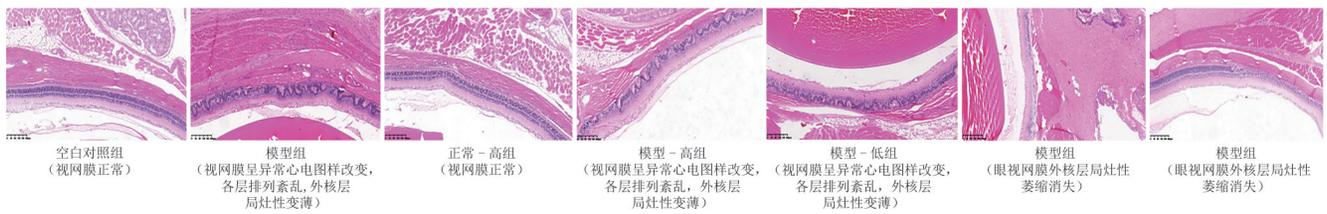


图3 各组造模后第21天(连续给药29 d)视网膜变化图

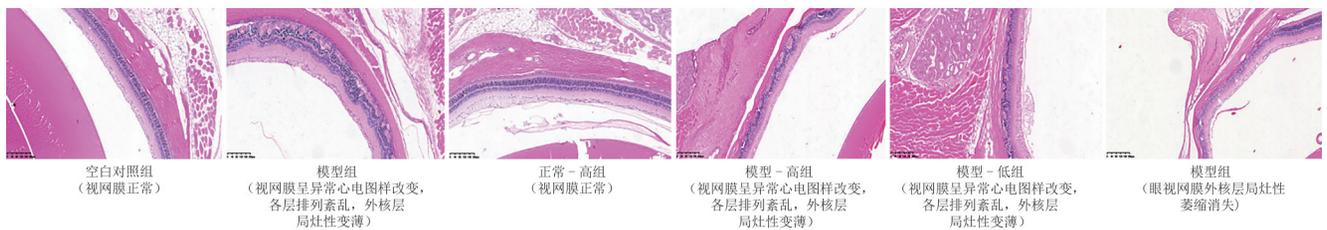


图4 各组造模后第28天(连续给药36 d)视网膜变化图

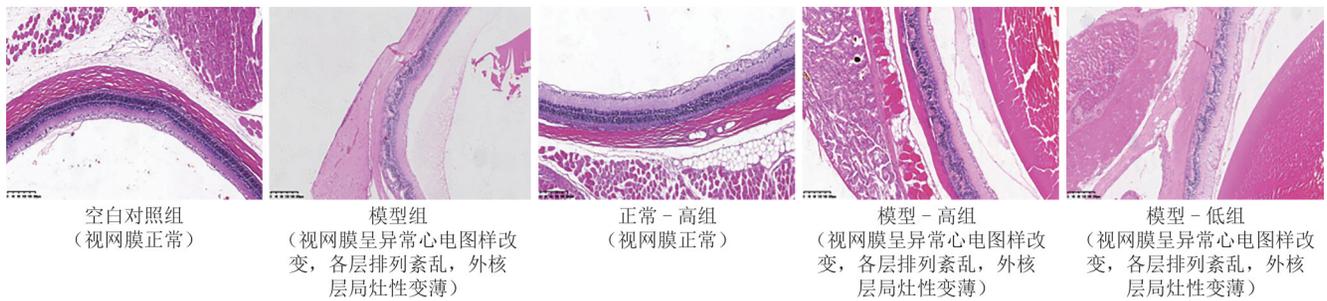


图5 各组造模后第41天(停药14 d)视网膜变化图

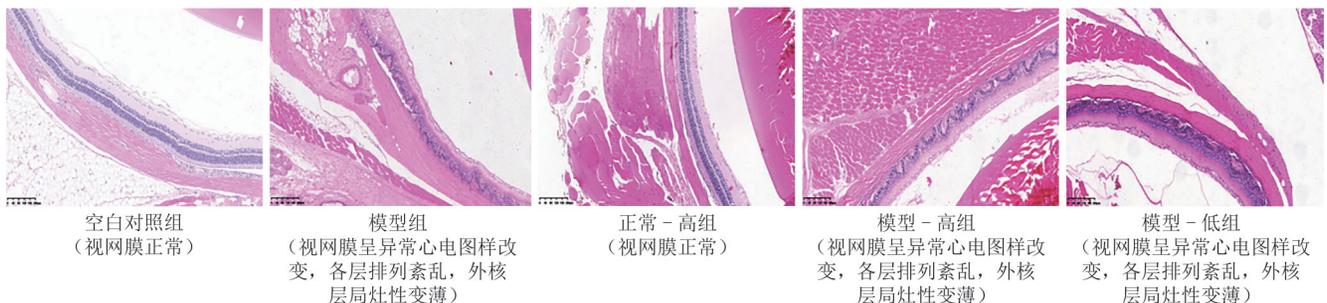


图6 各组造模后第62天(停药35 d)视网膜变化图

表 11 各组不同时间点视网膜病变发生率和评分结果

组别	n	时间	病变1		病变2	
			发生率/ %	评分/分	发生率/ %	评分/分
空白对照组	4	造模后第3天	0	0	0	0
	4	造模后第7天	0	0	0	0
	4	造模后第21天	0	0	0	0
	12	造模后第28天	0	0	0	0
	4	造模后第41天	0	0	0	0
	4	造模后第62天	0	0	0	0
模型组	4	造模后第3天	100**	2.75**	0	0
	4	造模后第7天	25**	0.25*	75**	5.25**
	4	造模后第21天	0	0	100**	7**
	12	造模后第28天	0	0	100**	7.5**
	4	造模后第41天	0	0	75**	5.5**
	4	造模后第62天	0	0	100**	6.5**
正常-高组	4	造模后第3天	0	0	0	0
	4	造模后第7天	0	0	0	0
	4	造模后第21天	0	0	0	0
	12	造模后第28天	0	0	0	0
	4	造模后第41天	0	0	0	0
	4	造模后第62天	0	0	0	0
模型-高组	4	造模后第3天	100**	1.75** [△]	0	0
	4	造模后第7天	25**	0.50** [△]	50** [△]	4.00**
	4	造模后第21天	0	0	50** [△]	4** [△]
	12	造模后第28天	0	0	75** [△]	4** [△]
	4	造模后第41天	0	0	66.7**	4**
	4	造模后第62天	0	0	75** [△]	4.5**
模型-低组	4	造模后第3天	100**	2.50**	0	0
	4	造模后第7天	50**	1.25** ^{△△}	50** [△]	5.25**
	4	造模后第21天	0	0	100**	7.5**
	12	造模后第28天	0	0	66.7**	4.5** [△]
	4	造模后第41天	0	0	25**	1.5** ^{△△}
	4	造模后第62天	0	0	50**	3** ^{△△}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

3 讨论

碘酸钠(NaIO_3)是一种抗代谢药物,可以选择性破坏视网膜色素上皮细胞,注射后引起的视网膜病变与人类视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)疾病的片状缺损极为相似^[1],被广泛用于RP模型制备和预防、治疗RP药物的研发等领域^[5]。本研究以该动物模型和正常大鼠为实验系统,比较连续灌胃给予灯盏花素后动物不同时期各指标变化情况和雌雄动物之间是否存在差异等,为将模型动物用于中药安全性评价的可行性提供参考。

3.1 对体征、体质量的影响

以0.06 g/kg剂量腹腔注射 NaIO_3 可使大鼠在注射

当天出现不同程度稀便但次日可恢复正常,注射后雄鼠还出现短暂体质量增长缓慢的情况,这与本研究预试验观察到的情况完全一致,但在其他文献中未见类似报道^[3-7],这与 NaIO_3 剂量、造模方式和造模后的关注点不同等有关。此外,以2.0 g/kg连续给予灯盏花素的正常动物未见任何异常体征,给予灯盏花素的模型-低组(0.8 g/kg)、模型-高组(2.0 g/kg)稀便发生率分别为59%、63%,远低于模型组(88%),提示连续给予灯盏花素可一定程度减少动物粪便性状异常的发生率,但其作用机理有待进一步探讨。同时,造模后短期内雄鼠体质量增长略缓慢,但连续给予灯盏花素对正常和模型大鼠的体质量均没有影响。

3.2 对生化指标的影响

本研究造模后第28天($n = 6$)其余检测时间点动物样本数均较少($n = 2$),同时动物有个体差异,无法仅用组间比较是否具有统计学意义来判断药物的影响,因此本研究还重点分析和比较了各类指标的总体变化规律,其中模型组、正常-高组主要与空白对照组比较,模型-低组和模型-高组主要与模型组比较。本研究的结果与项目前期灯盏花素重复给药毒性试验的结果基本一致。

3.2.1 与肝功能(AST、ALT、GGT、TBIL)和脂质代谢(CHOL、TG)相关指标

据分析,腹腔注射 NaIO_3 对大鼠上述指标的影响有性别差异,雌鼠上述指标的波动出现较早且更明显(雌鼠:脂质代谢指标造模后第3天,肝功能造模后第7天;雄鼠:脂质代谢指标造模后第7天,肝功能指标造模后第21天),但在影响的持续时间方面没有明显性别差异。以2.0 g/kg给予正常大鼠灯盏花素,连续灌胃15、29、36 d和11、29 d可分别使雌鼠和雄鼠的大部分肝功能指标轻微升高,至停药后35 d除雄鼠TBIL外其余指标均恢复。灯盏花素两个剂量对模型动物上述指标的影响有一定性别差异,造模后第3天(连续给药11 d)雄鼠指标开始升高,对肝功能和脂质代谢的影响分别持续至造模后第7天(连续给药15 d)和造模后第28天(连续给药36 d),而雌鼠上述指标分别至造模后第21天(连续给药29 d)和28天(连续给药36 d)才开始升高。研究结果提示,连续给予灯盏花素不能预防和治疗腹腔注射 NaIO_3 引起的肝胆和脂质代谢指标的异常波动,且在造模初期还具有加大上述指标波动幅度和使指标波动情况提前出现的趋势。

3.2.2 与心脏功能(CK、CK-MB、LDH)和肾脏功能(BUN、CREA)相关指标

腹腔注射 NaIO_3 对心脏功能指标的影响未见明显

性别差异(从造模后第7天开始波动至造模后第62天恢复正常),但对肾脏功能指标的影响有性别差异(雌鼠:造模后第7天出现,雄鼠:造模后第28天开始)。以2.0 g/kg给予正常大鼠灯盏花素对上述指标的影响有性别差异。对雌鼠心脏功能指标的影响在连续给药11 d出现持续至给药15 d,对雄鼠的影响在连续给药29 d出现持续至给药36 d停药后恢复正常。对正常雌鼠肾脏功能指标没有影响,但连续给药36 d可使雄鼠上述指标轻微升高。灯盏花素两个剂量对模型雌鼠心脏功能指标没有影响,但可使雄鼠心脏功能指标在造模后第3天(连续给药11 d)开始升高,且以高剂量较明显,高剂量上述指标至造模后第62天(停药35 d)仍未恢复。高剂量可使雌鼠造模后第21天(连续给药29 d),雄鼠造模后第7、21天(连续给药14、28 d)肾功能指标升高。研究结果提示,连续给予灯盏花素不能预防和治疗腹腔注射NaIO₃引起的心脏和肾脏功能指标的异常波动且还具有增大心脏指标波动幅度的趋势。

3.3 对脏器重量、系数的影响

造模后第3天(连续给药11 d)模型雌鼠肾上腺重量、系数和正常雄鼠胸腺重量、系数均大于其他各组;造模后第7天(连续给药15 d)模型雄鼠胸腺重量、系数高于空白对照,模型-高组雄鼠胸腺重量、系数大于除模型外的其他各组,且据个体数据该两组动物的上述指标均偏大,因此认为上述指标波动与连续给予灯盏花素和腹腔注射NaIO₃有一定相关性。以2.0 g/kg给予正常大鼠灯盏花素连续15 d可使雄鼠肝脏重量、系数增大,这与雄鼠连续给药肝胆功能生化指标均升高的情况吻合。本研究结果与项目前期灯盏花素重复给药毒性试验结果(没有显示2.0 g/kg的灯盏花素连续给药会对动物的脏器重量、系数产生影响)有一定差异,推测可能与本研究为多时间点动态观察(重复给药毒性试验中仅观察连续给药28 d结果)和动物样本数较少有关。

3.4 对视网膜病变的影响

NaIO₃可选择性地引起RPE损伤,继而导致视网膜光感受器细胞等组织的损伤,超大剂量NaIO₃能在造模6 h后造成视网膜色素上皮细胞坏死和24 h后外核层细胞排列紊乱和凋亡^[8],本研究在造模后不同时间点对大鼠视网膜病变情况进行了动态追踪,可见大鼠视网膜色素上皮细胞及神经层细胞出现明显病理损伤,病变情况与文献报道结果一致^[5-10],说明动物模型成功。灯盏花素以0.8、2.0 g/kg连续灌胃给药未见对

正常大鼠脏器和眼模型大鼠除眼之外的其他脏器产生任何影响,但对模型大鼠的视网膜病变有明显的预防和治疗作用,其中又以2.0 g/kg的效果较为明显,且停药35 d上述效果仍可维持。

综上所述,灯盏花素对正常大鼠重复给药的NOEAL为2.0 g/kg,对模型动物的NOEAL为0.8 g/kg以下,药效学有效剂量的7倍和3倍以下分别为对正常大鼠和模型大鼠的安全剂量范围;值得注意的是,无论从一般体征、生理指标的表达还是诱导视网膜病变的程度来看,NaIO₃诱导的眼底病变模型存在一定性别差异,应充分考虑动物性别、采样和检测时间点的选择。因此以药物的临床适应证动物模型为临床前安全性评价的对象虽可更明确地观察到对临床适应证明显的“预防和治疗”作用,亦更加接近药物的临床使用情况,但也可能存在放大了药物在某些方面的毒性,降低其安全剂量范围的可能,应在充分评估风险和获益的前提下进行实验动物的选择,适应证动物模型和造模用试剂等均应进行多方面的综合考量,避免试剂与药物的相互作用及模型自身存在的问题等对药物安全性评价的干扰。

【参考文献】

- [1] 田利华,赵离钟,顾佳,等. 灯盏花素上市品种概况以及新剂型研究进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3719-3722.
- [2] 赵茜,罗德霞,马琼,等. 基于血小板活化因子研究灯盏花素改善非酒精性脂肪肝病大鼠氧化应激作用[J]. 中华中医药杂志,2022,37(1):461-464.
- [3] 韩淑萍,吴盈盈,吴瑾瑾,等. 灯盏花素温敏型鼻用原位凝胶的基质处方筛选[J]. 中华中医药学刊,2013,31(5):1050-1052.
- [4] 叶赏和,石森林,储利胜,等. 灯盏花乙素大鼠口服给药的药动学与药效学研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(7):1387-1389.
- [5] 范美花,陈永雄. 碘酸钠诱发的视网膜色素变性动物模型研究进展[J]. 中华实验眼科杂志,2016,34(9):860-864.
- [6] 朱颖婷,邓新国,高杨,等. 碘酸钠诱导大鼠视网膜损伤的病理改变和SOD、CAT的变化[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(9):1851-1854.
- [7] GONG L H, WU Q, SONG B, et al. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2008, 36 (7) : 666-671.
- [8] 姜双,徐海月. 碘酸钠对小鼠视网膜形态和功能变化的影响[J]. 国际眼科杂志,2016,16(6):1036-1038.
- [9] 王凯,黎晓新,姜燕荣. 碘酸钠诱导兔视网膜和视神经跨神经元变性的研究[J]. 眼科研究,2008,26(7):481-485.
- [10] KIUCHI K, YOSHIZAWA K, SHIKATA N, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice [J]. Curr Eye Res, 2002, 25(6):373-379.

(收稿日期:2022-12-02)

Comparative Study of Breviscapine on Normal Fundus and Fundus Lesion in Rats

TAN Ying^{1,2}, LIAO Wenping^{1,2}, GAO Qilong³, LI Yong^{1,2}, SHI Xinhui^{1,2}, WANG Jingkun^{1,2}, SU Min^{1,2}✉

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2. Yunnan Province Company Key

Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China;

3. Kunming Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650031, China)

【Abstract】 Objective: To explore the feasibility and precautions of using model animals to evaluate the safety of Chinese medicinal, by comparing the effects of breviscapine on normal fundus and fundus lesion in rats. Methods: 160 SD rats were randomly divided into the blank control group, the model group, the breviscapine (normal animal) 2.0 g/kg group (abbreviated as normal – high group), the breviscapine (model animal) 0.8 g/kg (abbreviated as model – low group), and the breviscapine (model animal) 2.0 g/kg (abbreviated as model – high group), with 32 rats in each group. Each group was given the sterilized animal drinking water and breviscapine suspension (0.05 g/ml or 0.13 g/ml) with a dose of 15 ml/kg and a frequency of one time per 24h. 9 days after administration, the model group, the model – low group and the model – high group were intraperitoneally injected with NaIO₃ once at a dose of 0.06 g/kg, the blank control group and the normal – high group were injected with NaCl at the same dose. The next day after modeling, each group continued to give the corresponding solvent and breviscapine suspension, the actual days of administration were 11 d, 15 d, 29 d and 36 d, respectively. After drug withdrawal, the observation continued until the 41 st and 62 nd days after model establishment. During the study period, the general signs were observed every day, the body weight was measured every week. On the 3 rd, 7 th, 21 st, 28 th, 41 st and 62 nd days after modeling, rats were randomly selected and their blood were collected from abdominal aorta to detect serum biochemical indicators, organ weighing and histopathology were carried out. Results: Breviscapine had no effect on body weight and general signs of the normal rats, however it can reduce the number of rats with loose stool caused by NaIO₃. There was slight fluctuations in biochemical indexes but without toxic significance in the normal – high group, but the biochemical indexes were increased in the model – low group and the model – high group at the early stage of modeling. After 11 days of continuous administration, the adrenal gland weight of the female rats in the model – high group and thymus weight of the male rats in the normal – high group were increased; after 15 days of administration, the adrenal gland weight of the normal female rats was reduced; there were statistical differences in the above indexes among the groups ($P < 0.05$). Breviscapine had no effect on all organs of the normal rats, but it had preventive and therapeutic effect on retinopathy of the modeling rats. Conclusion: The no observed adverse effect level (NOAEL) of repeated administration was lower in the rats of the model – breviscapine groups than that in the normal rats. It was possible to reduce the safe dose range of drugs by conducting preclinical safety evaluation research on model animals. When selecting model animals, the influence of modeling drugs should be excluded, including considering the interaction between modeling drugs and evaluation drugs, as well as considering establishment of model background data.

【Key words】 Breviscapine; Fundus lesion; Comparative study; NOAEL