

富硒大蒜对犬连续口服给药12周的长期毒性试验研究

林 飞/梁 恽/吕 廉/陈 珍/
高凤鸣/杨文婕/韩文海

(中国药品生物制品检定所 北京 100050)

Long-term(12-week)Toxicity Test on Dogs with Selenium-enriched garlic

LIN Fei, LIANG Yi, LÜ Lian, CHEN Zhen,
GAO Feng-ming, YANG Wen-jie, HAN Wen-hai
(National Institute for Control of Pharmaceutical and
Biological Products, Beijing 100050, China)

【摘要】背景与目的：研究富硒大蒜连续给药后对犬的毒性反应。 材料与方法：采用 Beagle 犬 24 只，随机分为给予富硒大蒜不同剂量的 3 个给药组 (3.00 g/kg、1.50 g/kg 和 0.75 g/kg) 和 1 个对照组 (不服用富硒大蒜)，连续口服给药 12 周，停药后观察 2 周，实验期间进行一般症状观察，检查血象、生化、心电图、尿液等，动物处死后计算脏器系数和并进行组织病理学检查。 结果：给药期高剂量组的犬间断性出现呕吐，且摄食量减少，血清总胆红素明显升高，白蛋白降低，胸腺和脾脏的系数值有一定升高。除中剂量组给药期总胆红素升高外 ($P < 0.01$)，其余各剂量组各期间的各检测指标与对照组间的差异均无统计学意义，各组犬给药期和停药恢复期未见其它的毒性反应。 结论：富硒大蒜在相当于临床人拟用量 30 倍下，仅出现轻度消化道刺激症状和血清总胆红素数值的升高。犬用药的无明显毒性反应剂量为 0.75 g/kg。

【关键词】富硒大蒜；Beagle 犬；长期毒性；消化道刺激；总胆红素

中图分类号：R965.3

文献标识码：A

文章编号：1004-616X(2008)03-0208-04

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To evaluate the toxic reactions and severity in dogs fed continuously with selenium-enriched garlic. MATERIALS AND METHODS: Wistar dogs were divided into four groups (3.00 g/kg, 1.50 g/kg, 0.75 g/kg and a solvent control), fed continually for 12 weeks and observed for 2 weeks after stopping the medicine. General condition, haematology and biochemical tests, electrocardiogram, urine test, visceral dissection and coefficient and histopathology were performed. RESULTS: Dogs in the high dose group vomited intermittently, and appetite was decreased. Serum total bilirubin was obviously increased, the albumin lowered, the coefficients of thymus gland and spleen went up. No other toxics reactions were observed. CONCLUSION: The selenium-enriched garlic was a mild alimentary tract stimulant with obvious increase in the serum total bilirubin, at 30 times the clinical dose. The dose of 0.75 g/kg in dogs had no obvious toxicity reaction.

【KEY WORDS】selenium-enriched garlic; Beagle dog; long-term toxicity; alimentary tract stimulant; total bilirubin

大蒜 (*Allium sativum* L.) 属百合科植物，在硒累积到一定量后称为富硒大蒜。目前认为大蒜在防癌、抗癌方面具有一定的药用功能，硒类化合物具有抗肿瘤活性作用，而富硒大蒜能够增强防癌、抗癌作用，降低硒在体内的毒、副反应，是目前研究的一个热点^[1-4]。为了考察富硒大蒜长期服用对机体的影响，本文使用 Beagle 犬连

续给药 12 周，观察由于积蓄而对机体产生的毒性反应及其严重程度，提供毒性反应的靶器官，确定无毒反应剂量。

1 材料与方法

1.1 受试药物

收稿日期：2008-01-04；修订日期：2008-03-20

基金项目：国家自然科学基金(30471454)

作者简介：林 飞(1954-)，男，北京市人，研究员，研究方向：药物安全性评价，Tel: 010-67095576, E-mail: linfeibj@yahoo.com.cn

富硒大蒜粉,由鲜蒜粉碎后冷冻干燥制成,纯度100%,每千克原料药粉中含硒量60 mg,塑料袋双层密闭包装,每袋1 000 g,由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所提供,批号040322。本实验室4℃冰箱保存。试验时直接称取150 g原料药粉,加水至600 ml,搅拌均匀的混悬液后,以每千克体重6 ml混悬液加入熟牛肉馅中喂食。

1.2 实验动物

纯种Beagle犬24只,雌雄各半,质量合格证书为:沪动合格证字第118号,月龄6~8个月,体重7~8 kg,由上海市新冈实验动物场提供。犬在本所实验动物室饲养观察1周后,开始正常体检,并根据体检结果进行分组、编号,再进行给药前体检。每组动物6只,分笼喂养,每笼1只。每天定时、定量喂食2次,每日上午给予150 g、下午给予200 g犬用膨化颗粒饲料(北京科澳协力饲料有限公司生产),饮水不限。

1.3 实验动物室

实验犬房为自然采光,温度18~22℃,相对湿度40%~50%。笼具为不锈钢,笼的体积为100 cm×90 cm×80 cm。

1.4 预实验

采用胃管插入一次灌胃给药,在空腹或进食后给药剂量>1.5 g/kg时,犬在2~5 min出现剧烈的恶心、呕吐,呕吐物为全部药液和少量胃液。采用自然摄入量经过数次小剂量药粉拌入饲料的训练,大部分犬对药粉的气味和刺激性有了一定的适应。将能够摄食药粉的犬以每千克体重给予6 ml混悬液,加入到熟牛肉馅中搅拌均匀后喂食,给富硒大蒜粉剂量达1.5 g/kg。给药后犬未见明显的毒性反应和消化道刺激反应。

1.5 正式实验

实验分为富硒大蒜高、中、低剂量组和对照组。高剂量组:富硒大蒜粉3.00 g/(kg·d)相当于人临床拟用量[0.1 g/(kg·d)]的30倍。中剂量组1.50 g/(kg·d)。低剂量组0.75 g/(kg·d)。对照组给予等量不拌药粉的熟牛肉馅。

每日口服给药为高剂量组2次,中、低剂量组1次。每周给药6 d,连续给药6周(中期)和12周(后期)及停药2周(恢复期)。每周根据各犬体重增长情况调整给药量,每日喂食前先给予拌有药粉混悬液的熟牛肉馅,待全部摄入后,再给予定量的饲料。

1.6 观察指标

1.6.1 一般状况 每日观察犬的精神、行为、活动、吠叫、被毛、粪便、饲料摄入、饮水、呕吐物及量和其它出现的异常症状和体征等情况。

1.6.2 体重 每周称取实验犬体重,并统计各组犬的平均体重。

1.6.3 血液学检查 给药前期、中期、后期和恢复期分别取血液,测定红细胞数(RBC)、白细胞数(WBC)、血红蛋白浓度(HGB)、血球压积(HCT)、血小板数(PLT)、白细胞分类的粒(G)、淋巴(L)和单核(M)细胞及凝血时间(CT)。

1.6.4 血清生物化学检查 将上述4个实验期犬的静脉血液分离血清进行生物化学检查,包括:总胆红素(Bil)、葡萄糖(Glu)、肌酐(Cre)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(Tch)、碱性磷酸酶(ALP)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)等10项。

1.6.5 尿液常规检查 上述4个实验期取犬尿液测定pH、亚硝酸盐(Nit)、葡萄糖(Glu)、比重(SG)、隐血(Bld)、蛋白质(Pro)、尿胆红素(Bil)、尿胆素原(Uro)、酮体(Ket)和白细胞数(WBC)等10项。

1.6.6 心电图检查 上述4个实验期进行犬标准II导联检查,测定R—R间期、P—R间期、Q—T间期、S—T段和T波,并计算心率(HR)。

1.6.7 尸体解剖和脏器系数 给药后期和恢复期麻醉犬经股动、静脉放血处死后,解剖各组织器官,肉眼观察有否病态变化,并分离、剪取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、甲状腺、前列腺、睾丸、子宫(连卵巢)和脑(包括大脑、小脑和延髓)分别称重后,计算各脏器系数。

1.6.8 组织病理学检查 给药后期和恢复期犬除取1.6.7中所述的14种器官外,再取胸骨、胸腺、胰腺、食道、胃、十二指肠、回肠、结肠、膀胱、附睾、垂体和淋巴结等12种器官,经10%福尔马林液固定后,常规染色,显微镜下进行病理组织学检查。

1.7 统计学方法

体重、血液学、血清生物化学、心电图、尿液常规和脏器系数分别列表,以组为单位计算平均值和标准差($\bar{x} \pm s$),经与本室正常数值比较后,再用t检验进行对照组与各给药组间数值差异的显著性检验分析,判定P值。

2 结 果

2.1 一般状况

对照组和给药中、低剂量组犬的各项指标基本正常。高剂量组个别犬在摄入过快时出现呕吐,呕吐量不大,粪便粘性大、不易冲洗,给药中、后期2只雌犬时常剩有饲料,在出笼活动40~60 min后能够摄食剩余饲料,未见体表的粘膜、皮肤和眼巩膜黄染等其它异常症状和体征。



2.2 体重增长

对照组和给药各剂量组在给药前期、给药期和恢复期各周体重增长基本正常,同一周次对照组与给药各剂量组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 血液学检查

表 1 富硒大蒜给药后期对犬血液学的观察($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Hematology indexes of dogs after giving selenium enriched garlic($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Groups(g/kg)	WBC($10^9/L$)	RBC($10^{12}/L$)	HGB(g/L)	HCT(%)	PLT($10^9/L$)	CTS	L(%)	M(%)	G(%)
0	14.3±1.3	6.02±0.49	141.8±11.1	40.9±2.1	230.5±40.2	41.3±6.1	31.6±5.0	2.0±0.8	66.4±5.6
0.75	14.1±2.1	5.59±0.37	131.3±9.2	39.1±1.5	238.2±31.9	43.0±9.1	30.4±4.0	2.2±0.9	67.4±4.3
1.50	13.3±1.3	5.69±0.54	132.7±10.9	41.4±2.7	235.0±33.0	42.0±4.3	30.2±2.4	2.7±1.2	67.1±3.2
3.00	14.0±2.4	5.73±0.38	140.3±4.5	37.5±2.5*	294.7±48.5	43.3±6.9	31.6±4.2	2.3±0.7	66.2±4.4

Compared with 0 group, * $P < 0.05$

2.4 血清生物化学检查

给药各期对照组和给药各剂量组的血清生化指标除总胆红素(Bil)外,基本在正常范围内。与对照组比较,给药中期高、中剂量组的总胆红素(Bil)有明显升

高;给药后期高剂量组的总胆红素(Bil)有明显升高,白蛋白(ALB)有一定降低,中剂量组的总胆红素(Bil)有较明显升高,其差异具有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 2。

表 2 富硒大蒜给药后期对犬生化学的观察($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Bio-chemical indexes of dogs after giving selenium enriched garlic($\bar{x} \pm s$)

Groups(g/kg)	ALT(u/L)	AST(u/L)	ALP(u/L)	Bil($\mu\text{mol/L}$)	Cre($\mu\text{mol/L}$)	BUN(mmol/L)	Cho(mmol/L)	Glu(mmol/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
0	37.5±5.2	39.3±6.9	69.0±31.0	2.3±1.4	91.9±7.0	5.4±1.2	3.69±0.60	3.6±0.4	67.9±5.06	27.9±1.32
0.75	37.2±6.5	39.2±9.0	63.2±21.6	2.6±1.0	93.9±12.7	5.3±1.0	3.62±0.57	3.6±0.6	7.3±4.47	7.4±0.82
1.50	46.2±9.1	41.3±7.8	66.3±17.1	6.4±1.7**	82.0±2.9**	4.7±0.7	3.39±0.21	3.1±0.7	0.0±6.06	6.9±0.72
3.00	37.7±9.8	37.8±6.0	61.2±27.2	8.1±2.5**	84.2±7.7	6.3±1.4	3.71±0.61	3.0±0.8	6.1±5.1	5.5±0.6**

Compared with 0 group, ** $P < 0.01$

2.5 心电图检查

给药各期对照组和给药各剂量组每条犬的标准 II 导联数值基本在正常范围内。各剂量组各项指标与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

对照组和各剂量组每条犬的尿液常规 10 项数值基本在正常值范围内。个别犬尿液葡萄糖(Glu)、隐血(Bld)、蛋白质(Pro)、尿胆红素(Bil)和白细胞数(WBC)等指标呈“±”和“+”。详见表 3。

2.6 尿液常规检查

表 3 富硒大蒜给药后期对犬尿液的观察($n = 6$)

Table 3 Urine indexes of dogs after giving selenium enriched garlic

Groups(g/kg)	pH	Nit	Glu(mmol/L)	SG	Bld(cell/ μl)	Pro(g/L)	Bil(g/L)	Uro(mmol/L)	Ket(mmol/L)	WBC(cell/ μl)
0	7.5±0.7	-~+	0	1.026±0.005	26.7±41.3	0.2±0.2	9.2±6.0	0	0	0
0.75	7.7±0.6	-~+	0	1.022±0.005	13.3±32.7	0.3±0.3	2.8±4.4	0	0	28.3±33.0
1.50	7.5±0.7	-~+	0	1.023±0.004	19.2±31.4	0.2±0.1	2.8±4.4	2.8±6.9	0	21.7±24.4
3.00	7.8±0.7	-~+	0	1.023±0.006	30.8±39.3	0.3±0.4	2.8±4.4	0	0	23.5±36.0

2.7 主要脏器检查

除给药后期高剂量组的肝脏和脾脏的脏器系数有一定升高外,各犬的脏器外观完整,形态正常,色泽红润,质地软、富有弹性;胸腔、腹腔和颅脑未见渗液和

出血,食道、胃肠柔软,未见水肿、出血、瘀血、粘膜脱落、坏死和溃疡等刺激反应;未发现内脏组织器官明显异常。详见表 4。

表 4 富硒大蒜给药后期对犬脏器系数观察($n = 4, \bar{x} \pm s, \text{g/kg}$)

Table 4 Organ indexes of dogs after giving selenium enriched garlic($n = 4, \bar{x} \pm s, \text{g/kg}$)

Groups g/kg	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Adrenal	Thyroid	Prostate	Testicle	Uterus	Encephalon
0	6.7±0.5	29.4±5.9	2.6±0.3	7.7±0.7	4.2±0.3	0.14±0.03	0.09±0.02	0.4±0.2	1.3±0.2	0.3±0.1	7.0±0.2
0.75	6.7±0.6	29.5±3.0	2.8±0.3	7.2±0.7	4.3±0.4	0.15±0.02	0.09±0.02	0.4±0.1	1.2±0.1	0.3±0.1	6.7±0.6
1.50	6.7±0.7	31.6±4.9	3.6±0.8	7.5±1.7	4.3±0.4	0.13±0.02	0.10±0.02	0.4±0.1	1.3±0.1	0.3±0.1	7.3±0.5
3.00	6.7±0.5	35.8±4.3	3.8±1.0	8.3±0.8	4.6±0.4	0.15±0.03	0.09±0.01	0.3±0.1	1.2±0.2	0.3±0.1	7.0±0.6

2.8 病理学检查

对照组和给药各剂量组 26 种组织器官除个别犬存在肝细胞灶状炎性细胞浸润、间质性肾炎和肺慢性炎症外,未发现明显的动物自发病。给药组的肝脏、脾脏、肾脏、生殖腺、脑和胸骨等主要组织器官未见明显的组织病理学变化;胃、肠等消化道未见粘膜和粘膜下组织出现充血、水肿、变性和炎症反应。未观察到有意义的病理组织学改变。

3 讨 论

犬长期毒性试验是近年来我国为与国际接轨^[5-7],对新药所要求的必做项目,检索国内文献报道发现,在受试药品的剂量设计、动物数量、试验指标设定、观察内容和数据统计方法等差别较大^[8-10]。为了规范试验方法,国家食品药品监督管理局参照《药品注册的国际技术要求(ICH)》,在 2005 年详细制订了我国的《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》,该指导原则的实施将规范试验方法,促使犬长期毒性试验的发展和提高。犬长期毒性试验的试验周期较长、设定的指标较多、经费投入巨大,各实验室在试验设计时对每个试验指标的增减应慎重,既要保证规程要求内容,又需根据受试药物的毒性特点适当调整,以能够观察确定不同时期、不同阶段动物的毒性反应变化即可,不作具体的要求^[7]。

纯种 Beagle 犬连续口服给予富硒大蒜 12 周时间,经一般症状观察、血象、生化、心电图、尿液、脏器解剖观察,脏器系数和病理组织学等检查,异常指标如下:给药期高剂量组个别犬间断性出现呕吐,并摄食量减少;给药期高、中剂量组的总胆红素(Bil)数值有明显升高,高剂量组的白蛋白(ALB)数值有轻度降低,肝脏和脾脏的系数值有所升高。其它各期、各项检测指标基本在正常值范围内,未见明显升高或降低。

呕吐和摄食量减少是多量大蒜素刺激上消化道粘膜所致。

血清总胆红素数值的升高一般超过正常值范围 1 倍以上时,出现黄疸^[11]。本试验高剂量组除肝、脾脏器系数存在轻度增大外,各犬外观检查未见体表皮肤、粘膜和眼巩膜的黄染;粪便颜色无加深或发白变浅的改变;血液学检测未见红细胞数、血红蛋白浓度的明显降

低;血清生物化学检测未见肝功能其它指标出现明显异常;尿液检查未见颜色变深和尿胆素原、尿胆红素的增加;病理组织学未见肝脏等各内脏器官与药物毒性有关的形态学改变。其血清总胆红素数值的升高不应是药物直接所致的红细胞大量破坏溶血、肝细胞严重损害和肝外胆道阻塞。是否存在外源性药物引起的血浆白蛋白与胆红素的结合具有竞争作用使间接胆红素和白蛋白结合有所减少;或肝脏功能性肿大肝内胆红素排泄障碍,胆汁淤滞;或肝、脾脏肿大网状内皮系统功能增强,破坏吞噬红细胞增多;而出现胆红素数值的增加,需做进一步研究。

综上所述,富硒大蒜在相当于临床人拟用量 30 倍下,连续口服给药后仅出现轻度消化道刺激症状和总胆红素数值的升高,毒性反应不十分明显。犬用药的无明显毒性反应剂量为生药 0.75 g/kg。

参考文献:

- [1] Bayoumy EK. Organoselenium compounds: a novel class of cancer chemopreventive agents[J]. J Drugs Fut, 1997, 22(5): 539 - 545.
- [2] 荆洁线, 韩存芝, 赵先文, 等. 硒对荷瘤小鼠的抗癌及抗氧化研究[J]. 营养学报. 2003, 25(03): 272 - 274.
- [3] 杨文婕, 杨晓光, 夏弈明. 大蒜和富硒大蒜的防癌抗癌活性化合物[J]. 中华预防医学杂志, 1997, 31(5): 304 - 306.
- [4] 杨文婕, 陈晓滨, 陈 竞, 等. 高剂量富硒植物硒对胃癌模型大鼠的安全性研究 [J]. 营养学报, 2007, 29(03): 257 - 259.
- [5] ICH 指导委员会. 药品注册的国际技术要求(安全性部分)[M]. 周海钧, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 83 - 86.
- [6] 卫生部药政局. 犬的长期毒性试验[G]//中药新药研究指南(药学 药理学 毒理学). 1995: 202 - 208.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[G]. 2005.
- [8] 林壮民, 王爱平, 梅清华, 等. 抗 EB 病毒口服液对 Beagle 犬的长期毒性研究[J]. 中国药房. 2006, 17(14): 1054 - 1056.
- [9] 喻 舸, 曹 毓, 张 磊, 等. 止痒胶囊对 Beagle 犬长期毒性试验[J]. 四川生理科学杂志. 2007, 29(03): 118 - 121.
- [10] 姚 干, 何宗玉, 方泰惠. 比格犬经口给苓菝胶囊的长期毒性实验[J]. 时珍国医国药. 2006, 17(01): 58 - 61.
- [11] 朱忠勇. 实用医学检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1992: 405 - 412.

