

一种抗猪流行性腹泻的中药复方制剂的亚慢性毒性试验

洪伟鸣¹, 徐懿², 宋亮¹, 陈海峰¹, 吉光杰¹, 左伟勇^{1*}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省泰州市海陵区兽医站, 江苏泰州 225300)

摘要 [目的]为了观察一种抗猪流行性腹泻病的中药复方制剂的亚慢性毒性。[方法]根据《兽药试验技术规范汇编》中的亚慢性毒性试验技术要求;选用小白鼠进行了亚慢性毒性研究。[结果]试验组与空白对照组实验数据相比差异不显著($P>0.05$),表明该复方制剂对小鼠血常规检查和血液生化指标检测没有造成任何不良影响。[结论]临床使用该复方制剂进行治疗安全可靠。

关键词 猪流行性腹泻;中药复方制剂;小鼠;亚慢性毒性

中图分类号 S858.28 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)31-0074-03

Study on Subchronic Toxicity Test of a Traditional Chinese Medicine Compound Preparation against Porcine Epidemic Diarrhea
HONG Wei-ming¹, XU Yi², SONG Liang¹ et al (1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals Drug, Taizhou, Jiangsu 225300; 2. Hailing District Veterinary Station in Taizhou City of Jiangsu Province, Taizhou, Jiangsu 225300)

Key words [Objective] To study subchronic toxicity of one traditional Chinese medicine compound preparation against porcine epidemic diarrhea. [Method] According to the technical requirements of subchronic toxicity test in the Compilation of Technical Specifications for Veterinary Drug Testing, the subchronic toxicity of mice was studied. [Result] There was no significant difference ($P<0.05$) between data of the experimental group and the blank control group. The results showed that the compound preparation had no adverse effect on blood routine examination and blood biochemical index test in mice. [Conclusion] The traditional Chinese medicine compound preparation can be safely used for clinical application.

Key words Porcine epidemic diarrhea; Traditional Chinese medicine compound preparation; Mouse; Subchronic toxicity test

猪流行性腹泻(PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起的急性、接触性、高度传染性的一种消化道疾病,是危害养猪产业最重要的传染病之一。该病临床主要症状表现为急性肠炎以及呕吐、水样腹泻和脱水。PED的波及范围甚广,在全球均有病例报道。并且PED发病率高,各种年龄的猪都能感染发病,7日龄以下仔猪感染死亡率可高达80%~100%^[1]。PED的频发给我国养猪产业造成了严重的经济损失^[2]。

由于PEDV具有高度的变异性,给临床治疗带来了很大困难。目前市面上预防PED主要是依靠PED弱毒苗和灭活苗^[3]。治疗PEDV的药物以西药为主,虽可缓解病情和降低死亡率,但极易引起致病病毒变异而导致产生耐药性,并存在动物体内药物残留等隐患^[4]。因此,开展抗PEDV药物的研发对控制猪流行性腹泻病、促进养猪产业的健康发展有着十分重要的意义。随着市场上人们对绿色、安全畜产品的需求越来越高,中药作为化学药物的替代品用于防治畜禽疾病愈获得了大家的肯定。该研究用药物为江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室研制的一种用于防治猪流行性腹泻病的纯中药复方制剂,为全面评价其安全性和为临床安全科学用药提供依据,根据农业部《兽药试验技术规范汇编》的技术要求^[5],进行了亚慢性毒性试验研究。同时,也为后续深入探讨该复方制剂在临床上的推广应用研究提供科学依据和支撑。

1 材料与方法

1.1 试验动物 清洁级昆明系小白鼠80只,雌雄各半,体重 20 ± 2 g,购自江苏省扬州大学比较医学中心[动物生产许可证号:SYXK(苏)2015000003]。

1.2 试验药物 抗猪流行性腹泻的中药复方制剂由黄连、白头翁等10味中药精制而成,浓缩至1 mL药液相当于1 g药材。由江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室自行研制。

1.3 仪器 全自动血液细胞分析仪(BC-5380,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);全自动生化分析仪(BS-420,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);光学显微镜(BX53,日本OLYMPUS公司);电子天平(MS204S,梅特勒托利多公司)。

1.4 动物分组及处理 将小白鼠随机分成四组,即低剂量组、中剂量组、高剂量组和空白对照组,每组20只,雌雄各半,进行适应性饲养后开展试验。根据预试验的剂量,低、中、高3个剂量组分别按0.01、0.02、0.04 mL/g 3个不同剂量给药,空白对照组按0.04 mL/g给予生理盐水。药物及生理盐水均事先拌于饲料中并烘干制作成型,任由实验动物采食,连续给药28 d。每天仔细观察小鼠的活动、采食、饮水、发病和死亡等情况,对小鼠进行空腹称重,计算增重,给药结束后对存活小鼠进行血常规和血液生化学指标检测,随后统一剖杀观察主要脏器是否存在病变或其他异常^[5]。

1.5 检测项目

1.5.1 血常规检查 摘除小鼠眼球进行采血,利用全自动血液细胞分析仪测定红细胞数、白细胞数、血小板数、血红蛋白浓度、红细胞压积、血小板压积和淋巴细胞数。

基金项目 江苏省2017年度高校优秀科技创新团队项目和江苏农牧科技职业学院院级课题(NSFPT201832、NSFPT201715)。

作者简介 洪伟鸣(1981—),男,江苏泰州人,副教授,硕士,从事兽用生物药物的研发工作。*通讯作者,教授,硕士生导师,从事动物生理生化研究。

收稿日期 2018-05-29

1.5.2 血液生化学检测 采血分离出血清后利用全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、总蛋白、白蛋白、球蛋白、尿素氮、肌酐和血糖含量。

1.5.3 脏器系数及组织病理学检查 对存活小鼠进行统一剖检,测定心、肝、脾、肺、肾等脏器的绝对重量及脏器系数(脏器系数=脏器湿重/体重 \times 100),同时选择性的对肝、肾、脾、胃肠等器官进行目检,记录异常或脏器病变情况。

1.6 数据统计分析 试验数据以平均数 \pm 标准差表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析及 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 临床表现 整个试验过程中 3 个给药组与空白对照组的小鼠均未出现死亡,采食和饮水均正常,活动自如,呈现健康状态。

2.2 体重变化情况 如表 1 所示,从第 7 天起至 28 天空白对照组小鼠体重均略低于 3 个试验组,但整个试验周期内各试验组与空白对照组相比小鼠体重差异均不显著($P>0.05$)。

),各试验组间体重比较也无显著差异($P>0.05$),由此可说明该复方制剂对小鼠的体重影响甚微。

表 1 抗猪流行性腹泻的中药复方制剂对小鼠的体重变化影响
Table 1 Effects of traditional Chinese medicine compound preparation against porcine epidemic diarrhea on weight of mice g

时间 Time//d	低剂量 Low dose	中剂量 Middle dose	高剂量 High dose	空白对照 Blank
0	18.54 \pm 0.29	18.38 \pm 0.26	18.40 \pm 0.37	18.42 \pm 0.33
7	25.77 \pm 0.90	25.94 \pm 0.87	25.90 \pm 1.03	25.48 \pm 0.72
14	29.64 \pm 1.23	30.19 \pm 1.04	30.22 \pm 1.28	28.97 \pm 1.18
21	31.90 \pm 1.38	32.34 \pm 1.50	32.28 \pm 1.59	31.04 \pm 1.54
28	34.81 \pm 1.65	35.32 \pm 1.85	35.01 \pm 2.14	33.97 \pm 2.03

2.3 血常规检查情况 血常规检查结果显示如表 2 所示,空白对照组白细胞数略高于 3 个试验组,但统计分析差异不显著($P>0.05$)。其余各个检测指标低、中、高 3 个剂量组与空白对照组相比差异均不显著($P>0.05$)。由此可说明该复方制剂对小鼠血常规检查的各项指标未带来不良影响。

表 2 抗猪流行性腹泻的中药复方制剂对小鼠血常规检查指标的影响

Table 2 Effects of traditional Chinese medicine compound preparation against porcine epidemic diarrhea on blood routine examination index of mice

处理 Treatment	红细胞数 Red cell number $10^{12}/L$	白细胞数 White cell number/ $10^9/L$	血小板数 Platelet count $10^9/L$	血红蛋白浓度 Hemoglobin concentration/ g/L	红细胞压积 Hematocrit L/L	血小板压积 Thrombocytocrit L/L	淋巴细胞 Leukomonocyte %
低剂量 Low dose	10.02 \pm 1.05	7.98 \pm 0.76	898 \pm 147	120.5 \pm 11.9	0.46 \pm 0.03	0.47 \pm 0.05	73.8 \pm 5.7
中剂量 Middle dose	9.94 \pm 0.92	7.73 \pm 0.80	908 \pm 176	135.2 \pm 13.3	0.47 \pm 0.05	0.49 \pm 0.03	80.5 \pm 6.3
高剂量 High dose	10.17 \pm 1.08	8.16 \pm 0.90	973 \pm 180	130.8 \pm 12.1	0.50 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05	77.4 \pm 4.9
空白对照 Blank	10.13 \pm 0.98	8.22 \pm 0.71	945 \pm 137	127.6 \pm 12.2	0.49 \pm 0.04	0.50 \pm 0.04	79.7 \pm 5.1

2.4 血液生化学检测情况 血液生化学检测结果如表 3 所示,结果显示空白对照组的总蛋白与血糖含量略低于 3 个试验组,但结果统计分析差异不显著($P>0.05$)。其余各个检

测指标各试验组测定结果与空白对照组测定结果相比差异均不显著($P>0.05$),由此可说明该复方制剂对小鼠血液生化学检测指标未造成不良影响。

表 3 抗猪流行性腹泻的中药复方制剂对小鼠血液生化学检测指标的影响

Table 3 Effects of traditional Chinese medicine compound preparation against porcine epidemic diarrhea on blood biochemical indicators of mice

处理 Treatment	谷丙转氨酶 Glutamic-pyruvic transaminase U/L	谷草转氨酶 Glutamic-oxalacetic transaminase U/L	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase U/L	总蛋白 Total protein g/L	白蛋白 Albumin g/L	白蛋白/球蛋白 Albumin/ globin	尿素氮 Urea nitrogen mmol/L	肌酐 Creatinine μ mol/L	血糖 Blood sugar mmol/L
低剂量 Low dose	51.3 \pm 20.2	121.5 \pm 27.6	79.6 \pm 15.1	50.3 \pm 3.7	29.8 \pm 2.4	1.56 \pm 0.09	7.58 \pm 0.88	29 \pm 3	5.62 \pm 1.11
中剂量 Middle dose	49.5 \pm 21.7	117.9 \pm 25.5	88.2 \pm 17.4	50.9 \pm 3.4	31.1 \pm 3.0	1.59 \pm 0.05	8.00 \pm 1.01	33 \pm 3	5.70 \pm 0.74
高剂量 High dose	52.6 \pm 19.4	123.0 \pm 24.2	85.1 \pm 13.8	52.2 \pm 4.5	30.7 \pm 2.8	1.52 \pm 0.12	8.14 \pm 0.77	31 \pm 4	5.97 \pm 1.03
空白对照 Blank	50.8 \pm 22.1	120.4 \pm 22.8	81.9 \pm 16.2	49.7 \pm 4.1	30.8 \pm 2.2	1.57 \pm 0.11	8.06 \pm 1.07	30 \pm 3	5.47 \pm 0.82

2.5 脏器系数 试验结束时统一剖杀小鼠测定心脏、肝脏、肾脏等主要脏器的绝对重量,测出脏器系数,结果见表 4。从表中结果可见,3 个试验组与空白对照组的脏器系数相比较差异均不显著($P>0.05$)。各组的脏器系数均在正常值范围内,据此可说明该复方制剂对小鼠的主要脏器系数未造成不良影响。

2.6 组织病理学检查情况 随机挑选各试验组 10 只小鼠进行统一剖检,仔细观察该复方制剂有无对小鼠内脏器官造成不良影响。观察后未见肝脏、肾脏、脾脏、胃和肠等器官

组织的形态、颜色、质地出现异常,组织病理学检查亦未见脏器发生病理异常变化。由此可说明该复方制剂未对小鼠的内脏器官造成不良影响。

3 讨论

亚慢性毒性试验是评价新兽药一般毒性的重要内容,对后续临床安全合理用药甚为关键。试验研究结果表明,该复方制剂分别按 0.01、0.02、0.04 mL/g 等 3 个不同剂量进行连续给药 28 d,研究结果表明 3 个试验组小鼠在整个试验周期内均生长正常,活动自如,体重变化、血常规检查、血液生化

表4 抗猪流行性腹泻的中药复方制剂对小鼠脏器系数的影响

Table 4 Effects of traditional Chinese medicine compound preparation against porcine epidemic diarrhea on organ coefficient of mice

处理 Treatment	心脏 Heart	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肺脏 Lung	肾脏 Kidney
低剂量 Low dose	0.44±0.04	5.22±0.15	0.33±0.03	0.68±0.08	1.05±0.09
中剂量 Middle dose	0.46±0.04	5.30±0.21	0.37±0.02	0.67±0.11	1.11±0.10
高剂量 High dose	0.47±0.05	5.29±0.13	0.32±0.03	0.71±0.09	1.06±0.09
空白对照 Blank	0.46±0.05	5.28±0.19	0.35±0.03	0.70±0.06	1.09±0.08

学检测、脏器系数、组织病理学检查与空白对照组相比均无显著差异 ($P>0.05$)。有研究报道表明如若动物的肝功能或肾功能受到损伤,血液中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)或肌酐(CR)会显著升高^[6-7],而上述3个指标在该试验研究中均处于正常值范围内。

故可认为按临床推荐剂量使用该复方制剂治疗猪流行性腹泻病是安全可靠的,同时也为后续将该制剂开发为新兽药奠定了扎实的基础。

参考文献

[1] 高君恺,刘浩飞,杨倩.猪流行性腹泻病毒的研究进展[J].南京农业大学学报,2014,37(1):1-5.

- [2] CHEN J F, WANG C B, SHI H Y, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China [J]. Arch Virol, 2010, 155 (9): 1471-1476.
- [3] 张冰,关增春,于晓娜,等.猪流行性腹泻预防及诊断研究进展[J].湖北畜牧兽医,2014,35(9):84-86.
- [4] 李彬,刘浩飞,孙冰,等.猪流行性腹泻病毒 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立与应用[J].江苏农业学报,2014,30(1):125-129.
- [5] 农业部兽药审评委员会办公室.兽药试验技术规范汇编[S].北京:农业部兽药审评委员会办公室,2001.
- [6] 洪伟鸣,左伟勇,宋亮,等.鸡支原体液亚慢性毒性试验研究[J].中国畜牧兽医,2013,40(9):140-143.
- [7] 王越,沈连忠,李波.临床前研究中肝损伤的临床病理指标的选择及意义[J].中国药事,2009,23(8):813-816.
- [8] 任丽,蒋素华,刘红,等.肌酐水平、MDRD-GFR、CG-GFR 与肾小管间质病变相关性研究[J].检验医学与临床,2010,7(22):2436-2438.

(上接第55页)

(3) 成熟期,土壤中的有效态镉直接影响水稻对镉的吸收量,其中以纳米螯合铁肥能够有效阻隔镉向稻米中迁移。

参考文献

- [1] 唐绍清.稻米蒸煮和营养品质性状的 QTL 定位[D].杭州:浙江大学,2007.
- [2] 吴燕玉,陈涛,张学询.沈阳张士灌区镉污染生态的研究[J].生态学报,1989,9(1):21-26.
- [3] 环境保护部,国土资源部.全国土壤污染状况调查公报[J].中国环境报,2014(5):10-11.
- [4] 方琳娜,方正,钟豫.土壤重金属镉污染状况及其防治措施:以湖南省为例[J].现代农业科技,2016(7):212-213.
- [5] 时雷雷,傅声雷.土壤生物多样性研究:历史、现状与挑战[J].科学通报,2014,59(6):493-509.
- [6] BRIM H, HEUER H, KRÖGERRECKLENFORT E, et al. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil [J]. Canadian journal of microbiology, 1999, 45(4):326-338.
- [7] BROOKES P C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals [J]. Biology and fertility of soils, 1995, 19(4):269-279.
- [8] PÉREZ-DE-MORA A, BURGOS P, MADEJÓN E, et al. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: Effects of plant growth and different amendments [J]. Soil biology & biochemistry, 2006, 38(2):327-341.
- [9] 滕应,黄昌勇.重金属污染土壤的微生物生态效应及其修复研究进展[J].生态环境学报,2002,11(1):85-89.
- [10] 李小林,颜森,张小平,等.铅锌矿区重金属污染对微生物数量及放线菌群落结构的影响[J].农业环境科学学报,2011,30(3):468-475.
- [11] TESSIER A, CAMPBELL P G C, BISSON M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. Analytical chemistry, 1979, 51(7):844-851.
- [12] CUI H B, ZHOU J, ZHAO Q G, et al. Fractions of Cu, Cd, and enzyme activities in a contaminated soil as affected by applications of micro- and nano-hydroxyapatite [J]. Journal of soils & sediments, 2013, 13(4):742-752.
- [13] 张会民,徐明岗,吕家珑,等. pH 对土壤及其组分吸附和解吸镉的影响研究进展[J].农业环境科学学报,2005,24(z1):320-324.

- [14] 陈晓婷,王果,张潮海,等.石灰泥炭对镉铅锌污染土壤上小白菜生长和元素吸收的影响[J].土壤与环境,2002,11(1):17-21.
- [15] 郭利敏,艾绍英,唐明灯,等.不同改良剂对土壤-叶菜系统 Cd 迁移累积的调控作用[J].农业环境科学学报,2010,29(8):1520-1525.
- [16] 文星,李明德,吴海勇,等.土壤改良剂对酸性水稻土 pH 值、交换性钙镁及有效磷的影响[J].农业现代化研究,2014,35(5):618-623.
- [17] 陈喆,铁柏清,刘孝利,等.改良-农艺综合措施对水稻吸收积累镉的影响[J].农业环境科学学报,2013,32(7):1302-1308.
- [18] 黄蔼霞,许超,吴启堂,等.赤泥对重金属污染土壤修复效果及其评价[J].水土保持学报,2012,26(1):267-272.
- [19] 栗丽,洪坚平,谢英荷,等.生物菌肥对采煤塌陷垦土土壤生物活性及盆栽油菜产量和品质的影响[J].中国生态农业学报,2010,18(5):939-944.
- [20] 徐志峰,王旭辉,丁亚欣,等.生物菌肥在农业生产中的应用[J].现代农业科技,2010(5):269-270.
- [21] 曹国军,李三元,胡永平,等.微生物肥料对水稻产量及其构成因子的影响[J].农技服务,2011,28(8):1138-1139.
- [22] 应娇妍,袁红莉,李宝珍.一株茎点霉菌的抗镉机制[J].中国环境科学,2003,23(6):575-578.
- [23] 郭利敏,艾绍英,唐明灯,等.碱渣对土壤中镉有效性的影响[J].环境科学与技术,2011,34(4):100-103.
- [24] 胡坤,喻华,冯文强,等.淹水条件下不同中微量元素及有益元素对土壤 pH 和 Cd 有效性的影响[J].西南农业学报,2010,23(4):1188-1193.
- [25] 何雨帆,刘宝庆,白厚义,等.腐殖酸对污染土壤中镉解吸的影响[J].广西农学报,2006,21(5):1-3.
- [26] 于洋,罗盛旭,肖钰杰,等.富硒土壤-蔬菜中硒、镉含量和镉形态的分布及其相关性[J].环境化学,2015,34(4):798-800.
- [27] 杨静,谭永锋,肖志强,等.不同剂量石灰对酸化稻田土壤养分含量及水稻产量的影响[J].安徽农业科学,2015,43(36):175-176,179.
- [28] 张淼,叶长城,喻理,等.矿物硅肥与微生物菌剂对水稻吸收积累镉的影响[J].农业环境科学学报,2016,35(4):627-633.
- [29] 张沁怡,李文蔚,阳晶,等.腐殖酸对水稻剑叶光合特性、必需元素和产量的影响及其相关性研究[J].云南农业大学学报,2015,30(2):185-191.