

复方尼尔雌醇片急性和长期毒性的动物实验研究

廖二元 戴如春 罗湘杭 廖慧娟 伍贤平 李焕德 程泽龙 孙瑞元 刘锡玖

【摘要】 目的 观察复方尼尔雌醇片(CNT)的急性和长期毒性反应。**方法** 本研究分为急性和长期毒性试验两部分,包括 3 种动物的 5 项独立试验。用昆明种小鼠和杂种家犬分别对 CNT 的 LD₅₀、心血管系统、呼吸系统、神经系统等进行了急性毒性试验。实验结束后,尸解全部动物,进行系统病理和主要器官的组织病理检查。在长期毒性试验中,对 SD 大鼠和杂种家犬分别进行了 6 个月的观察,于实验后 2 月(家犬)或 4 月(SD 大鼠)、6 月和停药后 2 周(SD 大鼠)或 3 周(家犬)采血或处死动物,测定血液学、血生化学、尿生化指标和肝、肾功能指标。取各器官进行组织病理学检查。**结果** (1)CNT 的 LD₅₀为 66.6 mg/kg(腹腔注射),相当于临床用量的 681 倍。最大耐受量为 325 mg/kg(灌胃法),相当于临床用量的 3 325 倍。(2)高于临床用量 3 倍和 9 倍剂量的 CNT 对小鼠无明显急性神经毒性、心血管毒性或呼吸系统毒性,亦未发现对其他主要脏器有何急性毒性反应。(3)在观察 6 个月期间内,高于临床用量的 36.7 和 144 倍的 CNT 剂量对 SD 大鼠和家犬无明显长期毒性反应。但 SD 大鼠在给予 CNT 或尼尔雌醇后,摄食减少、体重下降(与对照组比较, $P < 0.001$),同时发现血浆红细胞计数和血红蛋白降低(与对照组比较, $P < 0.05 \sim P < 0.001$),停药后 2 周恢复正常。骨髓、肝、肾等脏器功能和病理学检查正常,提示贫血是摄食减少和体重下降所致。**结论** 除长期毒性试验大鼠出现可逆性体重减轻和继发性贫血外,相当于临床常规用量和显著高于该剂量的 CNT 无明显急性和长期毒性反应。复方尼尔雌醇片急性和长期毒性的动物实验研究

【关键词】 复方尼尔雌醇片; 毒性试验; 雌激素替代治疗

Acute and chronic toxicity of compound nylestriol tablet in experimental animals LIAO EYUAN, DAI RUCHUN, LUO XIANGHANG, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, the 2nd Xiang-Ya Hospital of the Central South University, Changsha, 410011, China

【Abstract】 Objective To observe the acute and chronic toxicity in experimental animals treated with compound nylestriol tablet (CNT) and its components. **Methods** The studies consisted of acute and chronic toxicity test series including 5 isolated experiments in mice, rats and dogs. LD₅₀, acute toxicity in cardiovascular, respiratory and nervous systems, and various organs of animals treated (1 week for acute tests and 6 months for chronic tests) with low and high doses of CNT were evaluated by observation of general conditions, hematological, serum biochemical and systemic pathological examinations. **Results** (1) LD₅₀ of CNT was 66.6 mg/kg intraperitoneally and the maximal tolerance dose was 325 mg/kg intragastrically, (2) No acute toxicity in nervous, cardiovascular, and respiratory systems, and other organs could be detected when 3- and 9-fold higher routine doses were given for one week. (3) During 6 months of chronic toxicity study, 36.7- and 144-fold routine doses of CNT showed no significant toxic effects on these animals, but a decrease in body weight, RBC and Hb was found and returned to normal 2 weeks after withdrawal of CNT, suggesting that it resulted from the decrease in food intake and malnutrition. **Conclusion** Except for loss of body weight and reversible anemia which was in SD rats of chronic toxicity group, CNT in doses corresponding to routine dosage for postmenopausal osteoporosis and much higher than that showed no notable toxicity in mice, SD rats and dogs.

基金项目:国家“九五”攻关项目(96-906-05-05);国家自然科学基金项目(39970347);国家“十五”攻关项目(2001BA702B03);湖南省社会发展科研计划(99SSY1009-10)

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所(廖二元、戴如春、罗湘杭、廖慧娟、伍贤平);湘雅二医院药剂科(李焕德、程泽龙);皖南医学院药理研究所(孙瑞元、刘锡玖)

[Key words] Compound nylestriol tablet; Toxicity test; Estrogen replacement therapy

绝经后骨质疏松(PMOP)的一线防治用药为雌激素及其类似物^[1]。雌激素防治 PMOP 的疗效确切,不但可延缓骨量丢失,降低骨折和心血管事件发生率,而且还可明显改善 PMOP 病人的生活质量^[2-5]。但生理性 17 β -雌二醇(E₂)和 E₂ 类似物存在促进子宫内膜增生和乳腺增生副作用,与子宫内膜癌和乳腺癌有一定的病因联系^[5]。复方尼尔雌醇片(Compound Nylestriol Tablet, CNT)是我所研制的防治 PMOP 新药。为了探讨本药的使用安全性,我们按照国家三类新药的要求,对 CNT 及其组分进行了急性毒性和长期毒性动物实验观察,现报道如下。

材料和方法

一、急性毒性试验

1. 半数致死量(LD₅₀)试验

(1)动物:昆明种小鼠,体重(20.4 $\pm$ 2.9)g, ($\bar{x} \pm s$),雌雄各半,购自中南大学湘雅医学院动物部(远交系,II级,合格证号 220-011)。用全价营养颗粒饲料喂养。经湖南省动物管理委员会鉴定,饲料符合 GB 14924-94 国家标准。实验小鼠饲养环境温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ ~22 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60%,氨气浓度 <20ppm。

(2)药物:尼尔雌醇购自北京四环制药二厂,批号 960528,左炔诺孕酮购自北京第三制药厂,批号 940315。临床应用的 CNT 由湘雅二医院药厂统一制备。经批准,按下列处方制成了复方尼尔雌醇片(批准文号:(湘)卫药剂(97)02 第 035 号):每 1 000 片含尼尔雌醇(NYL)500 mg,左炔诺孕酮 150 mg,聚维酮(K30)4.0 mg,淀粉 8.0 mg,乳糖 37.0 mg,硬脂酸镁 0.3 mg。每片含有效成分尼尔雌醇 0.5 mg,左炔诺孕酮 0.15 mg。本研究使用的 CNT 中成分和药物比例同前,但用 0.5%阿拉伯胶液配成所需浓度。

(3)方法: CNT 的 LD₅₀用两种方法测定:1)CNT 灌胃法:经预试验,小鼠灌胃给予最大浓度和最大体积(0.5 ml/10 g)的 CNT 混悬液未出现动物死亡,故进行最大耐受量试验。取小鼠 20 只(雌雄各半),一次灌胃最大浓度为每 ml 含 6.5 mg CNT(其中尼尔雌醇 5.0 mg,左炔诺孕酮 1.5 mg),最大体积为 0.5 ml/10 g 体重。给药后观察 14 d。2)CNT 腹腔注射法:取小鼠 50 只(雌雄各半),随机分为 5 组,每组 10 只。腹腔注射体积为 0.25 ml/10 g 体重。每组的 CNT 剂量分别为 130.0, 91.0, 63.7, 44.6, 31.2 mg/kg 体重。给药后观察 14 d。上述结果用 Bliss 法求出

LD₅₀及 95%可信限。

2. 自主活动和神经系统毒性试验

(1)动物:昆明种小鼠来源同 LD₅₀试验。40 只小鼠(雌雄各半)随机分为 4 组,各组灌胃容量为 0.2 ml/10 g 体重。

(2)方法:按 65 kg 体重的成人用量(0.65 mg/w)及动物系数折算的小鼠有效 CNT 剂量为 0.09 mg/kg。以此为中心剂量设置的小剂量为 0.05 mg/kg(相当于有效剂量的 0.55 倍);中剂量为 0.15 mg/kg(相当于有效剂量的 1.67 倍);大剂量为 0.5 mg/kg(相当于有效剂量的 5.56 倍)。观察给药前及给药后 1 h 小鼠的自主活动情况,用药理生理多用仪(安徽蚌埠无线电二厂)记录小鼠自主活动的变化及 1 周内的一般行为与神经系统功能改变。

3. 心血管及呼吸系统急性毒性试验

(1)动物:杂种雌性家犬(7.1~10.0 kg)由皖南医学院动物供应中心提供。家犬于试验前 3 w 训练,检疫合格,并给予驱虫治疗。试验前行两次心、肝、肾功能检测,选择正常者供试验用。

(2)方法:用 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg,经小隐静脉麻醉,仰卧固定,并行颈总动脉插管和气管插管。通过压力转换器与 LMS-2B 型二道生理记录仪连接,同步记录给药前后血压、呼吸及心电图(日本产 SC-513E, 1/2 衰减,低速 2.5 cm/s)变化。

将 16 只雌性家犬随机分为 4 组, CNT 的小剂量 0.03 mg/kg(该剂量相当于成人 0.65 mg/w,即每周 0.01 mg/kg),中、大剂量依次递增 3 倍,分别为 0.09 mg/kg 和 0.27 mg/kg。CNT 用 0.5%阿拉伯胶液溶解,灌胃给药,容量为 1.0 ml/kg。观察给药前后 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 及 4.5 h 的血压、呼吸和心电图变化。

二、长期毒性试验

1. SD 大鼠的长期毒性试验

(1)动物:SD 大鼠购自中科院上海实验动物中心,合格证号:中科院动管会 005 号。喂养饲料由皖南医学院动物中心提供。标准饲料的配方为:粗面粉 50%,鱼肝油 1%,盐 1%,磷米 10%,麸皮 10%,精米粉 5%,碳酸钙 1%,鱼粉 5%,豆饼 17%。饲养温度(18 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,通风良好,自然光照。动物分组单笼饲养。记录食量、体重和一般状况。

(2)方法:5 周龄雌性 SD 大鼠 105 只,体重(123 $\pm$ 13.0)g。按每周 CNT 成人剂量 0.01 mg/kg(65 kg

体重)并根据大鼠性周期特点,折算的 CNT 用量为隔日 0.07 mg/kg。按成人体重计算,以 36.7 倍和 144.0 倍设置 CNT 的隔日给药量。动物随机分为 7 组(每组 15 只):1)CNT 小剂量组:0.39 mg/kg。2)CNT 中剂量组 0.78 mg/kg。3)CNT 大剂量组 1.56 mg/kg。4)尼尔雌醇小剂量组 0.30 mg/kg。5)尼尔雌醇中剂量组 0.60 mg/kg。6)尼尔雌醇大剂量组 1.20 mg/kg。7)正常对照组 0.5%阿拉伯胶液。

各组大鼠按剂量饮入药物,隔日饮服 1 次。饮服完药物后补充自来水,自由进食,对照组饮入等容量 0.5%阿拉伯胶液。连续观察 24 w(6 个月)停药,然后继续观察 2 w。于用药 4 个月时,各组处死 4 只大鼠。在最后一次给药后 24 h,各组处死 8 只,分别测定血液学和血生化学指标,并进行各器官的系统病理学观察。最后剩下的每组 3 只大鼠继续观察 2 w 后处死,重复上述各项检查。

(3)观察指标

一般指标:包括活动和行为,尿粪性状,摄食量和体重变化等。

血液学指标:包括红细胞计数、血红蛋白、血小板计数、凝血时间、白细胞总数及分类。

血、尿生化指标:包括天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、总蛋白(SP)、白蛋白(Alb)、血糖(Glu)、总胆红素(T-Bil)、肌酐(Cr)和总胆固醇(TC)等。留 24 h 尿测定尿 pH、GLU、尿蛋白、隐血、酮体。

系统尸检和组织病理学检查:包括全面仔细的尸检,观察心、肝、脾、肺、肾、脑、肾上腺、甲状腺、卵巢、子宫、胰腺、胃、十二指肠、回肠、结肠、胸骨(骨和骨髓)、胸腺、淋巴结、膀胱等的组织病理检查等。组织以 10%甲醛固定,HE 染色剂,常规光镜检查。

2. 家犬长期毒性试验

(1)动物:杂种雌性家犬(月龄 12~24 m,体重 5.0~6.1 kg)来源和试验前处理同心血管和呼吸系统急性毒性试验,由皖南医学院动物中心提供。试验前一周记录各犬的体重及进食量。各条家犬单笼饲养,温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\% \pm 10\%$,自然光照,自由进水。每日每犬定量给予标准固体饲料 75 g/kg,分早晚两次给予。每隔 15 d 根据体重增长情况调整进食量。

(2)方法:以临床推荐的 CNT 成人量 0.65 mg/w(每周 0.01 mg/kg),折算成犬的等效量为 0.028 mg/kg,按此剂量的 6 倍作为小剂量,中、大剂量组依

次按 2 倍递增。36 只家犬随机分为 6 组(每组 6 只):1)对照组;2)CNT 小剂量组,每日 0.167 mg/kg;3)CNT 中剂量组,每日 0.334 mg/kg;4)CNT 大剂量组每日 0.668 mg/kg;5)在炔诺孕酮组每日 0.154 mg/kg(相当于 CNT 大剂量组中的含量);6)尼尔雌醇组,每日 0.514 mg/kg(相当于 CNT 大剂量组中的含量)。各组家犬连续给药 180 d,停药后观察 21 d。

按各家犬所应服用剂量,将药物置于肉包内,每日上午 8 时给予,空白对照组给予无药肉包。

6 组动物于试验前 3 w 观察一般情况,行为和活动量及尿、粪性状,并行血液学、血生化、心电图和尿液检查(观察指标同 SD 大鼠长期毒性试验)。记录体重。用药期间,每日观察一般指标 1 次。每 15 d 称重 1 次,并按体重增长调整进食量。连续给药 180 d,于用药的第 60,120 和 180 天行血液学、血生化、心电图及尿生化检查。于末次用药后 24 h 各组分别取家犬 4 只,放血处死,系统尸解,并分别称取各脏器重量,取各项器官进行病理组织学检查。各组剩余 2 只家犬于停药后 21 d 行血液学、血生化、心电图及尿液分析(观察指标同 SD 大鼠长期毒性试验);活杀重复上述检查。

(3)观察指标和方法

一般症状:包括行为活动,外观体征,尿粪性状等。

心电图:用 ECG-5151 心电图测定家犬心电图(SERIAL,22311,50 Hz,日本)。

血液学和血、尿生化检查:自家犬的小隐静脉取血,测定指标同 SD 大鼠长期毒性试验。

脏器系数及组织病理学观察:称取各脏器湿重并计算相对重量(g/kg 体重),组织学检查指标同 SD 大鼠长期毒性试验。

三、统计方法

采用 SPSS 统计软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组差异用 t 检验,3 组以上的组间差异用方差分析。

结 果

一、急性毒性试验

1. CNT 的 LD_{50} :灌胃给药法的结果显示,给药 1~2 h 内动物活动减少,3 h 后恢复正常。给药前动物的体重($\bar{x} \pm s$)为 $(19.6 \pm 1.3)\text{g}$,给药后 1 w 为 $(26.1 \pm 1.8)\text{g}$ 。CNT 的最大耐受剂量为 325 mg/kg。按成人体表面积折算,此剂量相当于临床用量(0.65 mg/w)的 3 325 倍(60 kg 体重)或 3 602 倍(65 kg 体

重)。

腹腔注射给予 CNT, 小鼠的 LD₅₀测定结果见表 1。

表 1 小鼠的 CNT LD₅₀试验(腹腔注射)

药物剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	死亡数	死亡率 (%)	LD ₅₀ 与 95%置信限 (mg/kg)
130.0	10	9	90	
91.0	10	7	70	
63.7	10	5	50	
44.6	10	3	30	66.6
31.2	10	0	0	54.3 ~ 81.7

注:在腹腔注射 CNT 后,活动显著减少,出现竖毛反应,给药后 6 h 后开始出现小鼠死亡。24 h 为高峰,48 h 后不再有动物死亡

LD₅₀为 66.60 mg/kg,以 60 kg 体重折算,相当于临床口服用量的 681 倍(60 kg 体重)或 738 倍(65 kg 体重)。

2. 急性神经系统毒性

CNT 各剂量对小鼠的自主活动无明显影响,亦未见其他行为异常。CNT 大、中、小剂量组和对照组的脉冲(次数/分)分别为 203 ± 48.8, 209.6 ± 76.8, 198.6 ± 78.6 及 251.2 ± 85.2。用药后分别为 148.8 ± 50.6, 150.8 ± 99.2, 133.2 ± 56.4 和 259.8 ± 115.4。用药前后 CNT 大、中、小剂量组的脉冲变化率分别为 -4.6 ± 6.4, 3.3 ± 12.6, -4.6 ± 8.8 及 1.4 ± 8.7。各组用药前后及用药前或后的剂量组与对照组比较,差异均无显著性。说明 CNT 对小鼠的自主活动神经系统功能无明确影响。

3. 急性心血管和呼吸系统毒性

(1)血压:给药前,对照组、CNT 大、中、小剂量组

的血压(kPa)分别为 167.8 ± 3.68, 16.37 ± 1.84, 17.95 ± 1.76 及 17.51 ± 1.9, 给药后 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 和 4.5 h 的血压波动的最大范围发生于 3.5 h。对照组 0.22 ± 0.40, CNT 大、中、小剂量组的最大波动范围分别为 -0.23 ± 0.53, -0.28 ± 0.19 和 0.41 ± 0.38。各剂量组及各时间组之间的血压变化差异均无显著性。

(2)呼吸:给药前,对照组、CNT 大、中、小剂量组的呼吸频率(次/分)分别为 22.3 ± 2.9, 25.0 ± 4.1, 22.5 ± 7.0 和 23.0 ± 8.6。给药后的呼吸频率最大变化为:大剂量组 -0.8 ± 0.5(0.5 h), 中剂量组 0.8 ± 0.9(4.5 h), 小剂量组 1.8 ± 2.4(3.5 h)。各剂量组及各时间组之间的呼吸频率变化差异均无显著性。

(3)心率:给药前,对照组、CNT 大、中、小剂量组的心率(次/分)分别为 201.8 ± 20.3, 190.3 ± 32.8, 202.0 ± 37.8 和 219.5 ± 22.5。给药后心率的波动范围为对照组 16.8 ± 16.9(0.5 h), 大剂量组 -9.6 ± 11.6(0.5 h), 中剂量组 4.4 ± 17.3(0.5 和 1.5 h), 小剂量组 -3.1 ± 6.3(0.5 ~ 4.5 h)。各剂量组及各时间组之间的心率差异无显著性。

(4)心电图:给药前及给药后各时间点的心电图结果见表 2。由表 2 可知,给药前及给药后各时间组之间的心电图变化差异无显著性。

二、大鼠长期毒性试验

1. 摄食量与体重:用药 2 周后, CNT 和尼尔雌醇(NYL)各剂量组的摄食量较对照组明显减少。由于服药后摄食量下降,各处理组的体重亦见不同程度下降,见表 4。

表 2 CNT 灌胃对家犬心电图的影响(n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	给药前心电图						给药后 0.5h 心电图					
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T
对照组	等容量	7.8 ± 0.5	5.5 ± 0.6	17.3 ± 0.9	13.3 ± 6.9	1	3	7.8 ± 0.005	5.0 ± 0.8	16.8 ± 0.9	13.8 ± 7.5	1	3
高剂量组	0.27	7.5 ± 1.3	6.5 ± 3.8	21.0 ± 2.0	12.5 ± 8.7	2	2	8.0 ± 0.008	6.5 ± 3.0	22.0 ± 2.3	11.3 ± 7.5	2	2
中剂量组	0.09	7.8 ± 9.6	7.0 ± 3.5	20.5 ± 1.0	11.3 ± 7.5	2	2	7.5 ± 0.013	6.5 ± 1.0	21.0 ± 2.0	11.3 ± 4.8	2	2
低剂量组	0.03	7.5 ± 0.6	6.8 ± 2.2	20.5 ± 3.0	13.8 ± 8.5	2	2	7.8 ± 0.005	6.8 ± 2.2	19.5 ± 3.0	13.8 ± 8.5	2	2
组别	剂量 (mg/kg)	给药后 1.5h 心电图						给药后 2.5h 心电图					
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T
对照组	等容量	7.8 ± 0.5	5.3 ± 0.9	17.3 ± 1.5	12.5 ± 6.5	1	3	7.8 ± 5.0	5.0 ± 0.0	17.0 ± 1.2	13.3 ± 6.9	1	3
高剂量组	0.27	7.8 ± 9.6	7.0 ± 3.5	22.0 ± 2.3	12.5 ± 6.5	2	2	7.8 ± 0.9	6.8 ± 2.2	22.0 ± 2.3	11.3 ± 7.5	2	2
中剂量组	0.09	7.5 ± 12.9	6.5 ± 3.8	20.5 ± 2.5	11.3 ± 4.8	2	2	7.5 ± 1.3	7.0 ± 2.0	19.5 ± 3.4	10.0 ± 5.8	2	2
低剂量组	0.03	7.8 ± 0.5	7.0 ± 2.6	20.0 ± 3.7	13.7 ± 8.5	2	2	7.8 ± 0.05	8.8 ± 2.5	19.5 ± 2.9	13.8 ± 8.5	2	2
组别	剂量 (mg/kg)	给药后 3.5h 心电图						给药后 4.5h 心电图					
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T
对照组	等容量	7.8 ± 0.5	5.0 ± 0.8	17.0 ± 0.8	12.5 ± 6.5	1	3	7.8 ± 5.0	5.8 ± 0.5	17.0 ± 1.2	12.0 ± 5.7	1	3
高剂量组	0.27	7.5 ± 9.0	6.5 ± 2.5	22.0 ± 2.3	11.3 ± 7.5	2	2	7.8 ± 0.9	5.8 ± 1.7	22.0 ± 2.3	11.3 ± 7.5	2	2
中剂量组	0.09	7.5 ± 12.9	6.5 ± 3.8	20.5 ± 2.5	11.3 ± 4.8	2	2	7.5 ± 1.3	7.0 ± 2.0	19.5 ± 3.4	10.0 ± 5.8	2	2
低剂量组	0.03	7.8 ± 0.5	7.0 ± 2.6	20.0 ± 3.7	13.7 ± 8.5	2	2	7.8 ± 0.5	8.8 ± 2.5	19.5 ± 2.9	13.8 ± 8.5	2	2

表3 口服CNT 180 d及停药后21 d对家犬心电图的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	给药前心电图						给药后 0.5h 心电图						
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	
CNT 大	等容量	7.7±1.0	4.8±1.6	20.0±4.4	12.3±3.6	5	1	7.5±0.8	4.3±1.0	19.0±1.3	10.3±2.9	5	13	
	0.668	8.0±1.4	5.2±1.6	17.5±5.6	12.2±6.2	3	3	8.2±0.8	4.7±1.6	16.7±3.9	14.8±6.0	3	3	
	中	0.334	7.7±0.5	3.8±2.6	24.8±4.4	22.0±4.2	6	0	7.8±0.8	3.8±0.3	23.0±2.1	19.7±3.3	6	0
	小	0.167	8.0±6.0	5.0±0.6	20.7±1.7	10.8±8.0	2	4	8.2±1.0	4.8±0.8	21.0±2.1	10.0±4.5	2	4
尼尔雌醇	0.514	7.7±0.5	4.8±1.0	18.2±1.7	12.3±5.0	3	3	7.8±0.4	4.8±0.8	18.3±1.9	13.8±5.4	3	3	
左炔诺孕酮	0.154	7.2±0.8	5.5±1.0	18.7±1.0	8.3±2.6	1	5	7.7±0.5	4.6±0.8	18.2±1.9	10.3±0.8	1	5	

组别	剂量 (mg/kg)	给药前心电图						给药后 0.5h 心电图						
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	
CNT 大	等容量	7.8±0.4	4.2±0.4	16.8±2.04	12.5±2.7	5	1	7.8±0.4	4.1±1.0	19.2±0.1	10.0±1.3	5	1	
	0.668	8.2±0.8	4.8±1.6	16.8±3.9	11.7±6.8	3	3	8.0±0.0	4.3±1.9	19.7±0.8	17.8±5.7	3	3	
	中	0.334	7.7±0.5	3.9±0.4	23.0±4.0	20.2±3.4	6	0	7.7±5.2	3.9±0.3	23.0±3.3	22.0±4.5	6	0
	小	0.167	8.2±0.98	4.8±0.4	21.0±3.55	6.70±2.6	1	5	8.2±0.98	5.0±0.0	23.0±2.4	10.8±5.8	2	4
尼尔雌醇	0.514	7.7±0.8	4.0±1.67	17.3±2.7	12.3±7.3	3	3	7.8±0.4	4.7±0.8	18.5±1.87	12.3±6.8	2	4	
左炔诺孕酮	0.154	7.7±0.8	4.4±1.1	18.2±3.6	10.8±2.0	0	6	7.8±0.8	4.6±1.2	18.7±1.5	11.3±4.5	0	6	

组别	剂量 (mg/kg)	给药前心电图						给药后 0.5h 心电图					
		PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T	PR(s·10 ⁻²)	QRS(s·10 ⁻²)	QT(s·10 ⁻²)	T波(mV·10 ⁻²)	直立 T	倒置 T
CNT 大	等容量	7.5±0.7	5.0±1.4	19.0±1.4	11.0±1.4	1	1						
	0.668	8.0±0.0	4.0±0.0	20.0±0.0	13.5±2.1	1	1						
	中	0.334	8.0±0.0	4.0±0.0	24.0±4.2	32.5±3.5	2	0					
	小	0.167	8.0±0.0	5.0±0.0	22.5±0.7	17.0±4.2	1	1					
尼尔雌醇	0.514	8.0±0.0	5.0±1.4	16.0±2.8	12.0±9.9	1	1						
左炔诺孕酮	0.154	8.5±0.7	4.8±0.0	22.0±0.0	12.5±3.5	0	2						

2. 血液学和血液生化学指标变化:给药4个月时,CNT和NYL组的血红蛋白与对照组(147.5 ± 8.7 g/L)比较,有所下降(CNT小剂量组 124.8 ± 9.1 , NYL大剂量组为 123.7 ± 119 , NYL中剂量组 114.7 ± 10.3 , NYL大剂量组 126.5 ± 10.4 g/L, $P < 0.05 \sim$

$P < 0.01$),给药6个月时,CNT大、中剂量组的Hb亦下降,其他各组的Hb亦较4个月时下降更明显(见表5)。但其他各项指标均无明显变化,与对照组比较,差异无显著性。

表4 CNT及NYL对大鼠体重的影响($g, \bar{x} \pm s$)

组别	给药前($n=15$)	给药后2w($n=15$)	给药后8w($n=15$)	给药后16w($n=11$)	给药后24w($n=11$)	停药后2w($n=3$)
对照组	128 $\pm$ 13	166 $\pm$ 12	201 $\pm$ 15	229 $\pm$ 19	259 $\pm$ 22	245 $\pm$ 19
CNT 小	122 $\pm$ 10	134 $\pm$ 12*	160 $\pm$ 17*	178 $\pm$ 17*	192 $\pm$ 23*	201 $\pm$ 31
中	123 $\pm$ 14	124 $\pm$ 17*	169 $\pm$ 22*	190 $\pm$ 26*	204 $\pm$ 23*	210 $\pm$ 29
大	124 $\pm$ 12	136 $\pm$ 14*	167 $\pm$ 16*	197 $\pm$ 23*	208 $\pm$ 24*	238 $\pm$ 14
NYL 小	122 $\pm$ 16	144 $\pm$ 16*	171 $\pm$ 17*	197 $\pm$ 19*	204 $\pm$ 21*	232 $\pm$ 15
中	121 $\pm$ 15	139 $\pm$ 15*	171 $\pm$ 15*	199 $\pm$ 14*	210 $\pm$ 20*	226 $\pm$ 22
大	122 $\pm$ 10	136 $\pm$ 16*	158 $\pm$ 17*	184 $\pm$ 18*	196 $\pm$ 23*	220 $\pm$ 24

注:给药前各组15只大鼠于给药后1~18w前无动物死亡。18~26w各组动物数为11只,实验中途无动物发生意外死亡。每周均测量了所有SD大鼠体重,其变化与表中所列类似,CNT和NYL各组与对照组比较,均 $P < 0.01$ 。与对照组比较,* $P < 0.01$

3. 各脏器系数和组织病理学观察:用药各组和对对照组比较,各组的脏器多数差异无显著性。但个别大鼠出现子宫内膜和肺组织的轻度炎性细胞浸润。

三、家犬长期毒性试验

1. 一般资料:各组动物用药期间及恢复期未见异常表现,未发生意外动物死亡。动物的活动正常、

行为活泼,毛发光润,尿粪外观正常。各组动物进食CNT大剂量组及左炔诺孕酮组家犬在用药150d后体重似有减轻,但与对照组比较差异无显著性。其他各剂量组及时间组间的体重亦差异无显著性。

2. 心电图:各组动物于用药前,用药第60,120,180d及停药后21d,均未见心电图的显著性变化。

3. 血液学及血尿生化检查,各组间及各时间组

间的各项血液学指标与血尿生化标准差异均无显著性。

4. 系统尸解及组织病理学观察,除用药 180 d 时的 CNT 中剂量组和小剂量组各有 1 只家犬的肝

脏出现轻度浊肿变化,子宫内膜轻度炎症外,其他各组间及各时间组间的系统尸解,各脏器系数与组织病理学检查均未发现异常。

表 5 CNT 及 NYL 对血浆血红蛋白和红细胞计数的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	Hb(g/L)			RBC($10^{12}/L$)		
	给药后 4 月($n=4$)	给药后 6 月($n=4$)	停药后 2w($n=3$)	给药后 4 月($n=4$)	给药后 6 月($n=4$)	停药后 2w($n=3$)
对照组	147.5 $\pm$ 8.7	128.8 $\pm$ 6.4	121.3 $\pm$ 25.5	6.4 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 1.1
CNT 小	133.3 $\pm$ 14.1	111.1 $\pm$ 6.6	125.0 $\pm$ 10.4	5.3 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.5
中	124.8 $\pm$ 9.1*	110.3 $\pm$ 9.8**	115.0 $\pm$ 5.3	5.4 $\pm$ 0.6*	5.1 $\pm$ 0.4*	6.4 $\pm$ 0.2
大	123.0 $\pm$ 33.2*	118.2 $\pm$ 6.3*	130.5 $\pm$ 4.9	6.3 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.3
NYL 小	123.7 $\pm$ 11.9*	127.5 $\pm$ 10.3	135.7 $\pm$ 2.1	6.2 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.1
中	114.7 $\pm$ 10.3**	115.8 $\pm$ 4.5**	123.7 $\pm$ 3.5	5.4 $\pm$ 0.5*	6.1 $\pm$ 0.4*	6.8 $\pm$ 0.3
大	126.5 $\pm$ 10.4*	118.8 $\pm$ 4.7**	122.5 $\pm$ 3.5	5.7 $\pm$ 0.7*	5.9 $\pm$ 0.3*	6.8 $\pm$ 0.3

注:给药后 4 m 和 6 m 各组大鼠数为 4 只,停药后 2 w 各组大鼠为 3 只。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

讨 论

根据国内外大量长期的观察研究结果,现已公认绝经后骨质疏松的最有效防治药物为雌激素^[1,2,6]。雌激素替代治疗(ERT)不但可减轻骨质疏松和更年期一系列症状,改善血脂谱异常,提高骨矿密度,而且还可显著降低心脑血管事件发生率^[3,5]。但是,ERT 也有一些副作用^[7],如可引起子宫内膜增生,有可能引起乳腺增生或使乳腺癌复发。子宫出血使病人依从性下降。我们在数 10 年用雌孕激素防治更年期综合征和 PMOP 的基础上,建立了小剂量 ERT 方案。在该方案中,我们用国产的尼尔雌醇(nylestriol)代替 17 β -雌二醇,用左炔诺孕酮(levonorgestrel)代替安宫黄体酮。经临床初步观察,两药的配伍合用比例以 3.0~3.5 为适合。尼尔雌醇为雌三醇的衍生物,在体内主要分解生成乙炔雌三醇,其主要特点是选择性作用于阴道及子宫颈,对子宫实体及子宫内膜的作用小。因此被广泛作为 ERT 应用于临床。国内已有大量的文献报道了本药的药理、药代动力学、药效学作用。其作用强,疗效确切,毒副作用极低^[8,9]。尼尔雌醇的血浆半衰期约 20 h,口服后在体内储存,缓慢释放,作用时间持久。左炔诺孕酮血浆半衰期 10~24 h。由于孕激素能减少靶细胞的雌激素受体数目^[10],增加 17- β 脱氢酶活性^[11],减少细胞增殖^[12],防止了子宫内膜增生^[13]。因而,小剂量雌孕激素合用治疗 PMOP 具有良好的应用前景^[14],因为它起到了类似于雌激素受体调节剂(SERM)的作用。由于两药均为长效制剂,试用每

周服药 1 次,也取得了很好的治疗效果^[4]。本研究的目的是按照国家 III 类新药的规定所进行的药理毒理学试验。

本研究的急性毒性试验结果表明,CNT 的最大耐受剂量为 325 mg/kg,按成人体表面积折算,此剂量相当于临床常规用剂量(0.65 mg/w)的 3 325 倍(60 kg 体重)或 3 602 倍(65 kg 体重)。用腹腔注射 CNT 法测得的 LD₅₀ 为 66.6 mg/kg,相当于临床口服用量的 681 倍(60 kg 体重)或 738 倍(65 kg 体重)。说明 CNT 使用安全。同样,急性神经系统毒性试验亦未发现实验小鼠的任何异常。相反,ERT 可降低 Alzheimer 病的发病率,改善本病患者的神经精神症状,减少 β -淀粉样物(beta-amyloid)的神经毒性^[15]。用 CNT(0.03,0.09,0.27 mg/kg)灌胃给药对麻醉家犬的血压、呼吸、心率和心电生理无明显影响。

CNT 用于 PMOP 的治疗一般是长期的,要求连续用药数年或更长时间,所以 CNT 的长期毒性观察比急性毒性观察更为重要。本研究分别用 SD 大鼠和杂种家犬两种动物对 CNT 的长期毒性进行研究。结果表明,CNT 在每日用量为 0.39,078 和 1.56 mg/kg,这分别相当于成人剂量(0.65 mg/w)的 36.7 倍和 144 倍。连用 24 w,动物全部存活,血液学指标及血液生化学指标均无明显变化,各脏器系数和各脏器组织病理学检查除个别大鼠出现卵巢退行性变化、子宫内膜轻度炎症性细胞浸润及肺部轻度炎症反应外,未见其他明显病理变化。但是,大剂量的 CNT 可抑制实验动物的食欲,用药 2w 后,SD 大鼠的进食量减少、体重增长明显落后于对照组,停药后可迅速

恢复。一般口服雌激素具有较强的抑制食欲作用,并可减轻体重和体脂含量。Rocha 等发现,雌性 Wistar 大鼠在接受 2 w 的雌二醇后,摄食减少,体重和体脂下降,但一般均发生于服药的第 1 周,第 2 周即可恢复正常,这一改变不伴有血浆或脑脊液 leptin 水平的变化^[16],但可能与下丘脑旁室核分泌的神经肽 γ 减少有关^[1]。另一方面,生理量的孕激素一般对食欲无抑制作用,而甲羟孕酮(MPA)可能还有促进食欲作用^[18]。CNT 中含有尼尔雌醇(雌三醇的衍生物)和左炔诺孕酮,目前尚无这两种化合物对食欲影响的报道。由于在临床上,试用 CNT 者并无食欲下降和体重减轻的副作用^[4],而且在本组的家犬实验中,亦未发现类似副作用,故 SD 大鼠出现的食欲减退和体重下降因动物数太少,还难以肯定,这些有待进一步研究。此外,动物服用 CNT 和尼尔雌醇后多数组出现非 CNT 剂量依赖性血红蛋白和红细胞计数下降。由于并未发现 CNT 对骨髓、淋巴结和肝、脾、肾等器官有何损害的病理学和生化学依据,故推论这些改变与动物进食减少和体重下降有关,因为随着停药后体重的恢复、红细胞计数和血红蛋白亦恢复正常。SD 大鼠的长期毒性试验结果表明,CNT 对大鼠的长期毒性很小,观察的 1.56 mg/kg (144 倍于成人的常规用量)仍是可耐受剂量。与 CNT 同步进行的尼尔雌醇长期毒性试验结果与 CNT 相同。整个试验期间及停药后所有动物本发生子宫出血现象。

为了进一步考证上述的长期毒性试验结果,我们还对家犬进行了 180 d 的 CNT 毒性观察。结果发现,CNT 每日 0.167, 0.334 和 0.668 mg/kg 对家犬无明显毒性作用,CNT 对家犬的无毒性剂量至少不低于每日 0.668 mg/kg,该剂量相当于成人常用量的 74.2 倍。各组的进食量、心电图检查、血液学和血生化检查、尿液分析等均正常,但病理组织学检查 CNT 中、小剂量组在用药 18 d 后,各有一条家犬出现肝细胞轻度浊肿,停药 21 d 后,在本组及其他组的家犬中却未见同样病理变化,故不认为肝细胞浊肿与 CNT 有关。

笔者反复观察了 CNT 及其组分的急性与长期毒性反应。证明 CNT 的毒性极低,此与临床上的观察结果是一致的。

致谢:本研究的部分实验由皖南医学院药理研究所孙瑞元、刘锡玖、桂常青等教授及马越鸣、宋运英、丁伯平、徐瑶、宋建国、杨解人等同志完成,特此致谢

参 考 文 献

- 1 Rodan GA, Madin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 2000, 289: 1508-1514.
- 2 Reginster JY, Bruyere O, Audran M, et al. Do estrogens effectively prevent osteoporosis - related fractures? *Calcif Tissue Int*, 2000, 67: 191-194.
- 3 王志清, 刘洁. 尼尔雌醇防治绝经后骨质疏松症和血脂紊乱的研究进展. *中国新药杂志*, 1996, 5: 335-339.
- 4 廖二元, 邓小戈, 周智广, 等. 尼尔雌醇加孕激素治疗绝经后骨质疏松症的研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18: 95-98.
- 5 Dick SE, Dweitt DE, Anawalt SD. Postmenopausal hormone replacement therapy and major clinical outcomes: a focus on cardiovascular disease, osteoporosis, dementia, and breast endometrial neoplasia. *Am J Manag Care*, 2002, 8: 95-104.
- 6 Burger HG. Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. *Horm Res*, 2001, 56 (Suppl): 82-85.
- 7 Albertazzi P, Purdie DW. Oestrogen and selective oestrogen receptors (SERMs): current roles in the prevention and treatment of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001, 15: 451-468.
- 8 宋淑军, 何世荣. 绝经妇女骨代谢变化及雌激素对骨代谢的影响. *中国药理学杂志*, 1995, 尼尔雌醇专辑. 28-30.
- 9 王志群, 周重宛, 杨秀珍, 等. 小剂量尼尔雌醇对绝经后妇女骨盐含量的影响. 北京: 中国妇女卫生保健成果展示会论文汇编. 维尼安专刊, 1995. 46-48.
- 10 Hsudh AJ, Peck EJ Jr, Clark JH. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology*, 1976, 98: 438-444.
- 11 Tseng L, Gurside E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology*, 1975, 97: 825-833.
- 12 Gerschenson LE, Berliner J, Yang J. Diethylstilbestrol and progesterone regulation of cultured rabbit endometrial cell growth. *Cancer Res*, 1974, 34: 2873-2880.
- 13 Paterson ME, Wade - Evans T, Sturdee DW, et al. Endometrial disease after treatment with estrogens and progestones in the climacteric. *Br Med J*, 1980, 280: 822-824.
- 14 Lindsay R, Gallagher JC, Kleerekoper M, et al. Effect of lower doses of conjugated equine estrogens with and without medroxyprogesterone acetate on bone in early postmenopausal women. *JAMA*, 2002, 287: 2668-2676.
- 15 Green PS, Gridley KE, Simpkins JW. Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett*, 1996, 218: 165-168.
- 16 Rocha M, Grueso E, Puerta M. The anorectic effect of oestradiol does not involve changes in plasma and cerebrospinal fluid leptin concentrations in the rat. *J Endocrinol*, 2001, 171: 349-354.
- 17 Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, et al. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 1994, 134: 2367-2370.
- 18 Simons JP, Aaronson NK, Vansteenkiste JP, et al. Effects of medroxyprogesterone acetate on appetite, weight, and quality of life in advanced-stage non-hormone-sensitive cancer: a placebo-controlled multicenter study. *J Clin Oncol*, 1996, 14: 1077-1084.

(收稿日期: 2002-07-15)