

# 菲牛蛭冻干粉的重重复给药毒性研究

张元杰<sup>1</sup>,张才星<sup>2</sup>,李 聪<sup>2</sup>,杨金玲<sup>2</sup>,皮 娜<sup>2</sup>,牛婷婷<sup>2</sup>,王启艳<sup>2</sup>,  
江勤芳<sup>2</sup>,李 云<sup>2</sup>,段红宇<sup>3</sup>,范胜涛<sup>2</sup>,来国防<sup>1</sup>

(1. 云南省食品药品监督检验研究院 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台,云南 昆明 650106;  
2. 中国医学科学院 医学生物学研究所,云南 昆明 650031;3. 云南海瑞迪生物药业有限公司,云南 保山 678000)

**摘要:**通过观察啮齿类动物 SD 大鼠长期灌胃给予菲牛蛭冻干粉后产生的毒性反应及其严重程度,对菲牛蛭冻干粉进行重复给药毒性的研究,为其药用安全性评价提供科学依据.将 SD 大鼠随机分为溶媒对照组(无菌注射用水)、菲牛蛭冻干粉高、中、低剂量组(3.24、1.08 和 0.54 g/kg),给药质量浓度分别为 205.5、67.5 和 33.75 mg/mL,给药体积以每周称量体重计算,每周连续灌胃给药 6 d,给药周期 6 个月,末次给药后恢复 8 周.对其进行临床指标检测、脏器重量称量、血液学检查、血清生化检查、组织病理学检查,从而评估菲牛蛭冻干粉的毒理学安全性.结果在连续给予 SD 大鼠菲牛蛭冻干粉 6 个月后,各项指标均未发现与供试品相关的毒性变化.本试验条件下,SD 大鼠给予高、中、低剂量菲牛蛭冻干粉未见明显毒性作用.

**关键词:**菲牛蛭冻干粉;SD 大鼠;重复给药毒性

**中图分类号:**R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-8513(2024)02-0169-09

菲牛蛭(*Poecilobdellamanillensis*),别名“金边蚂蟥”、“马尼拟医蛭”,含有菲牛蛭素 A、菲牛蛭素 B、水蛭素等多种活性成分<sup>[1-3]</sup>,具有抗血小板聚集与抗凝血、抑制血栓形成、抗纤维化等多种药理作用<sup>[4-7]</sup>,具备较高的开发利用价值.目前菲牛蛭已收载于《广西壮族自治区壮药质量标准》及《云南省中药材标准》<sup>[8-9]</sup>.

钟苗等<sup>[10-11]</sup>通过体外、体内的抗凝活性研究发现,与传统的熬、炒等高温炮制方法能够使水蛭的抗凝活性升高不同,菲牛蛭经高温炮制后抗凝活性降低,而冷冻干燥、清水吊干等低温处理方式能够较为有效地保留菲牛蛭的抗凝活性.故从保存活性成分的角度出发,菲牛蛭以冻干粉的形式使用较为合理.但传统中医药理论认为炮制对水蛭具有减毒作用<sup>[12]</sup>.可见,对于未经过高温炮制的菲牛蛭冻干粉而言,安全性是决定其能否合理药用的关键.因此,本研究开展了 SD 大鼠经口给予菲牛蛭冻干粉重复给药的毒性试验,评价其毒理学安全性,为今后菲牛蛭的药用安全性提供参考与科学依据.

## 1 实验材料与仪器

### 1.1 样品供试品

菲牛蛭冻干粉(由云南海瑞迪生物药业有限公司生产提供),批号 C0419111101,粉末状.临床拟用量为 1~3 g/日/人.溶媒对照品:无菌注射用水(由中国医学科学院医学生物学研究所提供),批号 J2021-01-F.

### 1.2 实验动物和饲养环境

SD 大鼠(SPF 级)120 只,雌雄各半(购于北京维通利华实验动物技术有限公司),生产许可证号:SCXK(京)2016-0011,并提供近期动物质检合格报告保证实验动物质量.购入时动物体重范围:180~220 g,同批动物体重不能超过平均体重的 20%.已获得实验动物伦理审批,饲养地点位于中国医学科学院医学生物学研究所药物安全性评价研究中心屏障环境动物室,设定温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,照明时间

收稿日期:2023-09-07.

基金项目:云南生物医药专项基金(202102AA100009).

作者简介:张元杰(1984-),男,硕士,副主任药师.主要从事中药质量控制相关研究.

通信作者:来国防(1972-),男,博士,主任药师.主要从事中药质量标准及外源性污染物检测技术研究.

12 h/12 h 明暗交替(采用动物照明控制系统,8:00~20:00 开灯). 换气次数 > 15 次/h, 工作照度 > 200 Lx, 动物照度 15~20 Lx. 定期进行笼具更换和清洁消毒. 实验动物在进行试验前, 检疫 6 d, 检疫项目包括外形、体型、生殖器、行动、呼吸、被毛、鼻、口腔、眼、耳、尿、粪便等.

### 1.3 主要仪器与设备

YP20001 电子天平(上海光正)、UA-66 尿液分析仪(深圳迈瑞)、CA500 血液分析仪(Sysmex)、Ni-Kon80i 荧光显微镜(日本 Nikon)、OLYMPUS AU400 全自动生化分析仪(日本奥林巴斯)、IMS972 电解质仪(深圳希莱恒)、病理取材台(美国 Thermo)、脱水机(德国 Leica)、包埋机(德国 Leica)、切片机(德国 Leica)、摊片机(德国 Leica)、烤片机(德国 Leica)、盖片机(德国 Leica)、染色机(德国 Leica).

## 2 实验方法

### 2.1 实验动物分组

试验选用 120 只 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半. 按性别和体重随机分为 4 个试验组(溶媒对照组、菲牛蛭冻干粉高剂量组、中剂量组、低剂量组), 如表 1 所示. 每组 30 只, 雌雄各 15 只. 组别标识: 分组后溶媒对照组以白色笼卡标识, 供试品组以蓝色、橙、红色笼卡标识. 动物编号: 雄性动物以 M 开头, 编号为 M01-M60, 雌性动物以 F 开头, 编号为 F01-F60.

表 1 实验动物分组

组别	笼卡颜色	给药剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	雄性	雌性
溶媒对照组	白色	0	M01-15	F01-15
菲牛蛭冻干粉低剂量组	蓝色	0.54	M16-30	F16-30
菲牛蛭冻干粉中剂量组	橙色	1.08	M31-45	F31-45
菲牛蛭冻干粉高剂量组	红色	3.24	M46-60	F46-60

### 2.2 给药方案

每周连续灌胃给药 6 d, 给药周期 6 个月, 末次给药后恢复 8 周. 根据《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》<sup>[13]</sup>, 将菲牛蛭冻干粉设置为高、中、低剂量组, 给药剂量分别为 3.24、1.08 和 0.54 g/kg, 给药质量浓度分别为 205.5、67.5 和 33.75 mg/mL, 给药体积以每周称量体重计算. 同时, 设置溶媒对照组, 给予无菌注射用水. 供试品组给予菲牛蛭冻干粉溶液.

### 2.3 指标检测

#### 2.3.1 临床指标检测

(1) 试验期间每日观察动物临床症状, 每周测定体重和摄食量; (2) 给药结束后第 2 天计划剖检溶媒对照组大鼠 10 ♀/10 ♂、供试品组大鼠 10 ♀/10 ♂, 并进行血液学、凝血检测、血清生化(包括电解质)、剖检后进行骨髓涂片、脏器湿重称量, 并采集组织样本进行组织病理学检查. (3) 恢复期结束后 1d 计划剖检溶媒对照组大鼠 5 ♀/5 ♂、供试品组大鼠 5 ♀/5 ♂, 并进行血液学、血清生化(包括电解质)、凝血检测, 剖检后采集组织样本进行组织病理学检查. (4) 计划剖检前一天进行尿常规和眼科检查.

#### 2.3.2 脏器称量及系数计算

给药结束后, 对溶媒对照组、菲牛至冻干粉低剂量组、菲牛至冻干粉低中量组、菲牛至冻干粉高剂量组的雌雄动物进行解剖, 同时将剖检的脏器组织进行重量称量并计算脏器系数(脏器湿重 g/体重 g × 100). 称量脏器包括: 脑、心脏、肺脏、肝脏、肾脏、肾上腺、胸腺、脾脏、睾丸、附睾、卵巢、子宫.

#### 2.3.3 血液学检查

红细胞计数(RBC)、红细胞压积(HCT)、血红蛋白含量(HGB/Hb)、红细胞平均体积(MCV)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞分布宽度(RDW)、白细胞数量(WBC)、血小板数量(PLT)、平均血小板容积(MPV)、白细胞分类计数(LYM、NEU、BASO、EOS、MONO)及百分计数(LYM%、NEU%、BASO%、EOS%、MONO%)、网织红细胞(RETIC)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(Fbg 或 FIB).

#### 2.3.4 血清生化检查

谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白

(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TGL)、葡萄糖(GLU)、肌酸激酶(CK)、钾( $K^+$ )、钠( $Na^+$ )、氯( $Cl^-$ )。

### 2.3.5 组织病理学检查

所有称重脏器并连舌下腺、颌下腺、腮腺、脊髓(颈、胸、腰段)、垂体、气管、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、胰腺、主动脉、皮肤(腹部)、乳腺(雌性)、阴道、输卵管、膀胱、坐骨神经、胸骨、股骨、甲状腺、肌肉(骨骼肌)、远端和近端淋巴结、眼、哈氏腺、肾上腺、脑(大脑、小脑、脑干)、前列腺、精囊(雄性)、甲状(旁)腺及所有大体观察到异常的组织、组织肿块均进行组织病理学检查。根据本中心病理组织 HE 染色的标准操作规程进行染色,染色前用二甲苯将切片组织中的蜡彻底脱净,接着用酒精将切片组织彻底脱水透明,再用二甲苯提高组织的透光度,最后用中性树胶封盖,染色结束后检查切片组织是否完整且均约着色,确保无误即可进行镜检;动物剖检具体分配情况如表 2 所示。

表 2 动物剖检计划表

检测项目	给药结束后第 2 d	恢复期结束后 1 d
血液学检测	每组 10 ♀/10 ♂	每组 5 ♀/5 ♂
凝血指标检测	每组 10 ♀/10 ♂	每组 5 ♀/5 ♂
血清生化检测(包括电解质)	每组 10 ♀/10 ♂	每组 5 ♀/5 ♂
剖检(骨髓涂片、脏器称重、病理样本采样)	每组 10 ♀/10 ♂	每组 5 ♀/5 ♂

## 2.4 试验结果统计与处理

动物的体重、体重增长率(体重增长百分率 = (体重 - 给药前体重)/给药前体重 × 100%)、摄食量、血液学、凝血、血清生化检测各指标、脏器湿重和脏器系数等计数数据以及尿检和组织病理学检查等计数数据使用 EXCEL 软件进行列表,在报告中以 MEAN ± SD 表示,采用 SPSS 软件进行统计分析。

计数数据尿常规指标用卡方检验(样本量大于 5)或 Fisher 精准检验(样本量小于 5)。大鼠体重、摄食量、脏器湿重用 SPSS 软件分析:首先,对数据进行正态性分析,若样本符合正态性分析,则用独立 T 检验;若样本不符合正态性分布,则用非参数检验中的 Mann - Whitney U。如果样本量小,选用 D 检验(Kolmogorov - Sminov)。样本量大则选用 W 检验(Shapiro - Wilk)。血液学、凝血、血清生化指标用 ANOVA 方法进行分析。

## 3 结果

### 3.1 给药结束后与恢复期结束后雌性、雄性大鼠体重变化

试验期间,各试验组动物一般状态良好,活动正常,未见明显临床症状,未出现与供试品相关动物死亡。如图 1~4 所示,给药结束后与恢复期结束后各组雌性、雄性大鼠体重整体稳步增长,阴性对照组与供试品组体重偶见统计学意义上的显著性差异,轻度波动,最后趋势恢复正常,未见统计学差异。

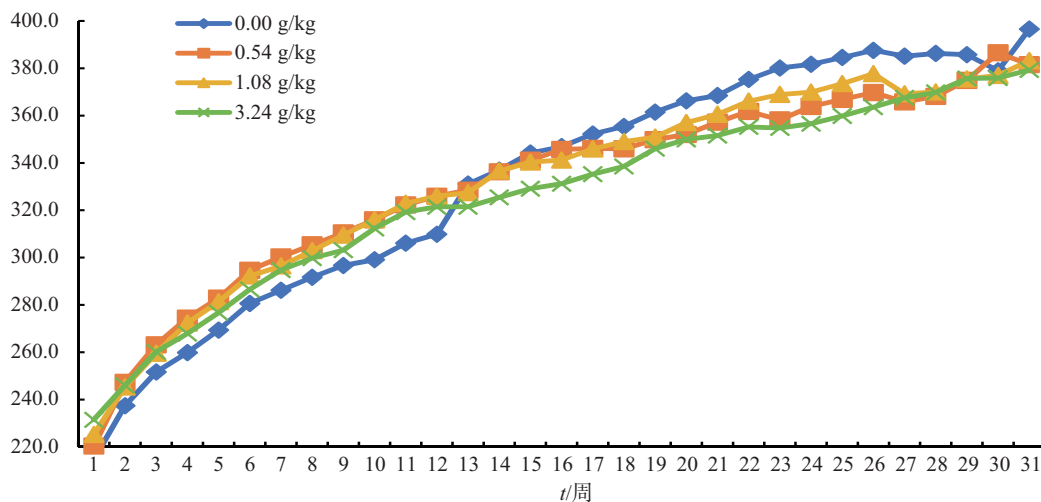


图 1 给药结束后雌性大鼠体重变化

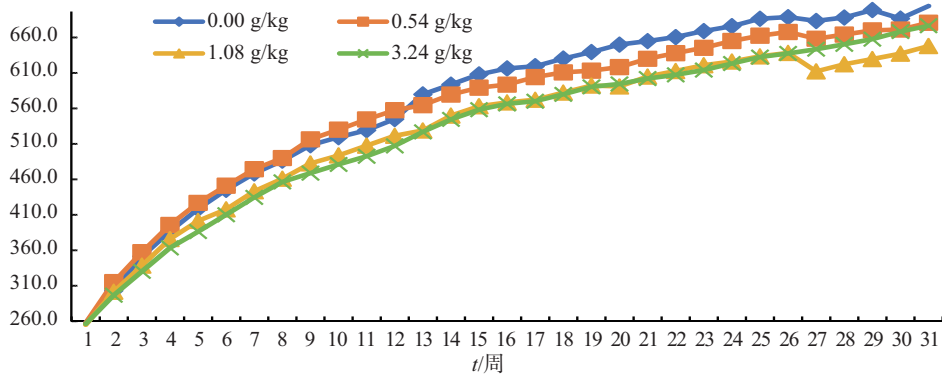


图 2 给药结束后雄性大鼠体重变化

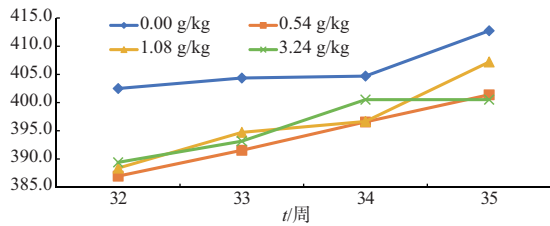


图 3 恢复期结束后雌性大鼠体重变化

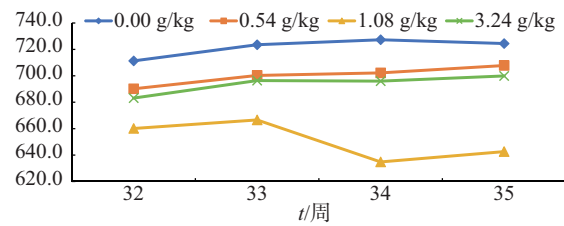


图 4 恢复期结束后雄性大鼠体重变化

### 3.2 血液学指标

试验末期,与阴性对照组比较,菲牛蛭冻干粉高剂量组:EOS 雄性数值降低;RETIC 雌性数值升高. 以上指标均具有统计学意义上的显著性差异  $P < 0.05$ , 各组其它各指标均未见异常(见表 3 和表 4).

表 3 给药结束后雌性、雄性大鼠血液指标检测结果

性别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	WBC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	NE#/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	LY#/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	RBC/ ( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	MCH/ Pg	RETICS/ %
雌	0.00	$4.68 \pm 1.05$	$0.93 \pm 0.36$	$3.44 \pm 0.68$	$7.66 \pm 0.30$	$17.84 \pm 0.73$	$2.83 \pm 0.39$
	0.54	$4.51 \pm 0.91$	$0.93 \pm 0.37$	$3.29 \pm 0.74$	$7.60 \pm 0.45$	$17.43 \pm 0.48$	$2.74 \pm 0.85$
	1.08	$4.77 \pm 1.32$	$0.97 \pm 0.59$	$3.49 \pm 1.09$	$7.54 \pm 0.45$	$17.29 \pm 0.52$	$2.66 \pm 0.44$
	3.24	$4.66 \pm 2.01$	$0.9 \pm 0.32$	$3.39 \pm 1.67$	$7.49 \pm 1.04$	$17.31 \pm 1.41$	$2.80 \pm 1.13$
雄	0.00	$6.09 \pm 1.89$	$1.03 \pm 0.28$	$4.66 \pm 1.71$	$8.51 \pm 0.34$	$18.12 \pm 0.69$	$2.97 \pm 0.75$
	0.54	$4.92 \pm 1.90$	$0.97 \pm 0.51$	$3.63 \pm 1.45$	$7.79 \pm 0.43$	$17.34 \pm 0.47$	$2.75 \pm 0.60$
	1.08	$4.91 \pm 2.28$	$0.99 \pm 0.57$	$3.60 \pm 2.17$	$7.63 \pm 0.53$	$17.24 \pm 0.60$	$2.71 \pm 0.30$
	3.24	$4.80 \pm 1.76$	$0.99 \pm 1.16$	$3.50 \pm 0.72$	$7.60 \pm 0.63$	$17.20 \pm 0.63$	$2.66 \pm 0.63$

表 4 恢复期结束后雌性、雄性大鼠血液指标检测结果

性别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1}$ )	WBC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	NE#/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	LY#/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	RBC/ ( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	MCH/ Pg	RETICS/ %
雌	0.00	$3.83 \pm 2.56$	$1.52 \pm 2.12$	$1.97 \pm 0.39$	$7.13 \pm 0.70$	$19.94 \pm 0.59$	$4.35 \pm 1.36$
	0.54	$3.75 \pm 2.04$	$0.88 \pm 0.40$	$2.60 \pm 1.48$	$7.35 \pm 0.35$	$19.03 \pm 0.55$	$3.02 \pm 0.46$
	1.08	$2.71 \pm 0.65$	$0.93 \pm 0.23$	$1.48 \pm 0.49$	$7.01 \pm 0.15$	$19.86 \pm 0.55$	$3.24 \pm 0.43$
	3.24	$3.08 \pm 0.50$	$0.94 \pm 0.28$	$1.89 \pm 0.38$	$7.52 \pm 0.39$	$19.60 \pm 0.76$	$3.02 \pm 0.34$
雄	0.00	$6.00 \pm 0.71$	$1.37 \pm 0.21$	$4.20 \pm 0.84$	$8.33 \pm 0.79$	$17.66 \pm 0.44$	$2.99 \pm 0.14$
	0.54	$6.95 \pm 2.89$	$1.41 \pm 0.53$	$4.95 \pm 1.99$	$8.79 \pm 0.57$	$17.85 \pm 0.64$	$3.13 \pm 0.27$
	1.08	$5.25 \pm 1.12$	$0.93 \pm 0.20$	$4.04 \pm 1.05$	$8.59 \pm 0.20$	$17.90 \pm 0.48$	$2.64 \pm 0.76$
	3.24	$5.87 \pm 2.11$	$1.32 \pm 0.28$	$4.17 \pm 1.85$	$8.85 \pm 0.65$	$17.68 \pm 0.76$	$2.40 \pm 0.42$

### 3.3 生化指标

与阴性对照组比较,菲牛蛭冻干粉高剂量组:CK、TG 雄性数值降低;CREA 雌性数值升高,以上指标虽然有统计学意义上差异( $P < 0.05$ ),但没有剂量和时间效应关系,可能和动物个体指标波动有关;各组其它各指标均未见异常(见表 5 和表 6).

表5 给药结束后雌性、雄性大鼠的生化指标检测结果

性别	剂量/ (g · kg <sup>-1</sup> )	CK/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALP/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALT/ (U · L <sup>-1</sup> )	CREA/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	TP/ (g · L <sup>-1</sup> )	AST/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALB/ (g · L <sup>-1</sup> )	CHOL/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	GGT/ (U · L <sup>-1</sup> )	TG/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	TBIL/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	BUN/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	GLU/ (mmol · L <sup>-1</sup> )
雌	0.00	489.45 ± 8.38	53.30 ± 0.37	41.14 ± 0.36	33.87 ± 27.07	58.42 ± 0.13	102.29 ± 21.83	32.66 ± 0.73	1.86 ± 7.94	1.16 ± 0.63	0.51 ± 0.13	2.46 ± 0.73	5.30 ± 0.63	11.21 ± 8.64
	0.54	451.51 ± 1.82	39.80 ± 0.29	54.24 ± 0.43	39.16 ± 42.82	62.38 ± 0.18	99.28 ± 63.23	36.42 ± 0.53	1.88 ± 9.75	1.12 ± 0.57	0.53 ± 0.18	2.49 ± 0.53	5.32 ± 0.57	9.25 ± 2.95
	1.08	536.71 ± 4.16	46.70 ± 0.38	88.12 ± 0.70	40.11 ± 25.36	62.45 ± 0.21	1152.78 ± 117.49	34 ± 3.96	2.14 ± 6.63	1.34 ± 0.68	0.55 ± 0.21	3.82 ± 0.96	5.75 ± 0.67	11.15 ± 6.72
	3.24	442.01 ± 223.79	56.50 ± 0.62	43.05 ± 0.31	40.99 ± 26.44	60.37 ± 0.16	94.23 ± 26.06	33.11 ± 0.88	1.79 ± 6.50	1.27 ± 0.95	0.48 ± 0.16	2.56 ± 0.88	5.81 ± 0.94	9.59 ± 3.30
雄	0.00	691.64 ± 205.95	46.10 ± 0.56	38.82 ± 0.27	37.27 ± 25.19	59.89 ± 0.22	130.50 ± 18.18	33.43 ± 0.73	1.89 ± 6.20	1.08 ± 0.48	0.51 ± 0.22	2.43 ± 0.72	5.68 ± 0.48	7.94 ± 1.18
	0.54	472.67 ± 308.48	57.40 ± 0.54	43.46 ± 0.28	38.93 ± 29.96	60.54 ± 0.21	106.29 ± 28.56	33.43 ± 1.36	2.07 ± 9.56	1.32 ± 0.48	0.57 ± 0.21	2.57 ± 1.35	5.29 ± 0.48	11.83 ± 7.83
	1.08	561.68 ± 377.02	73.33 ± 0.31	100.57 ± 0.71	44.95 ± 98.25	59.88 ± 0.42	165.12 ± 172.28	34.18 ± 6.14	1.77 ± 31.47	1.27 ± 0.64	0.59 ± 0.42	4.37 ± 0.13	5.70 ± 0.64	10.10 ± 6.47
	3.24	356.26 ± 123.38	40.10 ± 0.36	55.74 ± 0.71	41.02 ± 31.29	59.71 ± 0.09	110.35 ± 57.17	34.47 ± 0.73	1.85 ± 8.77	1.26 ± 0.68	0.33 ± 0.09	2.33 ± 0.73	5.95 ± 0.68	8.82 ± 4.55

注:AST为谷草转氨酶;ALT为谷丙转氨酶;ALP为碱性磷酸酶;TBIL为总胆红素;TP为总蛋白;ALB为白蛋白;BUN为尿素氮;CREA为肌酐;CHOL为胆固醇;TG为甘油三酯;GLU为葡萄糖;CK为肌酸激酶;K为钾;NA为钠;CL为氯;GGT为谷氨酰转氨酶;CA为钙。

表6 恢复期结束后雌性、雄性大鼠的生化指标检测结果

性别	剂量/ (g · kg <sup>-1</sup> )	CK/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALP/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALT/ (U · L <sup>-1</sup> )	CREA/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	TP/ (g · L <sup>-1</sup> )	AST/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALB/ (g · L <sup>-1</sup> )	CHOL/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	GGT/ (U · L <sup>-1</sup> )	TG/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	TBIL/ (μmol · L <sup>-1</sup> )	BUN/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	GLU/ (mmol · L <sup>-1</sup> )
雌	0.00	264.10 ± 133.77	31.00 ± 9.19	45.94 ± 31.75	39.64 ± 8.82	67.74 ± 2.71	154.16 ± 118.75	38.90 ± 1.58	2.66 ± 0.58	1.40 ± 0.80	0.49 ± 0.29	2.58 ± 1.62	4.44 ± 0.84	9.63 ± 3.90
	0.54	370.40 ± 130.71	20.40 ± 6.54	63.48 ± 27.35	33.46 ± 7.88	64.78 ± 2.56	147.54 ± 68.40	36.98 ± 1.53	2.08 ± 0.31	1.19 ± 0.44	0.82 ± 0.38	2.57 ± 0.20	4.83 ± 0.39	8.64 ± 0.79
	1.08	628.66 ± 323.82	24.20 ± 7.40	89.26 ± 54.18	44.28 ± 10.18	66.00 ± 3.05	220.36 ± 91.90	37.02 ± 2.03	2.18 ± 0.42	1.23 ± 0.37	0.50 ± 0.10	2.86 ± 0.59	5.31 ± 0.33	7.91 ± 0.51
	3.24	707.36 ± 636.76	20.60 ± 2.70	61.90 ± 25.29	33.04 ± 2.97	65.94 ± 6.94	204.42 ± 86.66	37.60 ± 3.26	2.31 ± 0.53	2.02 ± 1.59	0.54 ± 0.19	2.66 ± 0.45	4.04 ± 1.00	8.34 ± 1.16
雄	0.00	884.52 ± 341.88	60 ± 15.34	59.94 ± 18.57	34.78 ± 6.95	54.64 ± 4.72	154.26 ± 50.08	29.62 ± 2.27	1.80 ± 0.38	1.65 ± 0.37	0.69 ± 0.24	2.28 ± 0.08	4.97 ± 0.66	10.44 ± 2.16
	0.54	547.35 ± 251.74	85.25 ± 20.27	93.80 ± 97.08	52.66 ± 33.41	58.18 ± 2.70	129.13 ± 62.91	31.00 ± 1.18	2.14 ± 0.20	1.55 ± 0.40	0.65 ± 0.31	1.95 ± 0.46	4.88 ± 0.86	18.10 ± 16.72
	1.08	895.06 ± 544.44	470.80 ± 13.26	52.50 ± 13.66	44.50 ± 6.67	57.88 ± 3.24	134.40 ± 52.90	30.92 ± 1.76	1.95 ± 0.33	1.41 ± 0.23	0.54 ± 0.24	1.94 ± 0.63	5.08 ± 1.14	12.01 ± 8.38
	3.24	1011.75 ± 597.06	50 ± 5.92	44.23 ± 8.59	35.61 ± 4.68	54.93 ± 3.28	124.23 ± 47.97	29.50 ± 1.31	1.73 ± 0.39	1.41 ± 0.40	0.50 ± 0.10	1.97 ± 0.56	5.39 ± 0.41	8.87 ± 0.90

注:AST为谷草转氨酶;ALT为谷丙转氨酶;ALP为碱性磷酸酶;TBIL为总胆红素;TP为总蛋白;ALB为白蛋白;BUN为尿素氮;CREA为肌酐;CHOL为胆固醇;TG为甘油三酯;GLU为葡萄糖;CK为肌酸激酶;K为钾;NA为钠;CL为氯;GGT为谷氨酰转氨酶;CA为钙。

### 3.4 凝血指标

本试验采用凝血酶原时间(PT)测定试剂盒(凝固法)进行凝血指标检测.待测血浆加入过量的含钙组织凝血活酶,重新钙化的血浆在组织因子存在时激活因子X成为Xa,后者使凝血酶原转化成凝血酶,凝血酶使纤维蛋白原转变为不溶性纤维蛋白,测定凝固所需时间,即为待测血浆凝血酶时间.如表7所示,给药结束和恢复期结束后雌雄动物凝血指标结果显示各供试品组与阴性对照组比较均未见统计学意义上的显著性差异.

表7 雌性、雄性动物凝血指标检测结果

性别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	给药结束		恢复期结束	
		PTS/s	APTT/s	PTS/s	APTT/s
雌	0.00	15.41 ± 0.99	24.33 ± 3.78	13.38 ± 0.43	13.50 ± 1.38
	0.54	15.37 ± 1.34	24.91 ± 3.50	13.54 ± 0.70	13.72 ± 1.96
	1.08	14.83 ± 1.32	21.84 ± 4.03	13.20 ± 0.80	13.00 ± 3.77
	3.24	14.54 ± 0.98	21.94 ± 2.95	13.58 ± 0.27	14.18 ± 0.62
雄	0.00	15.58 ± 1.81	24.37 ± 4.53	14.06 ± 0.70	14.52 ± 2.34
	0.54	15.58 ± 1.81	24.37 ± 4.53	13.95 ± 0.45	13.93 ± 2.69
	1.08	18.92 ± 1.19	22.87 ± 4.34	14.02 ± 0.58	16.98 ± 2.80
	3.24	15.27 ± 1.06	26.21 ± 7.30	13.98 ± 0.95	15.75 ± 1.64

### 3.5 电解质指标

给药结束和恢复期结束后各供试品组与阴性对照组比较,电解质离子各项数值均未见统计学意义上的显著性差异(如表8所示).

表8 雌性、雄性动物电解质指标检测结果

性别	剂量/ (g·kg <sup>-1</sup> )	给药结束			恢复期结束		
		K/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Na/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Cl/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	K/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Na/ (mmol·L <sup>-1</sup> )	Cl/ (mmol·L <sup>-1</sup> )
雌	0.00	5.20 ± 4.36	146.59 ± 4.00	104.24 ± 1.87	5.22 ± 1.42	146.08 ± 0.77	102.21 ± 0.76
	0.54	4.80 ± 0.69	145.69 ± 7.87	104.69 ± 6.67	4.09 ± 0.36	145.26 ± 0.74	101.57 ± 1.11
	1.08	4.84 ± 1.33	146.41 ± 1.82	105.10 ± 1.40	4.51 ± 0.47	145.65 ± 0.99	102.07 ± 1.38
	3.24	4.87 ± 1.23	146.71 ± 1.58	105.28 ± 2.36	4.07 ± 0.51	146.39 ± 1.32	102.45 ± 0.66
雄	0.00	4.86 ± 1.15	146.27 ± 5.34	103.98 ± 4.44	4.62 ± 0.33	145.84 ± 0.72	103.64 ± 1.33
	0.54	4.94 ± 0.56	145.55 ± 13.87	104.67 ± 3.16	4.53 ± 0.18	144.29 ± 4.15	101.90 ± 1.93
	1.08	4.79 ± 1.71	146.15 ± 1.45	104.97 ± 2.00	5.44 ± 1.70	146.19 ± 0.99	102.36 ± 1.23
	3.24	4.86 ± 2.27	146.56 ± 1.29	105.22 ± 1.75	4.67 ± 0.27	145.80 ± 1.58	101.40 ± 0.99

### 3.6 动物脏器重量

给药结束后,我们对溶媒对照组、菲牛至冻干粉低剂量组、菲牛至冻干粉低中量组、菲牛至冻干粉高剂量组的雌雄动物进行解剖,同时将剖检的脏器组织进行重量称量.给药结束后雌雄动物脏器系数统计结果见表9、表10.

表9 给药结束雌性动物脏器系数统计

组别	脑/%	心/%	肺/%	肝/%	肾(左)/%	肾(右)/%
溶媒对照组	0.561 5 ± 0.037 5	0.273 4 ± 0.016 6	0.488 7 ± 0.059 0	2.464 ± 0.798 5	0.281 9 ± 0.023 9	0.280 9 ± 0.012 6
菲牛至冻干粉低剂量组	0.546 6 ± 0.026 7	0.283 5 ± 0.017 9	0.501 6 ± 0.037 1	2.753 1 ± 0.247 5	0.301 7 ± 0.041 9	0.309 4 ± 0.051 6
菲牛至冻干粉中剂量组	0.550 5 ± 0.045 9	0.270 0 ± 0.023 5	0.482 9 ± 0.039 7	2.739 2 ± 0.219 1	0.295 2 ± 0.038 9	0.304 4 ± 0.042 2
菲牛至冻干粉高剂量组	0.554 8 ± 0.022 7	0.263 6 ± 0.023 5	0.495 0 ± 0.026 8	2.848 1 ± 0.228 9	0.320 3 ± 0.036 6	0.325 2 ± 0.036 2

续表 9

组别	肾上腺(左)/%	肾上腺(右)/%	子宫/%	卵巢/%	胸腺/%	脾/%
溶媒对照组	0.012 6 ± 0.002 3	0.012 7 ± 0.001 9	0.241 1 ± 0.031 6	0.023 0 ± 0.008 3	0.058 3 ± 0.012 6	0.156 2 ± 0.016 8
菲牛至冻干粉低剂量组	0.013 2 ± 0.002 8	0.012 9 ± 0.004 3	0.313 7 ± 0.072 3	0.019 6 ± 0.005 4	0.066 0 ± 0.015 9	0.168 5 ± 0.039 0
菲牛至冻干粉中剂量组	0.010 6 ± 0.002 3	0.012 0 ± 0.003 0	0.285 2 ± 0.029 9	0.022 5 ± 0.004 9	0.059 9 ± 0.014 5	0.163 5 ± 0.037 8
菲牛至冻干粉高剂量组	0.012 7 ± 0.002 8	0.011 5 ± 0.002 2	0.271 1 ± 0.045 1	0.028 4 ± 0.009 7	0.120 7 ± 0.101 5	0.189 3 ± 0.031 1

表 10 给药结束雄性动物脏器系数统计

组别	脑/%	心/%	肺/%	肝/%	肾(左)/%	肾(右)/%
溶媒对照组	0.333 3 ± 0.010 8	0.252 8 ± 0.026 3	0.377 9 ± 0.024 7	2.444 8 ± 0.250 4	0.262 0 ± 0.019 4	0.262 9 ± 0.021 4
菲牛至冻干粉低剂量组	0.336 9 ± 0.012 5	0.250 1 ± 0.019 6	0.363 5 ± 0.019 1	2.346 7 ± 0.128 8	0.249 0 ± 0.020 3	0.258 0 ± 0.022 6
菲牛至冻干粉中剂量组	0.340 3 ± 0.018 0	0.245 1 ± 0.018 7	0.345 1 ± 0.019 6	2.340 2 ± 0.148 1	0.281 4 ± 0.018 3	0.289 0 ± 0.021 1
菲牛至冻干粉高剂量组	0.340 3 ± 0.014 9	0.239 5 ± 0.014 0	0.353 4 ± 0.015 2	2.331 9 ± 0.083 6	0.256 0 ± 0.024 7	0.264 0 ± 0.034 2

组别	肾上腺(左)/%	肾上腺(右)/%	胸腺/%	脾/%	附睾/%	睾丸/%
溶媒对照组	0.005 5 ± 0.001 5	0.004 2 ± 0.001 5	0.065 2 ± 0.016 4	0.139 8 ± 0.016 4	0.280 3 ± 0.020 1	0.565 1 ± 0.044 8
菲牛至冻干粉低剂量组	0.004 5 ± 0.001 0	0.003 5 ± 0.001 0	0.049 0 ± 0.018 7	0.142 6 ± 0.017 3	0.268 9 ± 0.018 6	0.564 6 ± 0.037 4
菲牛至冻干粉中剂量组	0.005 3 ± 0.001 1	0.005 0 ± 0.001 8	0.062 2 ± 0.012 1	0.141 5 ± 0.016 9	0.265 4 ± 0.023 0	0.565 3 ± 0.037 4
菲牛至冻干粉高剂量组	0.004 9 ± 0.000 9	0.004 9 ± 0.001 1	0.064 4 ± 0.015 9	0.135 2 ± 0.018 4	0.271 6 ± 0.013 1	0.559 2 ± 0.034 6

3.7 组织病理学检查

末次给药后 2 d,对照组和高剂量组个别动物心脏局部见炎性坏死灶,偶见出血(见图 5 A1,A2);肾脏主要表现为肾小管病变,包括局部轻度管腔扩张,少量炎性细胞浸润(见图 5 B1,B2),恢复期肾脏扩张较给药末期加重,见嗜碱性结构(见图 5 C1,C2);各组肺脏肺间隔增厚,细胞脱落伴有炎性细胞浸润或单一见多点状出血(见图 5 D1,D2);肝脏多为管腔周围坏死炎性小灶或局部脂肪变性(见图 5 E1,E2,F1,F2);给药末期脑组织少量动物见局灶性出血,充血(见图 5 G1,G2),恢复期动物改病变明显改善.此外,研究中偶见个别动物肾上腺、甲状腺、睾丸和附睾出现极轻度的局部细胞变性.以上病变均为极轻度(轻度)局部改变,未见明显的组织学结构消失.除恢复末期左肾脏对照组病变数量较高剂量组显著性增多( $P < 0.05$ )外,其余无统计学差异,未见明显的组别依赖性,发病数量雌雄未见明显差异(图中阴性对照组:心脏(A1, ♂)、肾脏(B1, ♀、C1, ♀)、肺脏(D1, ♂)、肝脏(E1, ♀、F1, ♀)、和脑(G1, ♂);高剂量组:心脏(A2, ♂)、肾脏(B2, ♀、C2, ♂)、肺脏(D2, ♂)、肝脏(E2, ♂、F2, ♂)和脑(G2, ♂);图中白色箭头代表脏器对应出现的不同病变性状).

除上述脏器,其余各种动物脏器组织病理学检查未见明显异常,恢复末期较给药末期病变动物比例及程度并未增加,未出现明显特异性的改变,均为动物常见的自发或偶发性疾病.主要脏器组织镜检典型病变示意图见图 5,病变结果统计见表 11.病理结果图中的箭头对应末次给药后 2 d,对照组和高剂量组个别动物的脏器出现的不同病变性状.

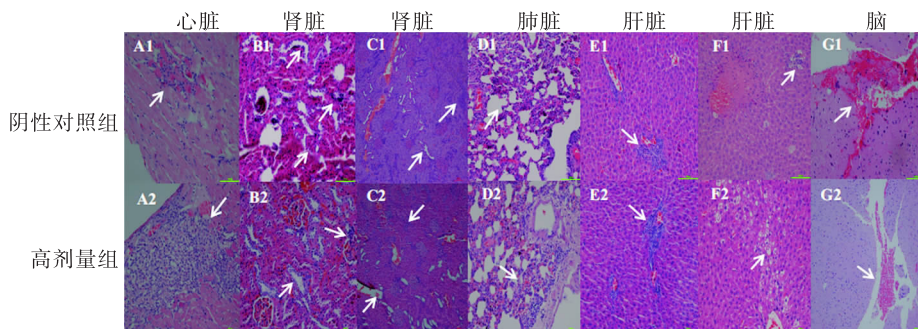


图 5 给药结束后第 2 天大鼠组织病理学检查

表11 各组动物脏器病变结果统计

脏器名称	给药末期 $N=40(20\delta 20\text{♀})$			恢复末期 $N=19(9\delta 10\text{♀})$		
	阴性对照组	高剂量组	$P$	阴性对照组	高剂量组	$P$
	$N=20$ (10 $\delta$ 10 $\text{♀}$ )	$N=20$ (10 $\delta$ 10 $\text{♀}$ )		$N=10$ (5 $\delta$ 5 $\text{♀}$ )	$N=9$ (4 $\delta$ 5 $\text{♀}$ )	
心脏	1	1	>0.05	2	2	>0.05
左肾脏	4	7	>0.05	6	2	<0.05
右肾脏	5	4	>0.05	3	3	>0.05
肺脏	11	11	>0.05	5	4	>0.05
肝脏	8	10	>0.05	4	4	>0.05
脑	3	3	>0.05	1	0	>0.05

注: $N=(10\delta 10\text{♀})$ ,表示雌性动物10只,雄性动物10只; $N=19(9\delta 10\text{♀})$ ,表示雌性动物10只,雄性动物9只。

#### 4 讨论

据对水蛭品种的考证研究结果显示,菲牛蛭是与古代药用水蛭相符的品种之一,这为后续菲牛蛭药用的相关研究奠定了重要的基础<sup>[14]</sup>。随着现代研究的深入,菲牛蛭在抗凝、抗栓和溶栓、降低血脂和改善血液循环、抗肿瘤等方面的活性日益明确<sup>[15-17]</sup>,显示出菲牛蛭在治疗疾病领域巨大的潜在利用价值与开发前景。

目前,菲牛蛭的毒理学相关研究较少,仅见急性毒性研究的报道,其结果表明菲牛蛭冻干粉的氨基酸含量较高、有害元素及农药残留量较低、急性毒性试验也未见明显毒副作用<sup>[18]</sup>,结合后续冷冻干燥、清水吊干等低温处理方式能够较为有效地保留菲牛蛭抗凝活性的报道<sup>[10-11]</sup>,菲牛蛭冻干粉确为较合理的使用形式,其长期毒性值得深入研究。因此,本项目组开展了菲牛蛭冻干粉重复给药的毒理学研究。结果显示,经口重复给予菲牛蛭冻干粉的试验条件下,SD大鼠每周连续灌胃给药6d,给药周期6个月,末次给药后恢复8周,其一般状态观察,包括临床状态、体重、摄食量未见与供试品相关的明显异常。其次,无SD大鼠死亡现象。尿检、血液学、生化检验、血凝、电解质等临床指标检测结果显示偶见个别指标波动变化,变化趋势无明显的组别和剂量依赖性,其余同样未见异常。同时,据我们对SD大鼠长期给予菲牛蛭冻干粉给药结束后2天以及恢复期结束后1天的组织病理学结果显示,供试品组个别脏器见轻度出血,其余脏器产生的组织病理学改变无明显的组别或剂量依赖性,未见由供试品引起的异常改变。

综上所述,本试验研究条件下,菲牛蛭冻干粉未见明显的毒性反应作用。该研究结果对菲牛蛭冻干粉今后的药理学、毒理学研究,药用安全性、以及临床研究提供了价值参考与科学依据。

#### 参考文献:

- [1] STEINER V, KNECHT R, BÖRNSSEN KO, et al. Primary structure and function of novel O-glycosylated hirudins from the leech *Hirudinariananillensis* [J]. *Biochemistry*, 1992, 31(8): 2294-2298.
- [2] 黄爱民, 黎肇炎, 廖共山, 等. 广西菲牛蛭消化液中抗凝物质的分离纯化 [J]. *中国生化药物杂志*, 2006(05): 273-276.
- [3] 方富永, 苗艳丽, 苏舒华, 等. 双水相萃取-凝胶色谱联用法提取菲牛蛭中的水蛭素 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(07): 489-494.
- [4] 过立农, 刘杰, 杨宝, 等. 基于分子生物学特异性扩增的方法鉴别菲牛蛭 [J]. *中国药事*, 2018, 32(9): 1239-1243.
- [5] 韦桂丽, 王硕, 周小雷, 等. 菲牛蛭的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2018, 34(10): 1496-1498.
- [6] 孙雨, 王宇维, 刘锦瑜, 等. 水蛭抗凝血活性物质分析及水蛭素提取纯化的研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2021, 11(15): 30-33.
- [7] 吴志军, 于立华. 菲牛蛭及其制品的抗血栓、溶血栓作用 [J]. *中成药*, 2007, 29(4): 591-594.
- [8] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮药质量标准(第二卷) [M]. 广西: 广西科学技术出版社, 2011: 238-240.
- [9] 云 YNZYC-0357-2013. 菲牛蛭药材标准 [S]. 云南: 云南省食品药品监督管理局, 2013.
- [10] 钟苗, 雷艳, 李尹, 等. 宽体金钱蛭与菲牛蛭不同炮制品体内抗凝活性研究 [J]. *中药材*, 2020, 43(06): 1351-1353.
- [11] 钟苗, 雷艳, 谭赫, 等. 水提取法和仿生提取法研究菲牛蛭不同炮制品的体外抗凝活性 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(03): 379-383.
- [12] 姜秋, 王玲娜, 刘谦, 等. 水蛭的炮制历史沿革、化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(21): 5806

-5816.

- [13] 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[J],国家药品监督管理局药品审评中心,2007.
- [14] 张卫,张瑞贤,李健,等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(06):914-918.
- [15] 李阳,顾福根,郭桃桃,等. 菲牛蛭抗凝提取物活性成分的研究[J]. 中药材,2021,44(12):2850-2855.
- [16] 谭赫,侯觉文,单宇,等. 水提法和仿生提取法研究菲牛蛭及其炮制品的抗血栓活性[J]. 中国药师,2019,22(05):814-818.
- [17] 陈琛,戚敏,杨秀娟. 菲牛蛭体成分和养殖技术的研究进展[J]. 饲料工业,2021,42(20):59-64.
- [18] 吴志军,于立华. 菲牛蛭成分与急性毒性试验研究[J]. 中成药,2006(11):1625-1627.

## Repeated administration toxicity study of freeze-dried powder of *Poecilobdellamanillensis*

ZHANG Yuan-jie<sup>1</sup>, ZHANG Cai-xing<sup>2</sup>, LI Cong<sup>2</sup>, YANG Jin-ling<sup>2</sup>, PI Na<sup>2</sup>,  
NIU Ting-ting<sup>2</sup>, WANG Qi-yan<sup>2</sup>, JIANG Qing-fang<sup>2</sup>, LI Yun<sup>2</sup>,  
DUAN Hong-yu<sup>3</sup>, FAN Sheng-tao<sup>2</sup>, LAI Guo-fang<sup>1</sup>

- (1. Public Service Platform for Industrial Technology Foundation of the Ministry of Industry and Information Technology, Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106, China;  
2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650031, China;  
3. Yunnan Hairuidi Biological Pharmaceutical Limited Company, Baoshan 678000, China)

**Abstract:** In order to provide scientific evidences for the medicinal safety of freeze-dried powder of *Poecilobdellamanillensis*, repeated administration toxicity tests were taken and the toxic reaction and the severity of toxicity reaction produced in SD rats were observed. The SD rats were randomly assigned to solvent control group (sterile water for injection), high, medium and low doses groups (3.24, 1.08 and 0.54 g · kg<sup>-1</sup>). The dose concentration was 205.5, 67.5 and 33.75 mg · mL<sup>-1</sup> and the administered volume was calculated as weekly body weight. All SD rats were administered 6 days weekly for six months, and recovered for 8 weeks after the last administration. Then we detected SD rats' clinical index, organ weighing, hematological examination, serum biochemical examination and histopathological examination to evaluate toxicological safety. The results showed that no toxicity changes related to the testing were found for each index after 6 months of continuous administration in SD rats. In the conditions of this experiment, SD rats were treated with high, medium, and low doses of freeze-dried powder of *Poecilobdellamanillensis*, no significant toxic effects were observed.

**Key words:** freeze-dried powder of *Poecilobdellamanillensis*; SD rats; repeated administration toxicity

(责任编辑 王煜丹)