

· 研究报告 ·

雾化吸入痰热清、喜炎平对大鼠肺部的刺激性研究

谭 宁,李鹏跃,董博宇,赵梦迪,杨 柳,陆 洋(北京中医药大学中药学院,北京 100029)

[摘要] 目的 研究中药复方痰热清和单成分喜炎平注射液的雾化吸入对大鼠肺部的刺激性。方法 每种药物分为高、低浓度 2 个实验组,对照组灌以生理盐水。雾化吸入药物给药 7 d 后处死大鼠。采用大鼠支气管肺泡灌洗术,测定灌洗液中总蛋白含量和 LDH 酶活性,以判断两种药物对大鼠肺部的损伤程度。结果 痰热清低、高浓度组肺泡灌洗液中蛋白质浓度分别为:(193.78±27.74)、(235.33±50.41) μg/ml;喜炎平两组蛋白质浓度为:(174.02±17.82)、(227.27±66.03) μg/ml;LDH 酶活力单位依次为:1 065.21±181.76、1 467.33±101.87;307.97±47.56、1 377.29±566.48。经 *t* 检验,与对照组相比,痰热清和喜炎平(低浓度和高浓度)对肺泡灌洗液中总蛋白含量无显著影响,但均能增加 LDH 酶的活力($P<0.05$),且与浓度呈正相关;低浓度痰热清组的 LDH 酶活力显著高于低浓度喜炎平组($P<0.05$)。结论 雾化吸入痰热清、喜炎平对大鼠呼吸系统有一定的刺激性,故不宜采用雾化吸入的给药方式。

[关键词] 肺部给药;痰热清;喜炎平;支气管肺泡灌洗术;刺激性

[中图分类号] R944.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)04-0348-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.04.016

Study on the rat pulmonary irritation of aerosol inhaled Tanreqing and Reduning

TAN Ning, LI Pengyue, DONG Boyu, ZHAO Mengdi, YANG Liu, LU Yang (School of Chinese material medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To study the rat pulmonary irritant of aerosol inhaled Tanreqing and Reduning injection. **Methods** Rats were divided into two groups for each medicine (low concentration group and high concentration group), nebulized drug administration for seven days, with the control group irrigated with saline, and were sacrificed. Through bronchoalveolar lavage, excurrent bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was used for total protein determination and LDH vitality test to evaluate pulmonary toxicity of two medicines. **Results** The protein concentrations of two groups in low and high concentrations of Tanreqing and Reduning respectively are (193.78±27.74), (235.33±50.41) μg/ml; (174.02±17.82), (227.27±66.03) μg/ml; LDH vitalities respectively are 1065.21±181.76, 1467.33±101.87; 307.97±47.56, 1377.29±566.48. By *t*-test, compared with normal saline, there was no significant effect among these five groups on protein concentration, but these two medicine were able to improve LDH activity ($P<0.05$) which was more obvious in high concentration group. When two medicines were in low concentration, LDH activity was higher in Tanreqing group with statistical significance ($P<0.05$). **Conclusion** Aerosol inhaled Tanreqing and Reduning injection in rats have some pulmonary irritation and potential safety hazard in this delivery way.

[Key words] pulmonary delivery; Tanreqing; Reduning; excurrent bronchoalveolar lavage; irritation

肺部给药系统(pulmonary drug delivery system, PDDS)可直接将药物递送至肺部,代谢少、剂量小、不良反应发生率低,临床上已广泛用于治疗哮喘、慢性肺阻塞等呼吸系统疾病,疗效显著^[1]。国内有关中药 PDDS 的现代研究始于 20 世纪 60 年代,

在现代中药制剂中,包括用于肺部和呼吸道局部治疗的双黄连气雾剂、雾化吸入鱼腥草制剂等,以及达到全身治疗目的的复方丹参气雾剂、川芎茶调气雾剂等至少 50 多个配方^[2]。但中药注射剂改变剂型,配制成的雾化吸入制剂未经国家食品药品监督管理总局(CFDA)审批,临床用药存在用药剂量及疗程不明确、超说明书使用等现象,用药安全性值得关注。因此,笔者探究两种常用的中药注射剂痰热清和喜炎平在雾化吸入时对大鼠呼吸系统是否存在刺激性。

复方痰热清和单成分喜炎平注射液是临床应用

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473363);北京市科技新星计划(xx2015A048)

[作者简介] 谭 宁,硕士研究生。Tel:18810467208;E-mail:tan22ning@163.com

[通讯作者] 陆 洋,副教授,硕士生导师。研究方向:中药新剂型和新技术研究。Tel:(010)84738615;E-mail:landocean28@163.com

时间长、治疗效果显著的常用中药注射剂。其中,痰热清注射液为中药二类新药,具有清热化痰、抗病毒、抗炎和抗惊厥等作用,目前广泛用于治疗肺炎早期、急性支气管炎、慢性支气管炎急性发作、单纯性及并发感染性肺炎、小儿急性支气管炎等^[3],雾化吸入痰热清对于上述病症有明显的治疗效果^[4]。喜炎平注射液由穿心莲内酯磺化物加工制成,具有广谱的抗菌、抗病毒、解热及增强免疫力的作用,尤其是对腺病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒有明显的灭活作用^[5]。雾化吸入喜炎平广泛用于治疗小儿疱疹性咽峡炎^[6]、小儿毛细支气管炎^[7]、手足口病^[8]、成人急性上呼吸道感染^[9]等。本实验构建大鼠雾化吸入模型,探究给药一定时间后,两种中药注射剂对大鼠肺部的刺激性,以达到规范临床用药的目的。

1 仪器和材料

1.1 仪器 压缩空气式雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司 403M 型仪器,编号:13101855)、自制口鼻暴露式雾化吸入箱、CT15RT 型台式高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备有限公司)、Multiskan Go 型酶标仪(美国 Thermo Fisher)、96 孔板(美国 Corning Incorporated)。

1.2 动物 雄性成年 SD 大鼠 20 只,250~300 g, SPF 级。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验期间固体饲料饲养,自由饮水。

1.3 试药 痰热清注射液(批号:1411317,上海凯宝药业股份有限公司,国药准字 Z20030054)、喜炎平注射液(批号:2014111403,江西青峰药业有限公司,国药准字 Z20026249)。

1.4 试剂 氯化钠(西陇化工股份有限公司,AR 分析纯)、纯净水(娃哈哈集团有限公司)、BCA 试剂盒(北京赛驰生物)、LDH 试剂盒(南京建成);试剂 A:底物缓冲液;试剂 B:11.3 mmol/L 氧化型辅酶 I 溶液;试剂 C:1 mmol/L 2,4-二硝基苯肼、5 μmol/ml 丙酮酸钠标准母液、0.6 mol/L NaOH 终止试剂。

2 实验方法

2.1 给药情况 实验随机分为对照组和 4 个实验组,每组 4 只大鼠。空白对照组给予 0.9% 生理盐水。实验组分别为痰热清和喜炎平的高浓度和低浓度组,两药高浓度组吸入雾化药物与生理盐水的配比浓度为 1:1,低浓度组配比浓度为 1:10。大鼠口鼻局部暴露式雾化吸入药物,每组每次给药

20 min,2 次/d,共 7 d。

2.2 支气管肺泡灌洗术 大鼠连续给药 7 d 后,于第 8 天处死,行支气管肺泡灌洗术。用 2.5 ml 生理盐水灌洗,回抽液放入 10 ml 离心管中(冰水浴),记录数据。重复上述步骤,完成 2 次灌洗。将所得标本计量后,于 4℃、以 1 500 r/min 离心 15 min,取上清液用 BCA 法进行蛋白含量的测定,并测定其中 LDH 的酶活性。

2.3 BCA 法测定蛋白含量 Bicinchoninic acid (BCA)法是近年来广为应用的蛋白定量方法。其原理为:在碱性环境下,蛋白质使 Cu^{2+} 还原成 Cu^{+} ,2 分子的 BCA 与 1 个铜离子螯合,形成紫色的反应复合物,该水溶性的复合物在 562 nm 处显示强烈的吸光性;吸光度与蛋白浓度在广泛范围内有良好的线性关系,可根据吸光度推算出蛋白浓度。检测过程中各种试剂的用法和用量严格按照 BCA 试剂盒使用说明书进行。

标准曲线的绘制与操作:将试剂 A 和试剂 B 按照 50:1 的比例配制成 BCA 工作液;取 10 μl 适量 50 mg/ml 蛋白标准液,加入 990 μl 稀释液稀释至 0.5 mg/ml,现用现配;将表 1 中试剂按相应比例混匀后,于 37℃ 放置 30 min,冷却至室温,于 562 nm 处测定溶液的吸光度,并根据标准曲线计算蛋白浓度。

表 1 BCA 试剂盒试剂配比关系表(V/μl)

试剂名称	编号								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蛋白标准液	0	1	2	4	8	12	16	20	—
标准稀释液	20	19	18	16	12	8	4	0	—
样品	—	—	—	—	—	—	—	—	20
BCA 工作液	200	200	200	200	200	200	200	200	200

2.4 LDH 酶活性测定 乳酸脱氢酶(LDH)以氧化辅酶(作为氢受体,在 LDH 的催化作用下使乳酸脱氢生成丙酮酸,丙酮酸与显色剂 2,4-二硝基苯肼生成丙酮酸二硝基苯腙,其在碱性溶液中呈棕红色,颜色深浅与丙酮酸浓度成正比,因此可推算 LDH 的活性。正常肺组织中的 LDH 主要来自肺部上皮细胞的主动分泌和脱落细胞的分解释放,而在受损肺组织中,由于呼吸道上皮的黏膜完整性被破坏,释放的 LDH 酶含量增加。由此可以判断药物对黏膜的损伤程度。

2.4.1 操作步骤 取 10 μl 标准品加入到 96 孔板中;试剂 A 与试剂 B 以 5:1 的体积比混合,取 60 μl

混合液加至各孔,充分混匀,37℃水浴15 min;加入2,4-二硝基苯肼 50 μl,与标准品或样本充分混合,37℃水浴15 min;加入150 μl 终止试剂,充分混合;室温放置3 min后,于440 nm 波长处测定。

2.4.2 标准曲线的确立 将丙酮酸钠标准品母液用底物缓冲液稀释成7个浓度:2.5、2、1.5、1、0.5、0.25、0.125 μmol/ml。丙酮酸钠浓度与LDH活力单位的关系为1:1 000。

丙酮酸钠 0 μmol/ml 的孔只加 10 μl 底物缓冲液,以此孔作为空白管调零,于440 nm 处读取吸光度,以其相应的酶活力单位作图,得出标准曲线,并计算灌洗液中LDH的活力单位。

2.5 统计学处理 用SPSS 9.3 软件分析数据,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用*t* 检验,以*P*<0.05为有统计学意义。

3 实验结果

3.1 肺泡灌洗液回收率考察 两组的肺泡灌洗液平均回收率均在80%以上,符合实验要求。对照组的回收率为(81±7)% ,实验组结果见表2。

表2 肺泡灌洗液回收率测定结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	低浓度(1:10)	高浓度(1:1)
痰热清组	87±12	89±11
喜炎平组	81±16	84±16

3.2 灌洗液上清液试剂盒测定结果

3.2.1 标准曲线的绘制 BCA法测定蛋白质含量标准曲线见图1,在0~500 μg/ml 范围内,蛋白浓度与吸光度的线性回归方程为 $Y=0.0011X+0.0021$, $r=0.9984$,符合实验要求。

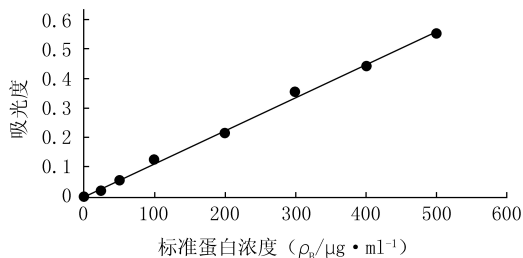


图1 BCA 蛋白质含量测定标准曲线

LDH 酶活力含量标准曲线如图2所示,在0~2 500活力单位范围内,LDH 活力单位与吸光度的回归方程为 $Y=0.0002X+0.0006$, $r=0.9997$,符合实验要求。

3.2.2 蛋白质含量和LDH 酶活力测定结果 4个

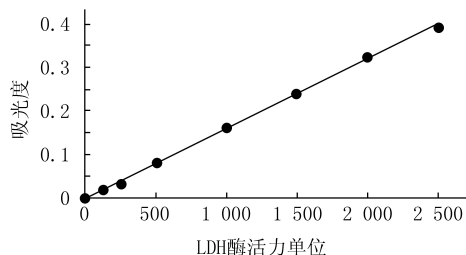


图2 LDH 酶活力单位标准曲线

实验组与对照组相比,蛋白浓度虽有所增加,但差异无统计学意义;LDH 活性差异显著(*P*<0.05)。实验组LDH 活力均大于对照组,且两种药物实验组的组内对比显示,高浓度组LDH 活力分别大于低浓度组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。当药物浓度同处于低浓度时,两种药物测出的LDH 活力存在差异(*P*<0.05),痰热清组的LDH 活力高于喜炎平组,但在高浓度组中两药无此特征。

表4 BCA 和LDH 试剂盒测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

	蛋白质浓度($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) LDH 酶活力单位	
对照组	183.42±17.86	24.08±31.53
痰热清低浓度组	193.78±27.74	1 065.21±181.76*
痰热清高浓度组	235.33±50.41	1 467.33±101.87*#
喜炎平低浓度组	174.02±17.82	307.97±47.56*△
喜炎平高浓度组	227.27±66.03	1 377.29±566.48*#

* *P*<0.05,与对照组比较;# *P*<0.05,与痰热清、喜炎平低浓度组比较;△ *P*<0.05,与痰热清低浓度组比较

3 讨论

基于传统中医实践及现代雾化技术的中药雾化吸入治疗方兴未艾,但目前的研究过分强调临床疗效,中药注射剂成分复杂,将其雾化吸入后的用药安全性常被忽视,并且国内外鲜有文献报道研究中药注射剂作为雾化吸入剂的刺激性。本实验选择两种常用于雾化吸入治疗的中药注射液痰热清和喜炎平作为考察对象,初步探究两者雾化吸入后的刺激性。

本研究发现,与对照组相比,雾化吸入痰热清和喜炎平蛋白含量增幅较小,无统计学差异,但LDH 活力明显增强(*P*<0.05)。灌洗液中蛋白质浓度的高低、LDH 活力的大小主要与肺部作用机制和液滴大小有关。一定大小的药液滴进入肺泡腔后,会被巨噬细胞吞噬,产生炎症介质和趋化因子,使肺泡、毛细血管屏障的通透性增加,血浆蛋白溢出,导致肺泡灌洗液中蛋白含量增高。同时,由于细胞受损后崩解,内容物大量释放,检测到LDH 的含量升高;

(下转第356页)

过表达可明显增加小鼠中枢神经系统海马星形胶质细胞的数量,导致海马区脑电图癫痫样改变^[5]。上述研究表明,IL-2和IL-6参与了癫痫的发病。

本研究证实模型组大鼠海马区IL-2和IL-6明显高表达,与文献报道相一致。通过姜黄素的治疗,癫痫发作等级明显降低,表明姜黄素具有一定的抗癫痫作用。更为重要的发现是,姜黄素组大鼠海马区的IL-2和IL-6水平明显降低,高剂量组降低更为显著,表明姜黄素有可能是通过降低IL-2和IL-6的表达水平发挥抗癫痫作用,为姜黄素治疗癫痫发作提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] Iori V, Frigerio F, Vezzani A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 26: 118-123.
- [2] Liu ZS, Wang QW, Wang FL, et al. Serum cytokine levels are altered in patients with west syndrome [J]. *Brain Dev*, 2001, 23(7): 548-551.
- [3] 向赞,董大翠,刘庆莹,等.马桑内酯致大鼠海马IL-2免疫反应性的变化[J].*江汉大学学报(自然科学版)*, 2003, 31(2): 17-21.

- [4] Ravizza T, Rizzi M, Perego C, et al. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus [J]. *Epilepsia*, 2005, 46(S5): 113-117.
- [5] Lehtimäki KA, Kernen T, Huhtala H, et al. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration [J]. *J Neuroimmunol*. 2004, 152(1-2): 121-125.
- [6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II. motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294.
- [7] 文帅,梁日生,杨卫忠.姜黄素神经保护作用与癫痫[J].*国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(1): 46-49.
- [8] Shin HJ, Lee JY, Son E, et al. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 416(1): 49-54.
- [9] Agarwal NB, Jain S, Agarwal NK, et al. Modulation of pentylenetetrazole-induced kindling and oxidative stress by curcumin in mice [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(8-9): 756-759.
- [10] Mehla J, Reeta KH, Gupta P, et al. Protective effects of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model [J]. *Life Sci*, 2010, 87(19-22): 596-603.

[收稿日期] 2015-08-27 [修回日期] 2016-03-04

[本文编辑] 李睿雯

(上接第350页)

而在蛋白质含量检测中无明显统计学差异,表明痰热清、喜炎平和生理盐水对肺部的刺激性在BCA蛋白检测中结果相似。这可能是由雾化液滴、雾化速度等物理因素造成的,具体原因还需进一步实验探究。同种药物组内对比显示,药物处于高浓度时,LDH活力系数更大,原因是当雾化吸入药物的浓度过高时,细胞损伤加重,内容物大量释放。

两种药物组间对比结果显示,当药物处于低浓度时,痰热清组的LDH活力强于喜炎平组。从注射剂组成上看,痰热清注射剂成分较为复杂,黄芩中的黄芩苷、熊胆粉中的熊总胆酸、山羊角的水解物、金银花中的绿原酸、连翘中的连翘苷,这些会诱发过敏反应的过敏原都有可能造成肺部刺激。特别是绿原酸和山羊角水解物,皆属于已知的高致敏物质。而喜炎平注射液系纯中药制剂,其主要成分为穿心莲内酯磺化物,成分简单、纯度高,对呼吸系统的刺激性较复方注射剂小。当吸入药物达到高浓度时,两药对LDH活力的影响差异不显著,这可能与血氧浓度达到饱和或者刺激性已达到最大有关。

本实验表明,雾化吸入痰热清和喜炎平可能会对肺部和呼吸道产生刺激性,两种药物经雾化吸入给药均存在安全隐患。临床使用时,除了慎重选择

雾化吸入药物以外,还应注意给药剂量,以免给药剂量过大对肺部造成更大程度的损伤。

【参考文献】

- [1] 凌祥,沈雁,孙春萌,等.肺部给药研究近况[J].*药学研究*, 2014, 33(12): 711-714.
- [2] 王淳,刘晓彬,权丽辉,等.中药肺部给药系统应用进展[J].*世界科学技术:中医药现代化*, 2007, 9(1): 59-64.
- [3] 雷卫平,吴英梅,林翠芬.痰热清注射液的临床应用[J].*国际医药卫生导报*, 2005, 11(14): 110-113.
- [4] 张妍,杨毅恒,刘芳,等.痰热清注射液雾化吸入治疗呼吸系统疾病的系统评价[J].*中国医院用药评价与分析*, 2010, 10(6): 483-487.
- [5] 唐韵.喜炎平注射液临床应用近况[J].*世界临床药物*, 2014, 35(3): 184-188.
- [6] 万珍,徐志锋,林俊明,等.喜炎平超声雾化吸入治疗成人急性上呼吸道感染疗效观察[J].*新中医*, 2014, 46(6): 57-59.
- [7] 张华静,郑德瑜.喜炎平注射液联合利巴韦林雾化吸入治疗小儿疱疹性咽峡炎观察[J].*中医药临床杂志*, 2014, 26(12): 1247-1248.
- [8] 王晶,任吉祥,谢雁鸣,等.喜炎平注射液治疗手足口病的系统评价[J].*中国中药杂志*, 2013, 38(18): 3215-3222.
- [9] 耿红,吴明杰.喜炎平雾化吸入后拍背吸痰佐治小儿毛细支气管炎的临床观察[J].*临床合理用药杂志*, 2012, 5(6B): 70

[收稿日期] 2015-08-22 [修回日期] 2016-01-03

[本文编辑] 李睿雯