

药物的鼻粘膜纤毛毒性及评价方法*

蒋新国 崔景斌 方晓玲 韦 阳** 奚念朱

(上海医科大学生物药剂学研究室,上海 200032)

摘要 提出一种新的评价方法——在体蟾蜍上腭模型,研究对乙酰氨基酚、盐酸普罗帕酮等8种药物溶液或混悬液对纤毛运动的影响,并与扫描电镜法及离体蟾蜍上腭模型比较。结果表明,在体模型简便易行,结果可靠,适用面广,是一种较理想的鼻纤毛毒性评价方法。离体模型不宜评价混悬型及粘稠性药物制剂的鼻纤毛毒性,但能进行受试药物与对照药物的同体比较,对于溶液型制剂是一种优良的评价方法。由8种药物的评价结果提示,药物对纤毛运动的影响较普遍,应予重视。

关键词 鼻腔给药;纤毛毒性

鼻腔作为药物全身吸收的给药部位日益受到人们的关注。不少药物如盐酸普萘洛尔、安乃近等,甚至某些小分子肽类药物,鼻腔给药后常可获得满意的生物利用度^[1,2]。但是这种给药方法还须注意对鼻纤毛的毒性问题。鼻腔粘膜表面覆盖着一层柱状纤毛,正常情况下纤毛协调一致地摆动,可清除进入鼻腔的异物及微生物,起到保护作用。鼻腔给药后,纤毛运动常会受到不同程度的影响,某些药物甚至可使纤毛运动不可逆的停止^[3],严重影响鼻腔的正常生理功能,因此,研究药物及辅料对鼻粘膜纤毛的影响,应是鼻腔给药制剂处方设计中一项重要的基础研究。

研究药物鼻纤毛毒性的动物模型主要有鸡胚胎气管的粘膜纤毛^[4]和蛙上腭粘膜纤毛^[5]。两者均与哺乳动物鼻粘膜纤毛相似^[6],但后者材料易得,操作简便,故应用较广。方法通常是将蛙上腭离体后与受试药液接触一定时间,然后应用光电技术测定纤毛摆动频率^[7],或用光学显微镜测定纤毛摆动的持续时间^[8],也可用立体显微镜测定石墨微粒在粘膜纤毛表面的运动速度^[9]等。上述离体方法的不足之处是难以正确评价混悬型或粘稠性药物制剂的纤毛毒性,有必要进行改进,但文献中未见其它方法报道。本文试以蛙类蟾蜍在体上腭评价药物对纤毛运动的影响。

材 料 和 方 法

仪器

光学显微镜,SEM-520扫描电镜(日本日立公司)。

实验动物

中华大蟾蜍,体重30~40 g,♀♂皆有;Wistar大鼠,♀,体重250 g左右。

本文于1995年1月27日收到。

*国家自然科学基金资助课题(No. 39370817)

**上海医科大学药学专业1994届毕业生

试验药物

用生理盐水配制下列药物溶液或混悬液:1%盐酸麻黄碱溶液,1%盐酸普萘洛尔溶液,1%去氧胆酸钠溶液,20%安乃近溶液,4万 IU/ml 硫酸庆大霉素溶液;10%对乙酰氨基酚混悬液,10%盐酸普罗帕酮混悬液,0.5%氯化可的松混悬液。

药物对鼻粘膜纤毛毒性的评价方法

离体法——用离体蟾蜍上腭研究药物对纤毛运动的影响 将蟾蜍仰卧固定在蛙板上,使口腔张开,用止血钳牵拉,手术剪分离上腭粘膜。取约3 mm×3 mm 粘膜,生理盐水洗净血块及杂物,粘膜面向上平铺于载玻片上,于粘膜表面滴加0.2 ml 药液,轻轻盖上盖玻片,于40倍光学显微镜下观察粘膜纤毛的运动情况,随后搁置于加有少量蒸馏水的层析缸中,密闭,使水蒸气近饱和状态,环境温度为20~25℃。此后每隔适当时间取出标本,显微镜观察,如纤毛继续运动则放回层析缸中,直至纤毛运动停止后记录从给药开始至纤毛运动停止所持续的时间,用生理盐水洗净粘膜上药液,继续观察纤毛运动是否恢复,记录恢复试品的持续运动时间。

以上试验中,取自蟾蜍上腭的粘膜先分成两小块,其中一块供以上试验药液用,另一块以生理盐水同时作自身对照。以给药组的纤毛持续运动时间除以对照组时间得纤毛持续运动时间的相对百分率,百分率越高,表示药物对纤毛运动的影响越小。

在体法——用在体蟾蜍上腭研究药物对纤毛运动的影响 将蟾蜍仰卧固定,使口腔张开,于上腭粘膜处滴加药液0.5 ml 使完全浸没上腭,接触30 min 后用生理盐水洗净药物,分离上腭粘膜以供显微镜观察纤毛运动情况。粘膜分离后立即洗净,平铺于载玻片上,于粘膜表面滴加生理盐水,盖上盖玻片,如上操作观察并记录纤毛运动的持续时间。

在体法不能进行自身对照,可按体重等条件进行配对比较。取蟾蜍10只,将体重诸条件相近的两只配成一对,共5对,随机选同对中的一只给予试验药液,另一只给予生理盐水,类似离体法计算给药组纤毛持续运动的相对百分率。

改良离体法 如离体法操作,取约5 mm×5 mm 蟾蜍上腭粘膜,用生理盐水洗净血块,吸干,将粘膜背面贴于透明胶纸上,粘膜表面向上。另取实验室用 Para 膜(American Can Company)一块,中央挖去9 mm²使成空洞,将此膜复盖在粘膜上,于中央空洞处滴加0.2 ml 药液,30 min 后用生理盐水洗净。取出粘膜,平铺于载玻片上,滴加0.2 ml 生理盐水,盖上盖玻片,光学显微镜观察并记录受药部位纤毛运动的持续时间。

电镜法——用扫描电镜观察药物对大鼠鼻粘膜纤毛形态的影响 以鼠架固定大鼠,用灌胃器向鼻腔给药,每日3次,每次每只鼻腔0.5 ml 药液,连续6 d,第8 d 处死大鼠,取鼻中隔粘膜,洗净血块及粘液,制备电镜样品并进行扫描电镜观察。

结果和讨论

在体法的可靠性研究

选用文献公认的无纤毛毒性的盐酸麻黄碱作阴性对照品,有严重毒性的去氧胆酸钠、盐酸普萘洛尔作阳性对照品,用在体法评价药物对粘膜纤毛的影响,并与电镜法及经典的离体法比较,结果见表1。

Tab 1 Effect of drugs on ciliary movement ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Drug	Methods of evaluation		
		<i>In vitro</i>	<i>In situ</i>
	Lasting time of ciliary movement after drug administration (min)	Lasting time of ciliary movement after rinsing with physiological saline when the ciliary movement stopped (min)	Lasting time of ciliary movement after drug administration (min)
Physiological saline	589.4 ± 127.3	0	774.2 ± 53.1
1% Ephedrine hydrochloride solution	550.1 ± 153.7	0	711.0 ± 18.5
1% Sodium deoxycholate solution	No ciliary movement was observed	No ciliary movement was observed	No ciliary movement was observed
1% Propranolol hydrochloride solution	0	0	0
40000 IU/ml Gentamycin sulfate solution	15.9 ± 3.7	0	503.2 ± 55.3
20% Analgin solution	0	477.8 ± 174.0	—
10% Propafenone hydrochloride suspension	Could not be observed	Could not be observed	107.5 ± 70.9
10% Paracetamol suspension	Observed with difficulty	Observed with difficulty	496.3 ± 10.3
0.5% Hydrocortisone suspension	Observed with difficulty	Observed with difficulty	708.3 ± 118.1

观察结果表明,在体蟾蜍上腭给予麻黄碱后,纤毛运动活跃,持续运动711.0 min,为生理盐水组持续运动时间的 $91.8\% \pm 4.3\%$ 。给予盐酸普萘洛尔后,见有少量粘膜上皮脱落且纤毛运动立即停止。给予去胆酸钠后,粘膜表面杂乱,纤毛完全脱落,说明这两种药物对粘膜组织及纤毛运动有严重影响。离体法结果与在体法一致,其中离体粘膜给予麻黄碱后,纤毛运动持续时间虽较在体法短,但与生理盐水组比较为 $93.3\% \pm 3.0\%$,和在体法结果无显著差异($P > 0.05$)。上述结果与大鼠鼻粘膜纤毛的电镜观察及文献报道也完全吻合。由此表明,用在体蟾蜍上腭评价药物对粘膜纤毛的影响是可靠的。

药物对纤毛运动的影响及评价方法比较

用离体法和在体法分别测定对乙酰氨基酚等药物对纤毛运动的影响,结果见表1。由表中结果可以看出,离体法评价混悬制剂的纤毛毒性有一定困难,原因是混悬颗粒容易粘附在离体粘膜的表面和背面,很难用生理盐水淋洗干净。残留颗粒的存在以及剧烈的淋洗本身对纤毛运动就有很大影响,此外,药物颗粒还影响显微镜观察,因此离体法不宜评价混悬制剂的纤毛毒性。为了避免混悬颗粒的影响,曾有文献将水难溶性的氢化可的松配制成乙醇溶液以评价它的纤毛毒性,这样做一则与临床实际给药情况不符,再则也忽视了乙醇本身对纤毛运动的不可逆毒性,因此得出了错误结论。本实验改进了经典的离体方法,用在体模型评价混悬剂中药物的纤毛毒性,该条件下药物颗粒较易用生理盐水洗除,因此不影响纤毛的正常生理状态及显微镜观察。结果表明:0.5%氢化可的松混悬液和10%对乙酰氨基酚混悬液对纤毛运动的影响都不大,但10%盐酸普罗帕酮混悬液可使部分粘膜上皮脱落,残存纤毛的运动程度也均有减弱。电镜法的结果相仿,使用对乙酰氨基酚后,大鼠鼻粘膜纤毛的状态(图1b)与生理盐水组(图1a)相

近;使用盐酸普罗帕酮后,粘膜纤毛部分脱落,纤毛萎缩并呈簇状分散(图1d),但损伤程度轻于盐酸普萘洛尔(图1c)。

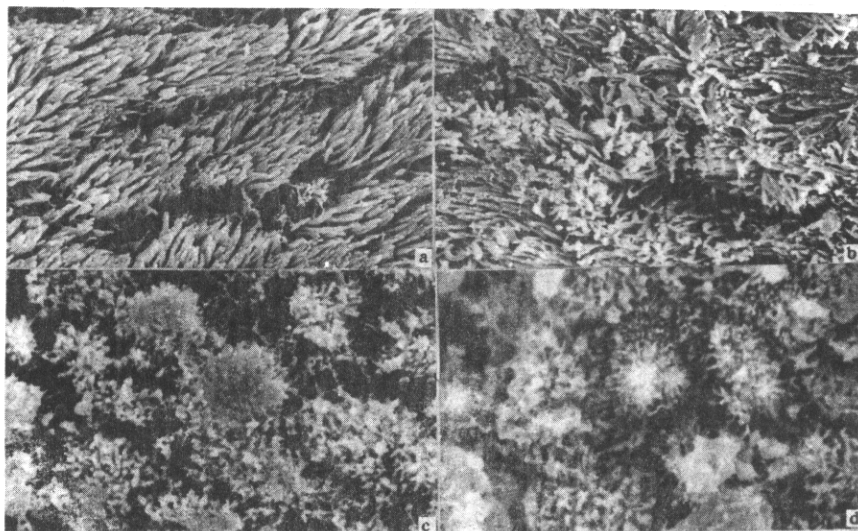


Fig 1 Scanning electron microscope examination of nasal mucocilia of rats after intranasal administration of drugs. a. Physiological saline; b. Paracetamol; c. Propranolol hydrochloride; d. Propafenone hydrochloride.

凝胶剂是鼻用制剂的常用剂型,基质的粘稠性对纤毛运动有较大的阻碍作用且不易用生理盐水淋洗,因此也不宜用离体法评价。

另一类药物如硫酸庆大霉素等,在体法测得的纤毛运动持续时间远远大于离体法(表1),究其原因可能与受试纤毛所处的环境有关。在体法时,药物仅接触纤毛和粘膜表面,而离体法时,整块粘膜完全浸在药液中,纤毛及其它各部分组织均可受药物影响,因此很可能通过其它机制间接影响纤毛运动。为了说明这个问题,我们将离体法稍加改进(改良离体法),尽可能减少药液与粘膜表面以外的其它组织接触,由此,纤毛的持续运动时间从离体法的 15.9 ± 3.7 min 延长至 170.8 ± 45.2 min($n=5$),与在体法结果较为接近,表明庆大霉素对纤毛运动没有严重的直接影响。鉴于在体法的试验条件更接近人体的实际给药情况,因此结果比离体法更可靠。

综上所述,蟾蜍上腭粘膜纤毛的在体试验方法结果可靠,简便易行,适用面广,是一种较理想的鼻纤毛毒性评价方法。离体法因能进行受试药品与对照药品的同体比较,减少了动物间个体差异的影响,同时还能区别药物纤毛毒性的可逆与否,如20%安乃近溶液和1%盐酸普萘洛尔溶液均可使纤毛运动立即停止,但经生理盐水淋洗后,前者纤毛运动恢复,为可逆性影响,后者则为不可逆影响。因此对于溶液型制剂,离体法仍不失为一种优良的评价方法。

参 考 文 献

- 1 Su KSB, Campanale KM, Mendelsohn LG *et al.* Nasal delivery of polypeptides I. Nasal absorption of enkephalins in rats. *J Pharm Sci*, 1985,74:394
- 2 Hussain AA. Nasal absorption of natural contraceptive steroids in rats-progesterone absorption. *J Pharm Sci*, 1981,70:466
- 3 Donk HJM, Merkus FWHM. Decreases in ciliary beat frequency due to intranasal administration of propranolol. *J Pharm Sci*, 1982,71:595
- 4 Schipper NGM, Verhoef J, Romeijn SG *et al.* Absorption enhancers in nasal insulin delivery and their influence on nasal ciliary functioning. *J Controlled Release*, 1992,21:173
- 5 Puchelle E, Tournier JM. The frog palate for studying mucus transport velocity and mucociliary frequency. *J Respir Dis*, 1983,64(Suppl 128):293
- 6 Anthony GJR, Chung KS, Douglas SHJR *et al.* Mucus clearance, *in vivo* canine tracheal vs *in vitro* bull frog palate studies. *J Appl Physiol*, 1977,42:761
- 7 Sanderson MJ, Dirksen ER. A versatile and quantitative computer assisted photoelectronic technique used for the analysis of ciliary beat cycles. *Cell Motil*, 1985,5:267
- 8 许庚,卜国铨. 十二种药物对蛙口腔粘膜纤毛活性的影响. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1989,24:24
- 9 Gizurason S, Marriott C, Martin GP *et al.* The influence of insulin and some excipients used in nasal insulin preparations on mucociliary clearance. *Int J Pharm*, 1990,65:243

TOXICITY OF DRUGS ON NASAL MUCOCILIA AND THE METHOD OF ITS EVALUATION

XG Jiang, JB Cui, XL Fang, Y Wei and NZ Xi

(Division of Biopharmaceutics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT Effect of solutions or suspensions of eight drugs including analgin, paracetamol, propafenone hydrochloride, propranolol hydrochloride, ephedrine hydrochloride, gentamycin sulfate, sodium deoxycholate and hydrocortisone on ciliary movement were evaluated with *in vitro* or *in situ* toad palate model and scanning electron microscope.

In vitro toad palate model: 0.2 ml of test drug solution or suspension was applied to a piece of freshly dissected upper palate of toad. The mucocilia were examined with an optical microscope and the lasting time of ciliary movement was recorded after drug application. The upper palate was rinsed with physiological saline when the ciliary movement stopped. The lasting time of ciliary movement after rinsing was then recorded again.

In situ palate model: 0.5 ml of test drug solution or suspension was applied to the upper palate of toad for 30 min, and rinsed with physiological saline. The palate was dissected out and the operation was carried out in a similar manner.

The results showed that the *in situ* toad palate model is a satisfactory method for studying the ciliotoxicity of drugs. The *in vitro* toad palate model is unsuitable for suspension and gel. The results of the eight drugs revealed that ciliary movement is frequently affected by many drugs and, therefore, care must be taken in developing any nasal dosage form to ensure its least ciliotoxicity.

Key words Intranasal administration; Ciliotoxicity