

· 论著 ·

纤维蛋白封闭剂对 SD 大鼠连续腹腔注射给药 14 天的毒性研究

戴小宇, 朱海, 张晓冬, 张晓芳, 宗英, 戴益民, 张淑英, 袁伯俊, 陆国才 (第二军医大学药物安全性评价中心, 上海 200433)

[摘要] 目的 评价 SD 大鼠连续腹腔注射纤维蛋白封闭剂的安全性。方法 SD 大鼠雌雄分别按体质量随机分 4 组, 即空白对照组、纤维蛋白封闭剂低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 20 只, 雌雄各半。3 个给药组的给药剂量分别为 85.5、171.0 和 342.0 mg/kg, 每天腹腔注射给药, 连续 14 d, 恢复期 28 d, 进行一般症状、血液学、血液生化和病理组织学等指标检测。结果 与空白对照组相比, 纤维蛋白封闭剂中、高剂量组大鼠第 14 天的白细胞计数显著升高, 纤维蛋白原显著降低, 中、高剂量组大鼠脾脏的脏器重量有增加趋势。组织病理学检查发现部分高剂量动物腹腔出现残留药物引起的纤维肉芽组织包裹。上述变化指标在恢复期结束时基本可恢复。结论 大鼠腹腔注射纤维蛋白封闭剂 85.5~342.0 mg/kg, 安全剂量为 85.5 mg/kg, 毒性剂量为 171.0 mg/kg。毒性靶系统或靶部位为血液系统、免疫系统和给药局部, 毒性作用可逆。

[关键词] 纤维蛋白封闭剂; SD 大鼠; 重复给药毒性; 临床前安全性

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0231-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.010

Repeat-dose toxicity study of fibrin sealant in SD rats

DAI Xiaoyu, ZHU Hai, ZHANG Xiaodong, ZHANG Xiaofang, ZONG Ying, DAI Yimin, ZHANG Shuying, YUAN Bojun, LU Guocai (Center for New Drug Evaluation, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the safety of fibrin sealant (FS) intraperitoneal injection in SD rats. **Methods** 80 male and female SD rats were randomly divided into four groups (0, 85.5, 171.0, 342.0 mg/kg) by body weight. All rats were intraperitoneally injected with vehicle or FS daily for 14 days followed by a 28-day recovery period. The clinical signs, hematological and biochemical indices were measured. The pathology were observed. **Results** Increase of white blood cell count (WBC) and decrease of fibrinogen (FIB) in d 14 were found in 171.0 mg/kg and 342.0 mg/kg dosage groups. Furthermore, the tendency of weight increase of spleen were found in 171.0 mg/kg and 342.0 mg/kg dosage groups. Pathological exams of peritoneal cavity found that there were granulation tissues containing FS in some of the rats in 342.0 mg/kg group. All of these changes got reversed after the recovery period. **Conclusion** The safety dose in this study is considered to be 85.5 mg/kg, and the toxicity dose is 171.0 mg/kg. The target toxicity systems or site of FS in SD rats are hematological system, immune system and injection site. The toxic effects of FS are reversible.

[Key words] fibrin sealant; SD rats; repeat-dose toxicity; preclinical safety

纤维蛋白封闭剂(fibrin sealant, FS)是一种新型的生物可降解的组织粘合剂和止血药^[1], 主要成分为纤维蛋白原和凝血酶, 各组分混合后喷洒于创面形成纤维蛋白, 促进血凝块形成从而发挥止血作用, 可用于外科手术后的止血和促进伤口愈合^[2,3],

本研究通过腹腔注射重复给予 SD 大鼠猪源性 FS, 观察 FS 对 SD 大鼠产生的毒性反应及严重程度、主要毒性靶器官及毒性损害的可逆程度, 找到重复给药毒性的安全剂量, 为临床研究提供实验依据。

1 材料与方^[4,6]

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 纤维蛋白封闭剂(组分 I: 纤维蛋白原, 批号: 20071101, 规格: 134.54 mg/瓶; 组分 I 溶解液, 批号: 20071101, 规格: 6 ml/瓶。组分 II: 凝血酶, 批号: 20071101 规格: 893 IU/瓶; 组分 II 溶解液, 批号: 20071101, 规格: 6 ml/瓶)由上海利康生物工程有限公司提供, 样品 2~8 °C 避光保存。

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09J14106); 上海市公共卫生重点实验室建设计划(12GWZX0501); 上海市自然科学基金(13ZR1449400)

[作者简介] 戴小宇, 硕士研究生, 研究方向: 新药临床前安全性评价. Tel: (021) 81871035; E-mail: littlefishda@163.com

[通讯作者] 陆国才, 博士生导师, 教授, 研究方向: 新药临床前安全性评价. Tel: (021) 81871032; E-mail: newdrug@smmu.edu.cn

血液学检测试剂由西门子医学诊断产品(上海)有限公司生产,血清生化检测试剂购自复星长征医学科学有限公司。

1.1.2 主要仪器 拜耳 ADVIA2120 血球分析仪(德国)、日立 7080 全自动生化分析仪(日本)、C2000-4 型血凝分析仪(日本)、EasyLyte 型钠钾氯电解质分析仪(美国)、OLYMPUS BX41 型光学显微镜(日本)和 OLYMPUS DP12 数码相机(日本)等。

1.1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 80 只,6~8 周龄,雌雄各半,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2003-0002。

1.2 方法

1.2.1 剂量设计 根据大鼠药效学最低有效剂量 33.6 mg/kg,以及大鼠重复给药毒性前期试验结果提示大鼠可以耐受 342 mg/kg 剂量,且此剂量时的给药浓度已达最适可配浓度,设低、中、高给药剂量分别为 85.5、171.0、342.0 mg/kg。

1.2.2 动物分组及给药 动物分笼饲养于 SPF 级动物房,5 只/笼,自由摄食与饮水。动物房室温 20~26℃,相对湿度 40%~70%,光照周期 12 h。经检疫驯化 7 d 后,大鼠雌雄分别按体重随机分成空白对照组、纤维蛋白封闭剂低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 20 只,雌雄各半。低、中、高剂量给药剂量的给药剂量分别为 85.5、171.0 和 342.0 mg/kg,给药体积均为 15 ml/kg,相应的给药浓度分别为 5.7、11.4 和 22.8 mg/ml。空白对照组腹腔注射 15 ml/kg 生理盐水。连续给药 14 d,恢复期 28 d。

1.2.3 观察指标 每天观察和记录动物的活动及精神状况,皮毛和粪便的颜色及是否成形等。体质量每周称一次,根据体质量增长更新给药量,计算出每组动物的平均体质量,观察体质量增长的动态变化。食量每天称一次,算出每周每组动物的平均食量,观察其动态变化。分别在给药结束(第 14 天)和恢复期结束(第 42 天),各组均取 10 只大鼠(雌雄各半)静脉注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,经腹主动脉采血,进行血液生化指标和血液学指标检测。血液学指标包括红细胞(RBC)计数、血红蛋白(HGB)定量、血细胞比容(HCT)、红细胞平均容积(MCV)、红细胞平均血红蛋白容量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板计数(PLAT)、白细胞(WBC)计数和白细胞分类[中性粒细胞比例(NEUT%)、淋巴细胞比例(LYMPH%)、单核细胞比例(MONO%)、嗜酸性粒细胞比例(EOS%)和嗜

碱性粒细胞比例(BOS%)]、网织红细胞(RET)计数、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)和血浆纤维蛋白原(FIB)。血液生化指标包括血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TBI)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、总蛋白(TP)、白蛋白(AIb)、血糖(Glu)、总胆固醇(Tch)、三酰甘油(TG)、肌酸磷酸激酶(CPK)、血清钙(Ca)和血清磷(P)、血清钾(K)、血清钠(Na)和血清氯(Cl)。第 14 天及第 42 天各组麻醉大鼠完全放血安乐死后进行剖检,按《化学药长期毒性试验指导原则》要求摘取脏器,固定后进行组织切片,HE 染色后进行病理组织学检查。股骨骨髓涂片后进行骨髓细胞学检查,对心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、肾上腺、胸腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢质量进行测量并计算相对质量。

1.2.4 数据统计与处理 对于体质量、摄食量、血液学指标及血清生化检查指标等计量资料,均按照以下方法统计:①首先进行正态性检验;②如果资料符合正态性(检验 $P > 0.05$),则进行方差齐性分析,如果数据方差齐性,则进行方差分析检验(F 检验)。如果方差分析检验结果显著($P \leq 0.05$),则进一步用 LSD-t、Dunnett-t 参数检验法进行多重比较检验;如果方差分析结果不显著($P > 0.05$),则统计结束。③如果数据方差不齐性,则进行 Dunnett-T3 参数检验法进行多重比较检验。④如果资料不符合正态性,则进行 Kruskal-Wallis 检验(H 检验)和 Median 检验。如果 Kruskal-Wallis 检验结果显著($P \leq 0.05$),则进一步用非参数检验法进行两两比较检验;如果 Kruskal-Wallis 检验结果不显著,则统计结束。对于脏器病理变化比例等计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般状况 试验期间,各剂量组大鼠一般行为、活动、毛发、大小便与对照组相比未见明显异常。

2.2 体重、摄食量 与空白对照组相比,相同时间点给药组大鼠的体质量和摄食量未见与药物相关的明显变化。

2.3 血液学指标 与空白对照组相比,中、高剂量给药组大鼠第 14 天的 WBC 显著升高,FIB 显著降低。上述指标显现一定的剂量依赖性。其余部分指标虽有统计学差异,但均在正常范围内波动。结果见表 1。

表1 纤维蛋白封闭剂腹腔注射对大鼠血液学指标的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

项目	测定时间	空白对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
WBC($\times 10^9/L$)	第14天	5.34 \pm 1.17	6.19 \pm 1.73	7.57 \pm 1.88 ¹⁾	7.85 \pm 1.28 ²⁾
	第42天	5.90 \pm 2.09	6.12 \pm 1.47	6.01 \pm 2.07	6.00 \pm 2.46
NEUT(%)	第14天	13.7 \pm 5.7	16.2 \pm 7.1	15.3 \pm 4.8	19.3 \pm 6.8
	第42天	16.6 \pm 4.8	15.7 \pm 4.2	16.4 \pm 5.9	21.8 \pm 16.3
LYMPH(%)	第14天	81.5 \pm 5.6	78.1 \pm 7.4	78.7 \pm 5.6	73.2 \pm 7.5
	第42天	79.1 \pm 5.1	79.5 \pm 4.3	78.9 \pm 6.4	72.2 \pm 17.2
MONO(%)	第14天	1.8 \pm 0.4	2.3 \pm 0.7	2.3 \pm 0.8	2.7 \pm 1.1
	第42天	1.8 \pm 0.6	2.1 \pm 0.7	2.2 \pm 0.6	3.1 \pm 1.5 ¹⁾
FIB(g/L)	第14天	2.01 \pm 0.26	1.72 \pm 0.37	1.57 \pm 0.29 ²⁾	1.45 \pm 0.27 ²⁾
	第42天	1.82 \pm 1.57	1.67 \pm 0.37	1.70 \pm 0.32	2.10 \pm 0.65

¹⁾ $P < 0.05$, 与空白对照组比较; ²⁾ $P < 0.01$, 与空白对照组比较

2.4 血清生化指标 与空白对照组相比,各给药组大鼠第14天及第42天检测的生化指标无明显差异,表明受试物对ALT、AST、ALP、TBI、BUN、Cr、TP、Alb、Glu、Tch、LDH、CPK、TG、K、Na和Cl无明显影响。

2.5 骨髓细胞检查 骨髓涂片结果显示,粒细胞系统、红细胞系统、巨核细胞系统、淋巴细胞及单核细胞系统均未见异常增生。

2.6 对脏器重量的影响 脏器称重结果显示,第14天时大鼠脾脏重量有剂量依赖性升高趋势,第42天时基本能恢复。其余脏器未见明显影响。

表2 纤维蛋白封闭剂腹腔注射对大鼠脾脏绝对质量的影响($n=10, \bar{x} \pm s, g$)

时间	空白对照组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
第14天	0.672 \pm 0.166	0.746 \pm 0.185	0.813 \pm 0.152	0.866 \pm 0.274
第42天	0.748 \pm 0.191	0.719 \pm 0.206	0.748 \pm 0.204	0.805 \pm 0.192

2.7 病理学检查 病理组织学检查发现给药结束时中、高剂量组大鼠脾脏淋巴细胞增生;部分高剂量组动物的腹腔脏层腹膜组织,肉眼或镜下查见有注入的药剂残留诱发的瘤样隆起病灶,最大的直径达1.2cm,单发或多灶散在,灰白色。镜下观察病灶外裹厚层的增生纤维结缔组织,中心可见粉染的大量无定形胶样固态物(残留药物)。个别高剂量组大鼠病灶内还混有中性粒细胞(图1~3)。恢复期结束时各组大鼠未见药物相关的器质性病变。

3 讨论

局部止血药已在国外被广泛使用,但有临床报道手术中局部止血药残留会增加术后不良反应的发生,同时增加了术后CT、MRI等影像学对于术后恢

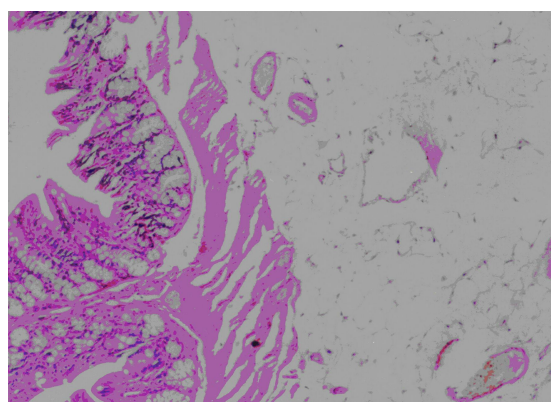


图1 空白对照组SD大鼠第14天
肠系膜组织结构(HE, $\times 100$)
注:肠系膜组织结构正常

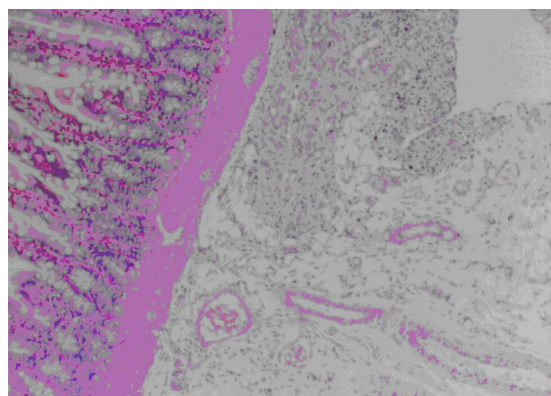


图2 高剂量组SD大鼠第14天
肠系膜组织结构(HE, $\times 100$)
注:肠系膜组织充血水肿,炎症细胞广泛浸润

复诊断的难度,甚至会把残留的止血药误诊为肿瘤或脓肿^[7-9]。因此手术过程中应尽可能避免使用过多的局部止血药。

本研究中的受试物纤维蛋白封闭剂是猪源的蛋白分子复合制剂,主要由凝血酶与纤维蛋白组成。凝血酶与纤维蛋白独立分装于Y型针管中的2个

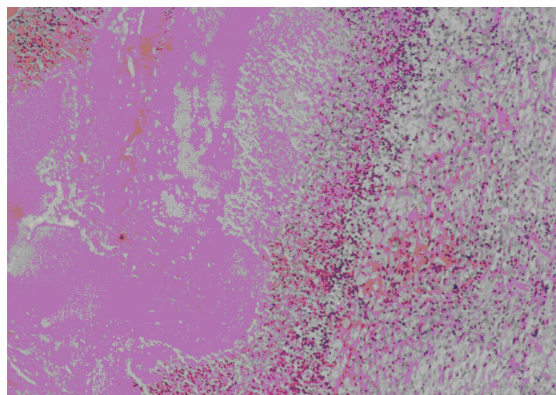


图 3 高剂量组 SD 大鼠第 14 天脏层
腹膜组织结构(HE, ×100)

注:炎性包块,中央为大片残存的粉染无定型固态
物(残存受试药物),外围为增生的纤维结缔组织

臂中,给药时,二组份于 Y 型针管的共同管道内混合并发生酶催化反应,到达给药部位表面时可快速凝固,并达到止血的目的。随着此类药物的临床应用越来越普遍,其安全性也越来越受到人们的关注^[10]。

本研究血液学指标发现高剂量组大鼠的 WBC 与空白对照组相比显著升高,可能与未完全吸收的药剂残留物在腹腔内引起炎症反应,形成纤维肉芽组织,并对大鼠腹腔局部具有一定刺激作用有关。表明给药剂量较高时,药物对给药部位存在一定的刺激性。

中、高剂量组大鼠纤维蛋白在第 14 天与对照组相比显著降低,脾脏绝对质量和相对质量有增加趋势,病理组织学检查发现中、高剂量组大鼠脾脏淋巴细胞增生,提示纤维蛋白封闭剂可能对动物的免疫系统有一定影响。

第 14 天变化的指标在恢复期结束时基本恢复,并且病理组织学观察中脾脏未见明显异常,表明药物的毒性作用较轻且可逆。

因此,纤维蛋白封闭剂 85.5~342.0 mg/kg 连续腹腔注射大鼠 14 d,安全剂量为 85.5 mg/kg,

171.0 mg/kg 剂量以上时可致血液系统的 WBC 增加、纤维蛋白减少、脾脏质量增加,药物也不能完全被吸收,药剂残留物在腹腔内可能会导致纤维肉芽组织形成,但上述毒性作用均可逆。临床使用时应注意药物较高剂量使用时对毒性靶部位血液系统、免疫系统和给药局部可能存在的影响,避免发生术后不良反应。

【参考文献】

- [1] Spotnitz WD. Hemostats, sealants, and adhesives: a practical guide for the surgeon[J]. *Am Surg*, 2012, 78(12):1305-1321.
- [2] 王平瑜,白雪峰,王保卫,等.人纤维蛋白胶对人肝损伤的止血护创作用[J].*中国医学创新*, 2011, 8(6):9-11.
- [3] 谢钧韬,叶建宇,尹耀新,等.纤维蛋白封闭剂在腹腔镜胆囊切除术后右副肝管处理中的应用[J].*中华腔镜外科杂志(电子版)*, 2010, 3(2):205-207.
- [4] Mao Y, Xia ZN, Zhang XF, *et al*. Evaluation of subchronic toxicity of SIM010603, a potent inhibitor of receptor tyrosine kinase, after 28-day repeated oral administration in SD rats and beagle dogs[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5):1256-1270.
- [5] Gong XL, Gao TT, Zhao LJ, *et al*. Subchronic safety evaluation of CMS-1 (a botanical antihypertensive product derived from *Semen Cnidium monnieri*) in Sprague-Dawley rats and beagle dogs[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2014, 69(3):558-571.
- [6] 王春仁,王召旭,宋谊萍,等.医用纤维蛋白胶急性毒性实验研究[J].*中国药事杂志*, 2007, 21(7):472-477.
- [7] Bjorenson JE, Grove HF, List MG Sr, *et al*. Effects of hemostatic agents on the pH of body fluids[J]. *J Endoc*, 1986, 12:289.
- [8] Ibrahim MF, Aps C, Young CP. A foreign body reaction to Surgicel mimicking an abscess following cardiac surgery [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 22(3):489-490.
- [9] Chapman WC, Wren SM, Lebovic GS, *et al*. Effective management of bleeding tumor resection with a collagen-based hemostatic agent[J]. *Am Surg*, 2002, 68(9):802-807.
- [10] Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review [J]. *J Artif Organs*, 2005, 8(3):137-142.

[收稿日期] 2014-08-27 [修回日期] 2014-12-30

[本文编辑] 陈 静