

胆酸包合物对鼻粘膜刺激性 及抗炎作用的影响

□杨 胜 (成都医学院 成都 610083)

苏柘僮 (成都中医药大学 成都 610075)

杨 明* (成都中医药大学 成都 610075)
(江西中医学院中药现代制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘 要:目的:研究胆酸包合物对鼻粘膜刺激性及其抗炎作用的影响。方法:采用在体蟾蜍上颌模型法,研究胆酸包合物对鼻粘膜刺激性的影响;采用二甲苯致小鼠耳肿胀试验、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性试验、小鼠棉球肉芽肿试验,研究胆酸包合物抗炎作用的影响。结果:胆酸经羟丙基- β -环糊精包合后,其纤毛毒性得到了明显的改善,相同浓度下的胆酸和包合物对比有显著性差异($P<0.01$);相同剂量的胆酸和包合物抗急、慢性非特异性炎症作用对比无显著性差异($P>0.05$)。结论:羟丙基- β -环糊精可以改善胆酸对鼻粘膜刺激性,且不影响其抗炎作用,表明采用羟丙基- β -环糊精制备胆酸包合物可以解决胆酸经鼻给药的关键性问题。

关键词:胆酸 羟丙基- β -环糊精 包合物 纤毛毒性 抗炎

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.017

胆酸(Cholicacid, CA)属于胆烷酸类物质,是天然牛黄的主要有效成分之一,也是人工牛黄的重要组成原料,化学结构上属于甾体类化合物。大量文献表明,含胆酸的制剂大多具有清热解毒、醒神开窍等功效,对呼吸道感染、鼻炎、脑中风等疾病疗效显著,但是胆汁酸类物质能导致鼻粘膜充血、水肿,因此,对鼻粘膜的刺激性是限制含胆酸的中药制剂经鼻给药的瓶颈问题^[1]。羟丙基- β -环糊精(Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD)为 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)的羟丙基衍生

物,被誉为目前最优良的药用辅料之一,已经在制剂中得到了广泛应用,具有增加难溶药物溶解性、促进药物在鼻粘膜渗透、降低药物对鼻粘膜刺激性等作用^[2]。因此,本文拟采用HP- β -CD缓和胆酸对鼻粘膜刺激性,解决胆酸经鼻给药的关键性问题,并对其实际效果进行评价,与此同时还研究了HP- β -CD对胆酸的抗炎作用的影响,以达到解决胆酸经鼻给药关键性问题的同时不影响胆酸的抗炎作用的目的,从而最终确保胆酸经鼻给药的安全性、有效性,为含胆酸的中药制剂更好的服务于临床,突出其治疗鼻炎、脑中风等病症的优势提供有力支持。

收稿日期:2010-04-18

修回日期:2010-11-25

* 通讯作者:杨明,本刊编委,教授,博士生导师,江西中医学院副院长,主要研究方向:中药生产新技术和新剂型研究, E-mail: yangming16@126.com。

一、仪器与材料

显微镜(Axiostar,德国 CarlZeiss);电子分析天平(BP211D,德国);紫外-可见分光光度计(UV-1700,日本岛津);离心机(TGL-16G,中国上海);真空干燥箱(DZF-1B,中国上海)。

胆酸(MW=408.58,82.4%,中国成都);羟丙基-β-环糊精(取代度=6.89,中国西安);聚乙二醇 400(Polyethylene Glycol 400,PEG-400,天津市瑞金特化学品有限公司);地塞米松(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:080182);中华大蟾蜍(体重 30~40g);小鼠(KM,♂,体重 26~30g)。

二、方法与结果

1. 纤毛毒性试验^[3]

(1)样品溶液配制。

取胆酸适量,用 20%PEG-400 生理盐水配制成胆酸浓度分别为:0.5mg·mL⁻¹,1.0mg·mL⁻¹,1.5 mg·mL⁻¹ 的样品溶液。取胆酸-羟丙基-β-环糊精包合物适量,用 20%PEG-400 生理盐水配制成含胆酸浓度分别为:0.5mg·mL⁻¹,1.0mg·mL⁻¹,1.5mg·mL⁻¹ 的样品溶液。取 HP-β-CD 适量,用生理盐水配制成浓度分别为:25mg·mL⁻¹,50mg·mL⁻¹,75mg·mL⁻¹ 的样品溶液。量取适量 PEG-400 溶液,加生理盐水配制成浓度为 20%的样品溶液。

(2)动物分组与给药。

将 55 只中华大蟾蜍,按给予样品溶液不同分为 11 个组,每组 5 只,见表 1。

(3)鼻粘膜纤毛毒性在体评价法。

将蟾蜍仰卧固定在蛙板上,使口腔张开,于上颌粘膜处滴加试验样品 0.5mL,使浸没上颌,接触 1h 后用生理盐水洗净,分离上颌粘膜,平铺于载玻片上,滴加生理盐水,盖上盖玻片,于 40×10 倍显微镜下观察纤毛的摆动情况,并照相。随后搁置于蒸馏水饱和的层析缸中密闭,室温 20~25℃。每隔一定时间取出标本观察,记录从洗净试验样品至纤毛运动停止的时间。同时以生理盐水作为空白对照。以试验样品的纤毛持续运动时间除以空白对照组的时间得纤毛持续运动时间相对百分率(P%)。相对百分率越高,表示试验样品对纤毛运动的影响越小。

(4)结果分析。

将制备好的蟾蜍上颌粘膜标本于显微镜下观

察,结果见表 2。空白组:粘膜面完整,纤毛运动非常活跃,无脱落纤毛,纤毛持续运动时间 665.7±17.31min。系列浓度胆酸组:在 0.5、1.0mg·mL⁻¹ 浓度下,纤毛运动较缓慢,一部分僵直,部分纤毛倒伏,部分纤毛脱落,粘膜表面杂乱,粘膜充血,其 P 值分别为 7.21±0.45% 和 3.6±0.56%;当给予 1.5mg·mL⁻¹ 胆酸药液时,粘膜严重充血,粘膜表面杂乱,大量纤毛脱落,几乎看不到摆动的纤毛,P 值为 1.14±0.73%,说明胆酸在这些试验浓度下有很强的纤毛毒性,其纤毛毒性的强弱与浓度呈正相关。系列浓度包合物组:在 0.5mg·mL⁻¹ 浓度下,纤毛运动正常,小部分僵直,无纤毛脱落,粘膜表面比较完整,P 值为 80.14±6.17%;当给予 1.0、1.5mg·mL⁻¹ 的包合物药液时,纤毛运动减弱,可见小部分纤毛倒伏,僵

表 1 纤毛毒性实验动物分组表(n=5)

组名	给予样品溶液
空白组	生理盐水
胆酸低剂量组	0.5mg·mL ⁻¹ 胆酸溶液
胆酸中剂量组	1.0mg·mL ⁻¹ 胆酸溶液
胆酸高剂量组	1.5mg·mL ⁻¹ 胆酸溶液
包合物低剂量组	0.5mg·mL ⁻¹ 包合物溶液
包合物中剂量组	1.0mg·mL ⁻¹ 包合物溶液
包合物高剂量组	1.5mg·mL ⁻¹ 包合物溶液
环糊精低剂量组	25mg·mL ⁻¹ HP-β-CD 溶液
环糊精中剂量组	50mg·mL ⁻¹ HP-β-CD 溶液
环糊精高剂量组	75mg·mL ⁻¹ HP-β-CD 溶液
聚乙二醇 400 组	20%聚乙二醇 400 溶液

表 2 纤毛毒性实验结果(n=5, mean±SD)

组名	P(%)
空白组	—
胆酸低剂量组	7.21±0.45a
胆酸中剂量组	3.6±0.56b
胆酸高剂量组	1.14±0.73c
包合物低剂量组	80.14±6.17a
包合物中剂量组	71.44±4.04b
包合物高剂量组	64.50±5.58c
环糊精低剂量组	96.15±4.11
环糊精中剂量组	91.72±2.65
环糊精高剂量组	90.41±3.43
聚乙二醇 400 组	86.21±5.35

注:a. ANOVA,胆酸低剂量组 vs 包合物低剂量组(P<0.01);b. ANOVA,胆酸中剂量组 vs 包合物中剂量组(P<0.01);c. ANOVA,胆酸高剂量组 vs 包合物高剂量组(P<0.01)。

直,脱落,粘膜表面略显杂乱,P值分别为 $71.44 \pm 4.04\%$ 和 $64.50 \pm 5.58\%$ 。将相同浓度下的胆酸和包合物的P值进行统计学处理,所有统计结果有显著性差异($P < 0.01$),这说明在浓度相同的情况下,胆酸经过包合后,其纤毛毒性得到了明显的改善。系列浓度 HP- β -CD 组:给予 $25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,粘膜面完整,纤毛运动非常活跃,无脱落纤毛,与生理盐水对照组无明显区别;P值为 $96.15 \pm 4.11\%$;当 HP- β -CD 药液浓度提高到 50 、 $75\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纤毛运动稍微减弱,部分纤毛倒伏,少部分停止运动,粘膜表面比较完整,其P值分别为 $91.72 \pm 2.65\%$ 和 $90.41 \pm 3.43\%$,说明系列浓度 HP- β -CD 对纤毛运动影响很小。20%PEG-400 组:纤毛大部分运动正常,极少部分运动减弱,粘膜表面比较完整,其P值为 $86.21 \pm 5.35\%$,说明 20%PEG-400 对纤毛运动影响很小。综上所述,胆酸经 HP- β -CD 包合后,其对蟾蜍上腭粘膜刺激性显著降低,纤毛脱落和倒伏、粘膜充血等现象得到改善。

2. 抗炎作用试验^[4-7]

(1) 对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响。

①样品溶液配制 胆酸和包合物溶液的配制同“纤毛毒性试验”。取地塞米松适量,用 20%PEG-400 生理盐水配制成浓度为 $0.125\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液。

②抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用 选取体重 26~30g 健康 KM 雄性小鼠 96 只,称重,编号。随机分为模型组(生理盐水)、阳性组($0.125\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地塞米松)、胆酸高、中、低剂量组、包合物高、中、低剂量组。每组 12 只,分别按设计剂量给予药物或生理盐水,连续 5 天,每天 1 次。于末次给药后 30min,用移液枪将二甲苯双面均匀涂布于每只小鼠右耳固定位置($0.05\text{mL}/\text{只}$),2h 后将小鼠脱臼处死,剪下左右耳,在两耳廓同一位置用 4mm 打孔器打孔,于电子分析天平上分别称耳片重量,记录。

③评价指标 以耳肿胀度和肿胀抑制率(%)作为评价指标,耳肿胀度越小则肿胀抑制率(%)越大,即药物抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用越强。

以左、右耳片的重量差值(mg)作为耳肿胀度。并计算肿胀抑制率,计算公式:

$$\text{肿胀抑制率}(\%) = \frac{\text{模型组平均耳肿胀度} - \text{给药组平均耳肿胀度}}{\text{模型组平均耳肿胀度}} \times 100\%$$

④结果分析 对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响实验结果见表 3,经统计学处理,阳性组、胆酸高剂量组、包合物高剂量组与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),说明阳性组、胆酸高剂量组、包合物高剂量组有显著的抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用,包合物中剂量组与模型组比较有差异($P < 0.05$),说明包合物中剂量组有抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用。由此可知,胆酸是有显著的抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用。相同剂量的胆酸和包合物抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用无明显差异($P > 0.05$),说明胆酸经羟丙基- β -环糊精包合后,其抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用没有受到影响。

(2) 对抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用的影响。

①样品溶液配制 同“对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响”试验。

②抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用 分组同“对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响”。每组分别按设计剂量给予药物或生理盐水,连续 5 天,每天 1 次。于末次给药后 1h,尾静脉注射 1%伊文思蓝生理盐水溶液 $0.1\text{mL}/10\text{g}$,立即腹腔注射 0.6%冰醋酸 $0.2\text{mL}/\text{只}$,20min 后将小鼠脱臼处死,剪开腹腔,用 5mL 生理盐水冲洗腹腔数次,收集洗涤液,1000rpm 离心 5min,取上清液,用紫外-可见分光光度计于 590nm 波长处测定吸收度(OD 值),记录。

③评价指标 以腹腔洗出液吸收度(OD 值)为评价指标,如果测得 OD 值比模型组低,则药物可减少小鼠腹腔毛细血管通透性,反之亦然。

④结果分析 对抑制小鼠腹腔毛细血管通透性

表 3 抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用结果($n=12$, mean $\pm$ SD)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	耳肿胀度(mg)	肿胀抑制率(%)
模型组	-	$1.96 \pm 0.44\text{a}$	-
阳性组	2.5	$0.54 \pm 0.28\text{a}$	72.45 ± 37.57
胆酸高剂量组	30	$1.02 \pm 0.47\text{a,e}$	47.96 ± 22.10
胆酸中剂量组	20	$1.63 \pm 0.42\text{d}$	16.84 ± 4.34
胆酸低剂量组	10	$1.78 \pm 0.62\text{c}$	9.18 ± 3.20
包合物高剂量组	30	$0.94 \pm 0.46\text{a,e}$	52.04 ± 25.47
包合物中剂量组	20	$1.58 \pm 0.53\text{b,d}$	19.39 ± 6.50
包合物低剂量组	10	$1.70 \pm 0.42\text{c}$	13.27 ± 3.28

注:a. ANOVA,模型组 vs 阳性组、胆酸高剂量组、包合物高剂量组($P < 0.01$);b. ANOVA,模型组 vs 包合物中剂量组($P < 0.05$);c. ANOVA,胆酸低剂量组 vs 包合物低剂量组($P > 0.05$);d. ANOVA,胆酸中剂量组 vs 包合物中剂量组($P > 0.05$);e. ANOVA,胆酸高剂量组 vs 包合物高剂量组($P > 0.05$)。

作用的影响实验结果见表4,经统计学处理,阳性组、胆酸高剂量组、胆酸中剂量组、包合物高剂量组、包合物中剂量组比较有显著性差异($P<0.01$),说明阳性组、胆酸高剂量组、胆酸中剂量组、包合物高剂量组、包合物中剂量组有显著的抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用。由此可知,胆酸是有显著的抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用。经统计处理,相同剂量的胆酸和包合物抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用无明显差异($P>0.05$),说明胆酸经羟丙基- β -环糊精包合后,其抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用没有受到影响。

(3)对抑制小鼠棉球肉芽肿作用的影响。

①样品溶液配制 同“对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响”试验。

②抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用 分组同“对抗二甲苯致小鼠耳肿胀作用的影响”。乙醚麻醉小鼠,在各鼠的右腹股沟处用碘酒消毒,医用酒精脱碘,手术切开一小口(约1cm),皮下植入15mg灭菌脱脂棉球,缝合切口,喷洒青霉素消毒。手术当天开始给药,连续7天,第8天处死小鼠,打开切口,取出棉球和周围结缔组织,剔除脂肪组织,放置真空干燥箱(60℃)烘干称重,记录。称得重量减去棉球重量,即为肉牙肿的重量。

③评价指标 以肉牙肿的重量为评价指标,如果测得肉牙肿的重量比模型组低,则药物可减少棉球刺激引起的结缔组织增生,有抑制小鼠棉球肉芽肿的作用,反之亦然。

④结果分析 对抑制小鼠棉球肉芽肿作用的影响实验结果见表5,经统计处理,阳性组、胆酸高剂量组、包合物高、中剂量组与模型组比较有显著性差异($P<0.01$),说明阳性组、胆酸高剂量组、包合物高、中剂量组有显著的抑制小鼠棉球肉芽肿作用,胆酸中剂量组、包合物低剂量组与模型组比较有差异($P<0.05$),说明胆酸中剂量组、包合物低剂量组有抑制小鼠棉球肉芽肿作用。由此可知,胆酸是有显著的抑制小鼠棉球肉芽肿作用。相同剂量的胆酸和包合物抑制小鼠棉球肉芽肿作用无明显差异($P>0.05$),说明胆酸经羟丙基- β -环糊精包合后,其抑制小鼠棉球肉芽肿作用没有受到影响。

三、结论与讨论

1. 羟丙基- β -环糊精对胆酸鼻粘膜刺激性的影响

纤毛毒性试验结果表明,系列浓度HP- β -CD溶液以及20%PEG-400溶液对蟾蜍上腭粘膜纤毛运动影响很小,证明本实验用到的HP- β -CD溶液和PEG-400溶液对实验结果不会有干扰。系列浓度胆酸溶液对纤毛运动影响很大,将相同浓度下的胆酸和包合物的P值进行统计学处理,所有统计结果有显著性差异($P<0.01$),说明胆酸经过HP- β -CD包合后,其纤毛毒性得到了明显的改善。

2. 羟丙基- β -环糊精对胆酸抗炎作用的影响

胆酸对急性非特异性炎症模型(二甲苯致小鼠耳肿胀和小鼠腹腔毛细血管通透性)有显著抑制作用,同时对慢性非特异性炎症模型(小鼠棉球

表4 抑制小鼠腹腔毛细血管通透性作用结果(n=12, mean $\pm$ SD)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	OD
模型组		0.53 $\pm$ 0.09a
阳性组	2.5	0.22 $\pm$ 0.03a
胆酸高剂量组	30	0.33 $\pm$ 0.04a,d
胆酸中剂量组	20	0.44 $\pm$ 0.05a,c
胆酸低剂量组	10	0.51 $\pm$ 0.08b
包合物高剂量组	30	0.30 $\pm$ 0.04a,d
包合物中剂量组	20	0.40 $\pm$ 0.03a,c
包合物低剂量组	10	0.48 $\pm$ 0.05b

注:a. ANOVA,模型组 vs 阳性组、胆酸高剂量组、胆酸中剂量组、包合物高剂量组、包合物中剂量组($P<0.01$);b. ANOVA,胆酸低剂量组 vs 包合物低剂量组($P>0.05$);c. ANOVA,胆酸中剂量组 vs 包合物中剂量组($P>0.05$);d. ANOVA,胆酸高剂量组 vs 包合物高剂量组($P>0.05$)。

表5 抑制小鼠棉球肉芽肿作用结果(n=12, mean $\pm$ SD)

组别	剂量(mg?kg-1)	肉芽肿干重(mg)
模型组		43.57 $\pm$ 6.09a
阳性组	2.5	28.23 $\pm$ 4.94a
胆酸高剂量组	30	35.06 $\pm$ 6.30a,e
胆酸中剂量组	20	37.52 $\pm$ 3.24b,d
胆酸低剂量组	10	41.19 $\pm$ 3.44c
包合物高剂量组	30	33.53 $\pm$ 4.63a,e
包合物中剂量组	20	36.91 $\pm$ 4.24a,d
包合物低剂量组	10	38.08 $\pm$ 6.77b,c

注:a. ANOVA,模型组 vs 阳性组、胆酸高剂量组、包合物高、中剂量组($P<0.01$);b. ANOVA,模型组 vs 胆酸中剂量组、包合物低剂量组($P<0.05$);c. ANOVA,胆酸低剂量组 vs 包合物低剂量组($P>0.05$);d. ANOVA,胆酸中剂量组 vs 包合物中剂量组($P>0.05$);e. ANOVA,胆酸高剂量组 vs 包合物高剂量组($P>0.05$)。

肉芽肿)也有显著抑制作用,说明胆酸对各种因素引起的急、慢性非特异性炎症均有显著抗炎作用。相同剂量的胆酸和包合物抗急、慢性非特异性炎症作用对比无显著性差异($P>0.05$),说明胆酸经羟丙基- β -环糊精包合后,其抗炎作用不会受到影响。

综上所述,羟丙基- β -环糊精可以改善胆酸对鼻粘膜的刺激性,且不影响胆酸抗炎作用,表明应用现代辅料 HP- β -CD 降低胆酸对鼻粘膜的毒副作用,解决了胆酸经鼻给药关键性问题,确保胆酸经鼻给药的安全性、有效性,为含胆酸的中药制剂更好的服务于临床,突出其治疗鼻炎、呼吸系统感染以及脑中风等病症的优势奠定了基础。

参考文献

- 1 曹金山.胆酸的抗炎作用及对呼吸系统的药理作用和组织学影响.内蒙古:内蒙古农业大学,2001.
- 2 周园,刘玉玲.环糊精在鼻腔给药系统中的应用.中国医药工业杂志,2005,36(8):501-504.
- 3 李范珠,俞丽霞,徐莲英.眼镜蛇神经毒素粉末剂的鼻粘膜纤毛毒性考察.中国医院药学杂志,2006,26(1):1-3.
- 4 黄俊,谢金鲜.鼻炎膏抗炎抗过敏的实验研究.广西中医药,2001,24(1):51-52.
- 5 周龙强,饶伟源,李茂,等.苍鹅鼻炎片的药效学研究.中药药理与临床,2004,20(4):39-41.
- 6 张玲,赵建平,刘光珍,等.除脓清窦颗粒的抗炎镇痛实验研究.山西中医,2005,21(1):49-50.
- 7 于海玲,孙连平,曲香芝,等.苍鹅鼻炎片的药效学研究.延边大学学报,2006,29(1):27-29.

Influence of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on Nasal Mucosa Irritation and Anti-inflammatory Effect of Cholic Acid

Yang Sheng¹, Su Zhetong², Yang Ming^{2,3}

(1. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;

2. Chengdu University of T.C.M, Chengdu 610075, China;

3. Key Lab of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: This work aimed to study the effects of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on nasal mucosa irritation and the anti-inflammatory effect of cholic acid. Various sample solutions were given to detect the ciliary beat time by the toad palate model in vivo. The anti-inflammatory effect was studied by a few conventional models, such as ear edema induced by xylene, granuloma induced by cotton ball, and capillary permeability in abdominal cavity by ethanoic acid in mice. With the inclusion of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, cholic acid had its cilium toxicity significantly reduced, and significant differences were observed in the cilium toxicity between the cholic acid with and without the inclusion of hydroxypropyl- β -cyclodextrin at the same concentration ($P<0.01$); the anti-inflammatory effect of cholic acid was not affected, and no significant difference was found in the anti-acute and chronic non-specific inflammation effect between the cholic acid with and without the inclusion of hydroxypropyl- β -cyclodextrin at the same dose ($P>0.05$). The results show that HP- β -CD has many effects on CA, such as reducing irritation to nasal mucosa significantly. Meanwhile, it has no influences on the anti-inflammatory function. Thus, this research method is feasible.

Keywords: Cholic acid, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Ciliotoxicity, Anti-inflammatory

(责任编辑:张志华 李沙沙,责任译审:张立巍)