

实验

引用:宋玲,高云航,李晗,陈腾飞,侯红平,彭博,陈輝亚,叶祖光,张广平.清咽利喉雾化液雾化吸入给药的安全性和药效研究[J].中医药导报,2025,31(3):10-17.

清咽利喉雾化液雾化吸入给药的安全性和药效研究^{*}

宋 玲,高云航,李 晗,陈腾飞,侯红平,彭 博,陈輝亚,叶祖光,张广平
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

[摘要] 目的:通过对清咽利喉雾化液进行安全性评价和药效学研究,评估清咽利喉雾化液吸入给药的可行性。方法:参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》,通过病理检查及肺泡灌洗液白细胞计数来观察清咽利喉雾化液吸入给药对大鼠呼吸道黏膜的刺激性反应。通过对过敏反应症状的观察来探究其对豚鼠的过敏反应。体内实验方面,将清咽利喉雾化液分为低(雾化5 min)、中(雾化10 min)、高(雾化20 min)3个剂量,采用浓氨水引咳法研究清咽利喉雾化液吸入对咳嗽小鼠的止咳作用,应用酚红排泌法研究其对酚红排泌模型小鼠的祛痰作用。体外实验方面,将清咽利喉雾化液分为低(0.10%)、中(0.25%)、高(0.50%)3个剂量,采用BioTekCytation5高内涵成像仪,通过三染法观察不同浓度的清咽利喉雾化液对香烟烟雾提取液(CSE)诱导的BEAS-2B细胞和细菌内毒素(LPS)诱导的MH-S细胞的细胞膜和线粒体损伤的保护作用。采用CSE诱导BEAS-2B细胞损伤,采用LPS诱导MH-S细胞损伤,观察清咽利喉雾化液对BEAS-2B细胞损伤及MH-S细胞损伤的保护作用。采用H₂O₂诱导MH-S细胞氧化应激,探讨清咽利喉雾化液对MH-S细胞氧化应激的影响。结果:清咽利喉雾化液吸入给药对大鼠鼻黏膜和口腔黏膜均无明显的刺激性,亦未出现豚鼠全身过敏反应。小鼠咳嗽实验中,阳性对照组小鼠咳嗽潜伏期长于模型对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),阳性对照组和清咽利喉雾化液高剂量组小鼠咳嗽次数少于模型对照组($P<0.05$);酚红排泌实验中,阳性对照组、清咽利喉雾化液高剂量组、清咽利喉雾化液中剂量组小鼠酚红排泌均高于模型对照组($P<0.01$)。体外实验中,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组对CSE诱导的BEAS-2B细胞和LPS诱导的MH-S细胞的损伤都有保护作用;清咽利喉雾化液高剂量组能降低CSE诱导的BEAS-2B细胞和LPS诱导的MH-S细胞的IL-1 β 和TNF- α 的含量;清咽利喉雾化液低、中、高剂量组对H₂O₂诱导的MH-S细胞氧化应激有改善作用,其中清咽利喉雾化液高剂量组能升高H₂O₂诱导的MH-S细胞的SOD水平。结论:清咽利喉雾化液吸入给药未对大鼠口腔黏膜、咽喉部组织及呼吸系统造成明显的刺激作用,豚鼠未产生全身过敏反应。清咽利喉雾化液吸入给药具有一定止咳祛痰功效。清咽利喉雾化液对CSE导致的BEAS-2B细胞损伤、LPS诱导的MH-S细胞损伤以及H₂O₂诱导的MH-S细胞氧化应激均有一定的改善作用。

[关键词] 清咽利喉雾化液;雾化吸入;安全性;镇咳祛痰;细胞损伤保护;小鼠;豚鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)03-0010-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.03.003

Experimental Study on the Safety and Pharmacology of Aerosol Inhalation of Qingyan Lihou Atomization Liquid (清咽利喉雾化液雾)

SONG Ling, GAO Yunhang, LI Han, CHEN Tengfei, HOU Hongping, PENG Bo,
CHEN Weiya, YE Zuguang, ZHANG Guangping

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To explore the feasibility of aerosol inhalation of Qingyan Lihou atomization liquid through safety of inhalation and pharmacology study *in vivo* and *vitro*, provide reference for clinical application. Methods: According to *The Technical Guidelines for The Study of Irritability, Hypersensitivity and Hemolysis of Drugs*, the irritative reaction of Qingyan Lihou atomization liquid inhalation on rat respiratory

*基金项目:中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A04615);中国中医科学院中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015);国家自然科学基金青年项目(82204740)

通信作者:张广平,男,研究员,研究方向为中药呼吸系统药理

mucosa were investigated by pathological examination and leukocyte count in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The anaphylaxis of guinea pigs was studied by observing the symptoms of anaphylaxis. *In vivo*, Qingyan Lihou atomization liquid was divided into three doses, low dose (atomization for 5 min), medium dose (atomization for 10 min) and high dose (atomization for 20 min). The antitussive effects of Qingyan Lihou atomization liquid were observed using the concentrated ammonia water cough method. The expectorant effects of Qingyan Lihou atomization liquid were established by phenol red expectorant test on mice. *In vitro*, Qingyan Lihou atomization liquid were divided into three doses, low dose (0.10%), medium dose (0.25%) and high dose (0.50%). Protection of Qingyan Lihou atomization liquid on damage of cell membrane and mitochondria in BEAS-2B cell induced by CSE and MH-S cell induced by LPS were detected by cell triple staining method through BioTekCytation5 high content imaging. It was used to verify whether Qingyan Lihou atomization liquid can suppress inflammation in BEAS-2B cell induced by CSE and MH-S cell induced by LPS. Influence on oxidative stress of MH-S cell was discussed by MH-S cell induced by H₂O₂. Results: Aerosol inhalation of Qingyan Lihou atomization liquid didn't show obvious irritation on oral and nasal mucosa of rats, and active whole body allergy test was negative. In ammonia cough method, the positive control group showed longer cough latency than model group ($P<0.01$), and the positive control group and high dose group showed less coughing frequency than model group ($P<0.01$ or $P<0.05$). In the method of phenol red excretion experiment, the positive control group, high dose group and medium dose showed more tracheal phenol red excretion than model group ($P<0.01$). *In vitro*, low dose, medium dose and high dose groups showed protective effect on damage of BEAS-2B cells induced by CSE and MH-S cells induced by LPS. The content of IL-1 β and TNF- α were significantly decreased in BEAS-2B cells induced by CSE and MH-S cells induced by LPS, in the high dose group. Low dose, medium dose and high dose groups improved the oxidative stress of MH-S cells induced by H₂O₂, and the high dose group significantly increased the SOD level of MH-S cells induced by H₂O₂. Conclusion: There was no obvious irritation of oral mucosa, throat tissue and respiratory system in rats, and no systemic allergic reaction was observed in guinea pigs. Inhalation of Qingyan Lihou atomization liquid showed antitussive and expectorant effect. Qingyan Lihou atomization liquid had protective effects on BEAS-2B cell injury induced by CSE, MH-S cell injury induced by LPS and oxidative stress induced by H₂O₂.

[Keywords] Qingyan lihou atomization liquid; inhalation; safety; antitussive and expectorant; cell injury protection; mice; guinea pig

吸入制剂是一种特殊的通过呼吸道、肺部给药的剂型。其以气溶胶或蒸气形式,将溶解或分散于合适液体或固体介质中的原料药递送至肺部,以发挥局部或全身作用^[1]。2020年版《中华人民共和国药典》收录的吸入制剂剂型包括压力定量吸入气雾剂、吸入粉雾剂、吸入喷雾剂、吸入液体制剂和可转变为蒸气的制剂^[2]。相对于压力定量吸入气雾剂^[3-5]、吸入粉雾剂^[6-7]、吸入喷雾剂^[8],雾化吸入给药制剂工艺相对简单,自主呼吸即可,适用于儿童、老年人和重症患者,临床使用广泛^[8]。雾化吸入制剂是由药物处方和雾化装置组成的药械组合产品^[9]。除了临床常用射流雾化、超声雾化、网式雾化外,目前电子热蒸发雾化装置采用丙二醇或/和丙三醇为溶媒,通过高温加热雾化液,使蒸气被气流带入雾化通道并与冷空气混合,随后在雾化通道运动过程中水蒸气冷凝成核生长形成气溶胶^[10-12]。由于输出微粒为气态冷凝生成,电子热蒸发雾化装置具有雾化速度快、受环境影响少、对患者吸气流速和收口协调操作无特殊要求等优点。清咽利喉雾化液由金银花、胖大海、橘红3味中药提纯制备而成,助溶剂为丙二醇^[13]。清咽利喉雾化液具有清热解毒、化痰利咽的功效,可用于舒缓咽喉不适。为评估清咽利喉雾化液雾化吸入给药的可行性,本研究进行了动物口鼻暴露吸入肺部的安全性研究^[14-15],同时也进行了

体内外的药效研究,即小鼠的止咳化痰实验及体外细胞实验。

1 材 料

1.1 实验动物与细胞 SPF级SD大鼠,6~8周龄,体质量170~200 g,28只,雌雄各半,动物质量合格证号:110011221101211881,110011221101211775。SPF级Hartley豚鼠,5~6周龄,体质量300~330 g,24只,雌雄各半,动物质量合格证号:111251221100227362。SPF级昆明小鼠,3~4周龄,体质量18~20 g,70只,雌雄各半,动物质量合格证号:110011221103420534,110011221103420676。SPF级ICR小鼠,3~4周龄,体质量18~20 g,64只,雌雄各半,动物质量合格证号:110011221105765328,110011221105765476。豚鼠购自中国食品药品检定研究院(大兴),动物生产许可证号:SCXK(京)2022-0002。SD大鼠、昆明小鼠、ICR小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0011。动物饲养于中国中医科学院中药研究所SPF级动物房,使用许可证号:SCXK(京)2021-0011。饲养条件为12 h/12 h明暗交替,温度(23 ± 1)℃,湿度(50 ± 15)%,自主饮水及进食。本研究已通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会审查(编号:2022B015)。

MH-S细胞(小鼠肺泡巨噬细胞)购于北京协和细胞资源中心。BEAS-2B(人肺正常上皮细胞)购于美国类型培养物收

集中心(ATCC)。

1.2 药物与试剂 清咽利喉雾化液(北京罗麦有限公司,批号:20211009);氢溴酸右美沙芬分散片(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:A2110004);氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号:2111251904);甲醛[福晨(天津)化学试剂有限公司,批号:L20190920];卵白蛋白(美国Sigma公司,批号:SLCH2414);浓氨水(25%~28%)[福晨(天津)化学试剂有限公司,批号:20211010];盐酸氨溴索(浙江康恩贝制药股份有限公司,批号:190519);苯酚红(索莱宝生物科技有限公司,批号:119L031);碳酸氢钠[福晨(天津)化学试剂有限公司,批号:20190507];氢氧化钠溶液(0.1 mol/L)(北京北化亿源科技有限公司,批号:20220606);PBS(北京索莱宝科技有限公司,批号:20221010);CCK-8(日本Dojindo,批号:SH949,TV535);支气管上皮细胞基础培养基(美国LONZA公司,批号:0001083921);活细胞成像溶液(批号:2229619,229639)、活细胞红色荧光染料(批号:2201587)、TO-PROTM-1 Iodide(批号:2201587)、氧化应激反应剂(批号:2256813)均购自美国Invirtrogen公司;Hoechst 33342(上海碧云天生物技术有限公司,批号:040320200713);小鼠白介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号:20230314)、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒(批号:20230105)、人IL-1 β ELISA试剂盒(批号:20230314)、人TNF- α ELISA试剂盒(批号:20221216)均购自北京索莱宝科技有限公司;RPMI-1640培养基(美国Gibco公司,批号:8122298);胰酶溶液(0.25%)(批号:J210005)、特级胎牛血清(批号:DG29872782)均购自美国HyClone公司;青霉素-链霉素溶液(100X)(北京索莱宝科技有限公司,批号:20220219);丙二醛(MDA)ELISA试剂盒(批号:20220310)、超氧化物歧化酶(SOD)ELISA试剂盒(批号:20220314)均购自南京建成生物工程研究所。

香烟烟雾撮液(CSE)的制备:将50根香烟放置于吸烟机接口,吸烟机连接100 mL抽滤瓶,抽滤瓶的另一端通过循环水泵。瓶中放置50 mL PBS,香烟设置以165 s/只的速度燃烧,抽滤瓶收集香烟烟雾。制备好烟雾悬液后密闭摇匀,调节pH值至7.4,并以0.22 μ m过滤膜过滤,此制备的溶液即为100%的CSE。

1.3 主要仪器 小动物口鼻暴露塔(美国DSI公司,型号:601-2202-002 Rev04);浓度监测仪(英国CASELLA公司,型号:CEL-712 Microdust Pro);电子分析天平(德国Sartorius公司,型号:BSA3202S-CW);脱水机(日本樱花精机株式会社,型号:Tissue-Tek VIPTM 5);包埋机(日本樱花精机株式会社,型号:Tissue-Tek TECTM6);切片机(德国恩斯特·徕茨公司,型号:Leica 2135);染色封片(日本樱花精机株式会社,型号:Tissue-Tek@ PrismaT M);阅片显微镜(日本奥林巴斯,型号:BX51型);镜检拍照显微镜(德国恩斯特·徕茨公司,型号:DMC5400型);多功能诱咳引喘仪(济南益延科技发展有限公司,型号:YLS-8A);超净台(北京亚天克隆仪器技术有限公司);二氧化碳培养箱(德国Thermo公司,型号:HERAcell 240i);倒置显微镜(日本OLYMPUS公司,型号:5L41139);酶标仪(美国Molecular Devices公司,型号:SpectraMax i3x);

全自动细胞成像多功能检测器(美国Bioteck公司,型号:Cytation5 imaging reader)。

2 方 法

2.1 大鼠呼吸道黏膜刺激性实验 实验方法参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[15]。SD大鼠共28只,雌雄各半,随机分为阴性对照组(14只)和雾化吸入给药组(14只)。给药时将雾化接口与口鼻暴露装置连接,固定大鼠于口鼻暴露塔内,连续给药60 min,1次/d,连续给药7 d。阴性对照组同法给予空气。末次给药后24 h,各组取8只大鼠(雌雄各半),其余动物停药7 d后处理。末次给药后24 h,麻醉大鼠,暴露胸腔,右叶结扎,用生理盐水灌洗左肺,测定白细胞计数及其分类。取大鼠鼻腔黏膜、口腔黏膜、咽喉部、气管及肺部等脏器置于10%福尔马林溶液固定。鼻腔经5%的甲酸脱钙处理,所有组织进行脱水、石蜡包埋、制片,最后进行苏木精-伊红(HE)染色。

2.2 豚鼠的全身主动过敏实验 实验方法参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[15]。Hartley豚鼠共24只,雌雄各半,随机分为阴性对照组、阳性对照组及雾化吸入给药组。致敏阶段:动物固定于口鼻暴露系统,雾化吸入给药组采用清咽利喉雾化液雾化给药30 min;阴性对照组采用雾化空气后经口鼻部吸入的方式给药30 min;阳性对照组雾化卵白蛋白溶液(2 mg/mL)给药15 min。以上各组均为隔日给药1次,共给3次。激发阶段:分别在末次致敏后第14天与21天,雾化吸入给药组采用清咽利喉雾化液雾化给药60 min,阴性对照组采用雾化空气后经口鼻部吸入的方式给药60 min,阳性对照组雾化卵白蛋白溶液(4 mg/mL)给药30 min。致敏期间,每日观察记录动物的一般症状。激发后即刻至30 min内详细观察,并记录过敏反应情况及症状,计算过敏反应发生率。

2.3 清咽利喉雾化液雾化气溶胶浓度测定 清咽利喉雾化液雾化时,将CEL-712 Microdust Pro监测仪插入到Melton Inhalogic NIES口鼻式吸入暴露系统的暴露孔,对雾化气溶胶进行浓度分析,待气溶胶浓度即时值基本稳定后再测量5 min,测量3次,计算气溶胶浓度的平均值。

2.4 清咽利喉雾化液吸入对氯水引咳小鼠咳嗽的影响 ICR小鼠70只,雌雄各半,取体质量合格(体质量在均值±5%范围内)的60只小鼠随机分为5组,每组12只,分别为模型对照组、阳性对照组、清咽利喉雾化液低剂量组(雾化5 min)、清咽利喉雾化液中剂量组(雾化10 min)和清咽利喉雾化液高剂量组(雾化20 min)。模型对照组不给药直接雾化氯水造模,阳性对照组灌胃给予氢溴酸右美沙芬片(31.2 mg/kg),给药1 h后雾化氯水造模。清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别给予清咽利喉雾化液5 min、10 min、20 min后立即雾化氯水(13%)造模。所有给药组均给药3次,1次/d,第3天给药后造模。造模方法:采用多功能诱咳引喘仪以1.2 mL/min的速率雾化13%浓氯水,刺激12 s后记录小鼠的咳嗽潜伏期及3 min内的咳嗽次数。判断咳嗽依据为剧烈收缩腹肌并张嘴,同时可出现轻微的咳嗽声。实验过程中由两人分别记录潜伏期及咳嗽次数。

2.5 清咽利喉雾化液吸入对酚红模型小鼠排泌量的影响 ICR

小鼠60只,雌雄各半,随机分为5组,每组12只,分别为模型对照组、阳性对照组、清咽利喉雾化液低剂量组(雾化5 min)、清咽利喉雾化液中剂量组(雾化10 min)和清咽利喉雾化液高剂量组(雾化20 min)。模型对照组不给药,阳性对照组尾静脉注射盐酸氨溴索(5.9 mg/kg),清咽利喉雾化液低、中、高剂量组采用口鼻暴露塔雾化给予清咽利喉雾化液5 min、10 min、20 min。连续给药3 d。阳性对照组末次给药30 min后腹腔注射酚红生理盐水溶液(2.5%),清咽利喉雾化液低、中、高剂量组末次给药后立即腹腔注射酚红生理盐水溶液,模型组不给药直接腹腔注射酚红生理盐水溶液。注射酚红溶液30 min后脱颈椎处死小鼠,背位固定,分离气管,于喉头下将小鼠灌胃针插入气管内约0.4 cm,用4号手术线结扎固定,1 mL 5%碳酸氢钠溶液灌洗呼吸道,静止30 s后抽出注入离心管中,如此重复,共灌洗2次,合并灌洗液,离心(2 000 r/min,离心半径为9.5 cm)5 min,吸取上清液用酶标仪测定吸光度值。根据标准曲线方程计算出每只小鼠呼吸道酚红排出量,即排痰量。

2.6 清咽利喉雾化液对CSE诱导的BEAS-2B细胞损伤的保护作用

2.6.1 细胞培养 BEAS-2B细胞在BEGM培养基中培养,细胞置于37 °C、5% CO₂的细胞培养箱,待细胞汇合至80%铺板,96孔板接种密度为2×10⁵个/mL,每孔接种100 μL;6孔板接种密度为5×10⁵个/mL,每孔接种3 mL。

2.6.2 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B细胞细胞膜、线粒体和ROS损伤的保护作用 BEAS-2B细胞接种于黑色透明底96孔板,将BEAS-2B细胞分为空白组、CSE组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。空白组加入培养基,CSE组加入5% CSE干预,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液和5%CSE干预24 h。实验重复3次。采用BioTek Cytaion5高内涵成像仪,通过三染法同时染细胞核Hoechst33342、线粒体探针MitoTracker® probes和细胞膜单体花青核酸染色剂TO-PRO®-1,观察不同浓度的清咽利喉雾化液对CSE诱导的BEAS-2B细胞细胞膜和线粒体损伤的保护作用。通过双染法Hoechst33342和氧化应激标志物CellROX Oxidative Stress Reagents染色,在细胞水平上评价不同浓度的清咽利喉雾化液对CSE诱导BEAS-2B的ROS损伤保护作用。

2.6.3 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B炎症的影响 BEAS-2B细胞接种于6孔板,将BEAS-2B细胞分为空白组、CSE组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。实验重复3次。空白组加入新鲜培养基,CSE组加入5%CSE干预,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液和5%CSE干预24 h,收集细胞上清,采用ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-1β及TNF-α。

2.7 清咽利喉雾化液对LPS诱导的MH-S细胞损伤的保护作用

2.7.1 细胞培养 MH-S细胞在1640培养基中培养,96孔板接种密度为1×10⁵个/mL,每孔接种100 μL;6孔板接种密度为5×10⁵个/mL,每孔接种2 mL。

2.7.2 清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞细胞膜、线粒体、

ROS损伤的保护作用 MH-S细胞接种于黑色透明底96孔板,将MH-S细胞分为空白组、LPS组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。实验重复3次。空白组加入培养基,LPS组加入0.1 μg/mL LPS干预,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液和0.1 μg/mL LPS干预24 h。采用BioTek Cytaion5高内涵成像仪,通过三染法同时染Hoechst33342、线粒体探针MitoTracker® probes和细胞膜单体花青核酸染色剂TO-PRO®-1观察不同浓度的清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞膜和线粒体损伤的保护作用。通过双染法Hoechst33342和氧化应激标志物ROS在细胞水平上评价不同浓度的清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞ROS损伤的保护作用。

2.7.3 清咽利喉雾化液对LPS导致MH-S细胞炎症的影响 MH-S细胞接种于6孔板,将MH-S细胞分为空白组、LPS组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。实验重复3次。空白组加入培养基,LPS组加入0.1 μg/mL LPS干预,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液和0.1 μg/mL LPS干预24 h。收集细胞上清,采用ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-1β及TNF-α含量。

2.8 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导的MH-S细胞损伤保护作用

2.8.1 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导的MH-S细胞活性氧自由基(ROS)的影响 MH-S细胞接种于黑色透明底96孔板,将MH-S细胞分为空白组、H₂O₂组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。实验重复3次。空白组加入培养基,H₂O₂组加入100 μmol/L干预4 h,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液(培养24 h)及100 μmol/L H₂O₂(干预4 h)。采用BioTek Cytaion5高内涵成像仪,通过双染法Hoechst33342和氧化应激标志物ROS在细胞水平上评价不同浓度的清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导的MH-S的保护作用。

2.8.2 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导的MH-S细胞MDA及SOD的影响 MH-S细胞接种于6孔板,将MH-S细胞分为空白组、H₂O₂组、清咽利喉雾化液低剂量组(0.10%)、清咽利喉雾化液中剂量组(0.25%)和清咽利喉雾化液高剂量组(0.50%)。实验重复3次。空白组加入培养基,H₂O₂组加入100 μmol/L干预4 h,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组分别加入0.10%、0.25%、0.50%清咽利喉雾化液(培养24 h)及100 μmol/L H₂O₂(干预4 h)。收集细胞,按ELISA试剂盒说明书检测MDA含量及SOD活性。

2.9 统计学方法 采用SPSS Statistics 20统计软件进行数据分析,计量资料符合正态分布且方差齐,以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。不符合正态分布的计量资料,以中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,两组间比较采用秩和检验比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 大鼠呼吸道黏膜刺激性实验结果 给药期间各组大鼠自主活动、饮水、摄食,二便正常,精神状态良好。雾化吸入给药组

表1 各组大鼠肺灌洗液白细胞比较

组别	n	WBC/[M(P_{25}, P_{75}), 10 ⁶ /L]	NEUT(±s, %)	LYMPH/[M(P_{25}, P_{75}), %]	MONO/[M(P_{25}, P_{75}), %]	EOS/[M(P_{25}, P_{75}), %]	BASO(±s, %)
阴性对照组	8	0.29(0.22,0.34)	57.48±12.23	19.75(10.28,25.38)	4.65(1.48,14.90)	0.00(0.00,0.75)	13.11±4.19
雾化吸入给药组	8	0.24(0.18,0.32)	66.01±12.51	6.25(0.00,25.83)	6.30(1.48,11.83)	0.00(0.00,0.00)	14.55±4.25
检验统计量		Z=1.346	t=0.042	Z=0.810	Z=0.044	Z=0.380	t=0.047
P		0.246	0.840	0.368	0.833	0.538	0.832

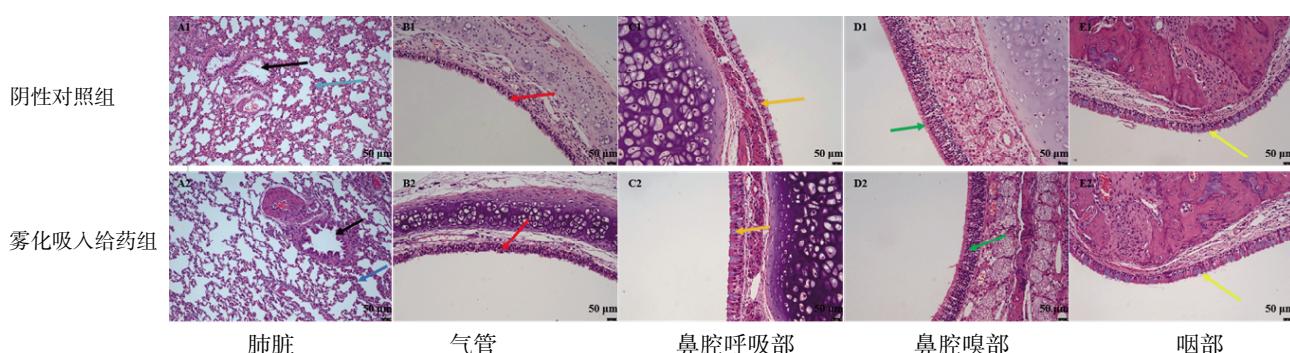


图1 大鼠呼吸道黏膜刺激病理图 (HE,×200)

大鼠肺泡灌洗液白细胞计数、中性粒细胞百分比(NEUT%)、淋巴细胞百分比(LYMPH%)、嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)、嗜碱性粒细胞百分比(BASO%)及单核细胞百分比(MONO%)与阴性对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表1)。

雾化吸入给药组大鼠呼吸道局部黏膜组织与阴性对照组类似,无充血、水肿、溃疡等现象。阴性对照组大鼠肺脏支气管内可见少量分泌物和细胞脱落(黑色箭头),肺泡上皮(蓝色箭头)未见明显异常改变;气管结构清晰,蓝色部分为软骨,周围可见疏松结缔组织,上皮细胞排列整齐,纤毛和上皮细胞(红色箭头)未见明显脱落;鼻呼吸部固有层为疏松结缔组织,有数量不等的淋巴细胞,呼吸上皮(橙色箭头)细胞排列整齐,柱状纤毛完好;鼻腔嗅部嗅上皮(绿色箭头)细胞排列整齐,细胞未见明显的萎缩和脱落,黏膜下层未见明显的炎细胞浸润;咽部黏膜上皮(黄色箭头)细胞排列整齐,柱状纤毛完好,未见明显柱状细胞和纤毛脱落,固有层未见明显出血现象。雾化吸入给药组与阴性对照组类似,未见明显差异。(见图1)

3.2 豚鼠的全身主动过敏实验结果 清咽利喉雾化液雾化给药致敏及激发中豚鼠一般状况良好,体质量增长正常,激发并未引起豚鼠的过敏反应。清咽利喉雾化液吸入给药未对豚鼠造成过敏反应。(见表2)

表2 豚鼠过敏反应症状记录表

组别	致敏阶段(n=8)			激发阶段(n=4)	
	第一次致敏只	第二次致敏只	第三次致敏只	第一次激发[只(%)]	第二次激发[只(%)]
阴性对照组	0	0	0	0(0.00)	0(0.00)
阳性对照组	0	0	0	4(100.00)	4(100.00)
雾化吸入给药组	0	0	0	0(0.00)	0(0.00)

3.3 清咽利喉雾化液雾化气溶胶浓度结果及雾化剂量计算 清咽利喉雾化液的雾化气溶胶平均浓度为4.08 g/m³。吸入剂量=气溶胶浓度×RMV×雾化时间×可吸入的气溶胶颗粒比例/体质量。RMV为动物每分钟通气量。RMV=0.608×BW×0.852。BW为实验动物的体质量(kg)。雾化5 min的给药剂量为15.74 mg/kg,

雾化10 min的给药剂量为31.48 mg/kg,雾化20 min的给药剂量为62.96 mg/kg。

3.4 小鼠咳嗽实验 阳性对照组小鼠咳嗽潜伏期长于模型对照组($P<0.01$);清咽利喉雾化液低、中、高剂量组小鼠咳嗽潜伏期与模型对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

阳性对照组和清咽利喉雾化液高剂量组小鼠咳嗽次数均少于模型对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);清咽利喉雾化液低、中剂量组小鼠咳嗽次数与模型对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

表3 各组小鼠咳嗽潜伏期及咳嗽次数比较 (±s)

组别	n	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数/次
模型对照组	12	21.8 ± 8.4	43.3 ± 13.5
阳性对照组	12	37.9 ± 12.0 ^a	21.3 ± 13.1 ^a
清咽利喉雾化液低剂量组	12	29.6 ± 11.3	47.8 ± 12.4
清咽利喉雾化液中剂量组	12	29.7 ± 12.1	42.3 ± 11.3
清咽利喉雾化液高剂量组	12	30.6 ± 10.2	33.0 ± 9.3 ^b
F		3.321	9.231
P		0.017	0.000

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

3.5 小鼠气管酚红排泌量实验 阳性对照组、清咽利喉雾化液中剂量组和清咽利喉雾化液高剂量组小鼠酚红排泌量均高于模型对照组($P<0.01$);清咽利喉雾化液低剂量组小鼠酚红排泌量与模型对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表4)

表4 各组小鼠气管酚红排泌量比较 (±s)

组别	n	酚红排泌量/(μg/mL)
模型对照组	12	3.88±1.36
阳性对照组	12	9.46±3.22 ^a
清咽利喉雾化液低剂量组	12	4.84±1.36
清咽利喉雾化液中剂量组	12	7.65±3.92 ^a
清咽利喉雾化液高剂量组	12	8.01±2.45 ^a
F		9.154
P		0.000

注:与模型对照组比较,^a $P<0.01$ 。

3.6 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B细胞细胞膜、线粒体和ROS损伤的影响 Hoechst染色结果提示CSE可导致细胞损伤,细胞数量减少且细胞核出现皱缩变形等不规则变化。Mito Tracker线粒体染色显示荧光强度减弱,发生不规则改变。TO-PRO荧光结果显示CSE组BEAS-2B细胞出现细胞膜受损情况。与CSE组比较,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组随着浓度的提高细胞数量增加,线粒体荧光强度具有升高趋势,绿色荧光随浓度升高而减少。(见图2)

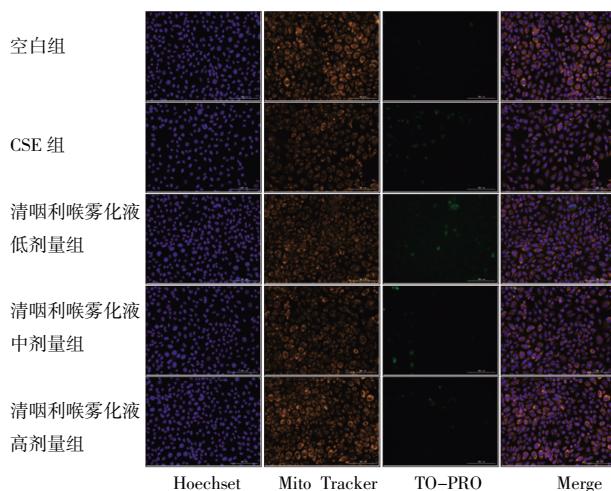


图2 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B细胞细胞膜、线粒体损伤的影响(×20)

与空白组比较,CSE组可见亮绿色荧光,且细胞核蓝色信号重合,提示CSE可诱导BEAS-2B细胞产生ROS。与CSE组比较,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组随着给药浓度升高ROS具有降低趋势。(见图3)

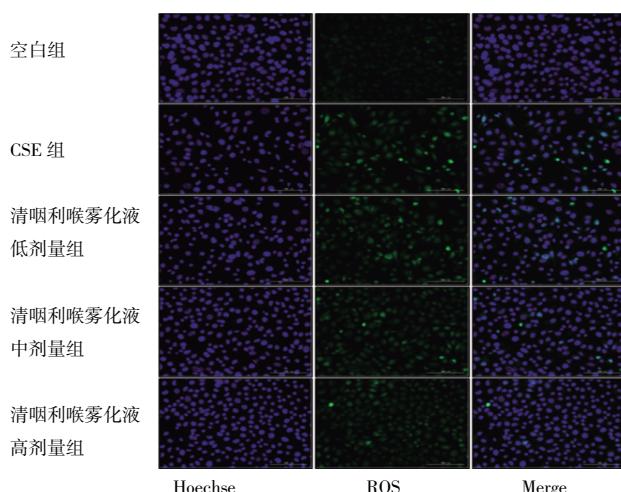


图3 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B细胞ROS损伤的影响(×20)

3.7 清咽利喉雾化液对CSE导致BEAS-2B细胞炎症的影响 CSE组IL-1 β 及TNF- α 含量高于空白组($P<0.01$);清咽利喉雾化液高剂量组IL-1 β 及TNF- α 含量低于CSE组($P<0.05$);清咽利喉雾化液低、中剂量组IL-1 β 及TNF- α 含量与CSE组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表5)

表5 各组BEAS-2B细胞上清液中IL-1 β 及TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
空白组	3	26.85±5.79	50.95±3.54
CSE组	3	46.14±5.29 ^a	65.16±4.41 ^a
清咽利喉雾化液低剂量组	3	44.81±5.09	64.60±1.63
清咽利喉雾化液中剂量组	3	39.75±4.49	62.18±2.14
清咽利喉雾化液高剂量组	3	32.27±7.8 ^b	57.01±1.12 ^b
F		5.169	13.306
P		0.016	0.001

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与CSE组比较,^b $P<0.05$ 。

3.8 清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞细胞膜、线粒体、ROS损伤的保护作用 与空白组比较,LPS组线粒体荧光强度降低,细胞膜绿色荧光增多,提示LPS可诱导MH-S细胞线粒体、细胞膜出现损伤。清咽利喉雾化液低、中、高剂量组对LPS诱导的损伤有一定的改善作用。(见图4)

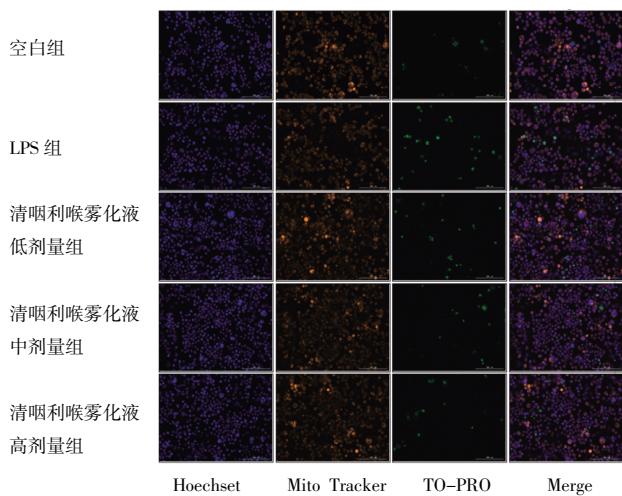


图4 清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞细胞膜、线粒体损伤的影响(×20)

与空白组比较,LPS组出现ROS绿色荧光,提示LPS可诱导MH-S细胞产生活性氧,对MH-S细胞具有一定的损伤作用。随着浓度升高,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组对ROS损伤具有一定的抑制作用。(见图5)

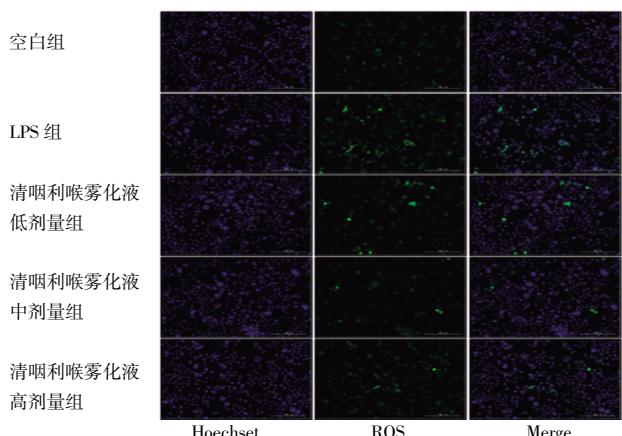


图5 清咽利喉雾化液对LPS诱导MH-S细胞ROS损伤的影响(×20)

3.9 清咽利喉雾化液对LPS诱导的MH-S细胞炎症的影响 LPS组细胞上清液中IL-1 β 及TNF- α 含量高于空白组($P<0.01$)；清咽利喉雾化液高剂量组细胞上清液中IL-1 β 及TNF- α 含量低于LPS组($P<0.05$)；清咽利喉雾化液低、中剂量组细胞上清液中IL-1 β 及TNF- α 含量与LPS组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表6)

表6 各组MH-S细胞上清液中IL-1 β 及TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
空白组	3	55.71±4.64	51.98±0.56
LPS组	3	219.29±12.77 ^a	193.99±6.60 ^a
清咽利喉雾化液低剂量组	3	221.80±8.67	187.28±3.81
清咽利喉雾化液中剂量组	3	210.95±1.10	187.68±3.97
清咽利喉雾化液高剂量组	3	201.50±4.22 ^b	177.69±2.74 ^b
F		270.925	673.364
P		0.000	0.000

注：与空白组比较，^a $P<0.01$ ；与LPS组比较，^b $P<0.05$ 。

3.10 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导MH-S细胞损伤的保护作用

3.10.1 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导MH-S细胞ROS的影响与空白组比较，H₂O₂组细胞绿色荧光增强，且Merge图显示绿色荧光与Hoechst细胞核蓝色信号重合，提示H₂O₂可诱导MH-S细胞生成ROS，造成细胞氧化应激损伤。与H₂O₂组比较，随着浓度升高，清咽利喉雾化液低、中、高剂量组MH-S细胞内ROS有一定程度改善。(见图6)

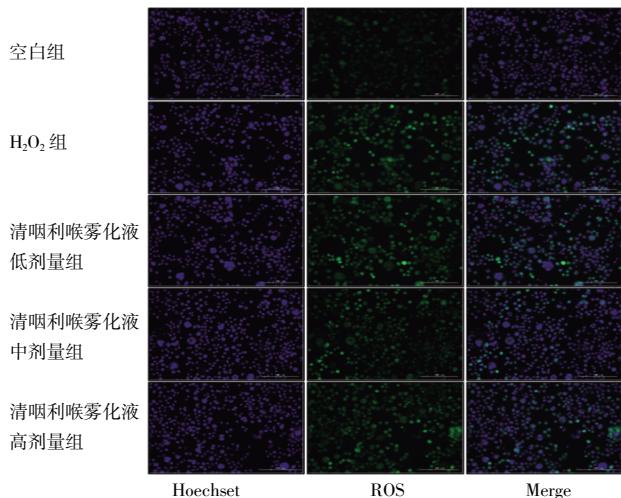


图6 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导MH-S细胞ROS损伤的影响(×20)

3.10.2 清咽利喉雾化液对H₂O₂诱导的MH-S细胞MDA含量及SOD活性的影响 H₂O₂组MH-S细胞MDA含量高于空白组($P<0.01$)，SOD活性低于空白组($P<0.01$)；清咽利喉雾化液高剂量组MH-S细胞SOD活性高于H₂O₂组($P<0.05$)；清咽利喉雾化液低、中剂量组MH-S细胞SOD活性与H₂O₂组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)；清咽利喉雾化液低、中、高剂量组MH-S细胞MDA含量与H₂O₂组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)。(见表7)

表7 各组MH-S细胞MDA含量及SOD活性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
空白组	3	2.81±0.69	19.23±2.19
H ₂ O ₂ 组	3	9.32±0.58 ^a	11.01±3.56 ^a
清咽利喉雾化液低剂量组	3	6.17±2.68	14.07±2.51
清咽利喉雾化液中剂量组	3	6.08±1.63	15.37±1.26
清咽利喉雾化液高剂量组	3	6.37±0.69	16.60±3.06 ^b
F		7.176	4.003
P		0.005	0.034

注：与空白组比较，^a $P<0.01$ ；与H₂O₂组比较，^b $P<0.05$ 。

4 讨论

不同于口服或者注射给药，雾化吸入给药药物经自主呼吸吸入，沉积于咽喉或呼吸道，能够直接作用于呼吸道黏膜细胞产生药效作用。由于咽喉部位特殊的生理结构，雾化吸入的气溶胶颗粒会在咽喉部位碰撞并大量沉积，因此咽喉吸入给药具有明显的优势。清咽利喉雾化液由金银花^[16]、胖大海^[17]、橘红^[18]提取物组成，上述3味药物是临床常用药物，口服用药未见安全性风险报道。雾化吸入给药后药物沉积在呼吸道，对呼吸道的刺激和过敏是其主要的安全性风险^[19]。本研究采用大鼠雾化吸入给药观察其对呼吸道黏膜的刺激性，同时采用豚鼠全身主动过敏实验观察吸入给药过敏性。结果显示清咽利喉雾化液对大鼠黏膜无刺激性，且豚鼠过敏实验为阴性。

咳嗽、咳痰是呼吸道疾病最常见的症状，吸入烟雾、粉尘以及呼吸道细菌、病毒导致咽喉部位的组织细胞损伤是其启动因素。炎症是基本的病理变化，是导致疾病发展变化的主要因素。氧化应激参与其中是导致疾病进展的重要因素^[20]。金银花清热解毒，疏风散热，具有抗炎、抗菌、抗病毒及抗氧化等多种药理作用^[21]。胖大海开肺解表，清热利咽，对风热失音、咳嗽、咽喉肿痛效果显著^[22]。橘红具有消痰利气、宽中散结的功效^[23]。本研究采用氨水诱导的小鼠咳嗽模型观察了清咽利喉雾化液对模型动物咳嗽的影响，同时采用小鼠酚红实验观察了清咽利喉雾化液的化痰作用。结果显示清咽利喉雾化液雾化吸入给药能减少模型小鼠咳嗽次数，促进小鼠酚红的排泌，提示清咽利喉雾化液具有一定止咳和化痰作用。

本研究采用香烟提取物刺激小鼠气道上皮细胞^[24-25]，并采用LPS诱导肺巨噬细胞^[26]损伤模型观察清咽利喉雾化液的损伤保护作用和抗炎、抗氧化作用。Hoechst33342可与活细胞核结合产生均一的淡蓝色荧光。线粒体探针MitoTracker[®] probes可标记细胞中有活性的线粒体，反映线粒体膜电位。线粒体活性越强，则膜电位越高，荧光强度越强。细胞受损死亡后细胞膜通透性增强，与染色剂YO-PROTM-1结合产生亮绿色荧光，标记受损死细胞。CellROX Green Rergent是检测活细胞内活性氧(ROS)的荧光探针。细胞受损后产生大量活性氧可氧化CellROX染料，与DNA结合产生亮绿色荧光。信号定位于细胞核和线粒体。本研究选择了高内涵的无标记成像技术，采用BioTek Cytaion5高内涵成像仪，通过三染法Hoechst33342、线粒体探针MitoTracker[®] probes和氧化应激标志物CellROX Oxidative Stress Reagents染色，在细胞水平上评价清咽利喉雾化液对CSE和LPS诱导的BEAS-2B细胞ROS损伤的保护作用。

结果显示CSE组和LPS组出现细胞膜受损情况,CSE和LPS均可诱导BEAS-2B细胞和MH-S细胞产生ROS。与CSE组和LPS组比较,清咽利喉雾化液低、中、高剂量组随着浓度的提高细胞数量增加,线粒体荧光强度具有升高趋势。说明清咽利喉雾化液对CSE诱导的BEAS-2B细胞损伤和LPS诱导的MH-S细胞损伤具有保护作用。同时清咽利喉雾化液能够降低CSE导致的BEAS-2B细胞炎症模型和LPS导致的MH-S细胞炎症模型IL-1 β 和TNF- α 的含量,升高H₂O₂诱导MH-S细胞损伤模型的SOD活性,提示其具有抗炎和抗氧化的作用。本研究为清咽利喉雾化液临床应用提供了依据和基础。

参考文献

- [1] DHAND R. Inhaled drug therapy 2016: The year in review[J]. Respir Care, 2017, 62(7):978–996.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典临床用药须知-中药饮片卷:2020年版[M].北京:中国医药科技出版社,2022.
- [3] ARI A, FINK J B. Recent advances in aerosol devices for the delivery of inhaled medications[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2020, 17(2):133–144.
- [4] STEIN S W, SHETH P, HODSON P D, et al. Advances in metered dose inhaler technology: Hardware development[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2014, 15(2):326–338.
- [5] LEGH-LAND V, HADDRELL A E, LEWIS D, et al. Water uptake by evaporating pMDI aerosol prior to inhalation affects both regional and total deposition in the respiratory system[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(7):941.
- [6] GELLER D E. Comparing clinical features of the nebulizer, metered-dose inhaler, and dry powder inhaler[J]. Respir Care, 2005, 50(10):1313–1321.
- [7] ISLAM N, CLEARY M J. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery: A review for multidisciplinary researchers[J]. Med Eng Phys, 2012, 34(4):409–427.
- [8] 万妮,陈斌,李合,等.肺部吸入给药系统的研究进展[J].中国新药杂志,2021,30(15):1386–1395.
- [9] 高蕾,王亚敏,马玉楠,等.供雾化器用吸入液体制剂的处方和雾化装置研究[J].中国新药杂志,2018,27(18):2124–2126.
- [10] NOYMER P D, MYERS D J, CASSELLA J V, et al. Assessing the temperature of thermally generated inhalation aerosols[J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2011, 24(1):11–15.
- [11] DINH K, MYERS D J, GLAZER M, et al. In vitro aerosol characterization of Staccato® Loxapine[J]. Int J Pharm, 2011, 403(1–2):101–108.
- [12] 郑淇文,陈桂良,王健.吸入制剂雾化技术概述[J].中国医药工业杂志,2022,53(4):425–438.
- [13] 盛云华,冯红敏,胡玥,等.1,2-丙二醇体内外安全性实验研究[J].中国现代应用药学,2019,36(19):2391–2396.
- [14] 国家食品药品监督管理局.药品注册管理办法[S].北京:国家食品药品监督管理局,2007.
- [15] 国家食品药品监督管理局.药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S].北京:国家食品药品监督管理局,2014.
- [16] 张玖,沈萍萍,张晓明.金银花的食品安全性毒理学评价研究[J].中国医学生物技术应用,2003,2(2):63–64.
- [17] 夏勇,傅剑云,徐彩菊.“胖大海凉茶”急性毒性和致突变试验[J].浙江预防医学,1996,8(5):57–58.
- [18] LI P B, WANG S, GUAN X L, et al. Acute and 13 weeks subchronic toxicological evaluation of naringin in Sprague-Dawleyrats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 60:1–9.
- [19] 刘学武,陈琼芳,唐小燕,等.吸入药物非临床安全性评价策略[J].中南药学,2021,19(5):902–908.
- [20] 郭俊彦,吴闻哲,王健.吸入制剂用于肺部感染性疾病的研究进展[J].中国医药工业杂志,2023,54(7):993–1001.
- [21] 吴娇,王聪,于海川.金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):225–234.
- [22] 周长坚,林键,许凌枚,等.复方胖大海的药理研究[J].福建中医学院学报,1994,4(3):30–33.
- [23] 袁伯俊,廖明阳,李波.药物毒理学实验方法与技术[M].北京:化学工业出版社,2007.
- [24] BOZINOVSKI S, VLAHOS R, ZHANG Y L, et al. Carbonylation caused by cigarette smoke extract is associated with defective macrophage immunity[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(2):229–236.
- [25] CHEN Z, WU H, FAN W Y, et al. Naringenin suppresses BEAS-2B-derived extracellular vesicular cargoes disorder caused by cigarette smoke extract thereby inhibiting M1 macrophage polarization[J]. Front Immunol, 2022, 13: 930476.
- [26] XIA L J, ZHANG C L, LV N Y, et al. AdMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages[J]. Theranostics, 2022, 12(6): 2928–2947.

(收稿日期:2024-07-17 编辑:蒋凯彪)