

热毒宁直肠给药对幼年大鼠的急性毒性及直肠黏膜刺激实验研究^{*}

李妙媛¹, 唐坤泉¹, 李映妮¹, 熊磊^{2△}

(1. 柳州市妇幼保健院/广西科技大学附属妇产医院/儿童医院, 广西 柳州 545001;

2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 对热毒宁注射液直肠给药的急性毒性及直肠黏膜刺激性进行实验研究, 为临床热毒宁灌肠使用安全提供参考。 **方法** 将 40 只幼鼠随机分为急性毒性对照组及实验组、直肠黏膜刺激对照组及实验组, 急性毒性实验组每次直肠给药 20 mL/kg, 间隔 2 h 重复给药共 3 次, 对照组以等量 0.9% 生理盐水灌肠, 观察 7 d 后幼鼠一般情况、体质量及死亡幼鼠数。直肠黏膜刺激实验组根据临床用量每天予直肠给药 2 mL/kg, 每日 1 次, 直肠黏膜刺激对照组以等量 0.9% 生理盐水灌肠, 每日 1 次。两组连续给药 7 d 后观察对直肠黏膜刺激情况。 **结果** 急性毒性实验组幼鼠灌肠后体质量与对照组比较无统计学意义 ($P>0.05$), 灌肠后 7 d 幼鼠无中毒症状、无死亡。直肠黏膜刺激实验组幼鼠直肠黏膜刺激性与对照组刺激性水平相当, 黏膜未见损伤及分泌物, 部分可见轻中度充血。 **结论** 热毒宁注射液直肠给药安全无毒性反应, 对直肠黏膜有轻度刺激而无损伤。

关键词: 热毒宁; 大鼠; 直肠给药; 急性毒性; 直肠黏膜刺激性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2023)02-0090-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.02.018

Acute Toxicity and Rectal Mucosal Irritation of Reduning on Juvenile Rats by Rectal Administration

LI Miaoyuan¹, TANG Kunquan¹, LI Yingni¹, XIONG Lei²

(1. Liuzhou Maternity and Child Healthcare Hospital/Affiliated Maternity Hospital and Affiliated Children's Hospital of Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545001, China;

2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective The acute toxicity and rectal mucosal irritation of Reduning Injection enema were studied in order to provide reference for clinical safety of Reduning enema. **Methods** Forty juvenile rats were randomly divided into acute toxicity control group and experimental group, rectal mucosal stimulation control group and experimental group. The acute toxicity group was given rectal administration of 20 mL/kg each time, repeated three times at an interval of 2 hours, and the control group was given an equal amount of 0.9% normal saline enema. The general condition, weight and number of dead juvenile rats were observed after 7 days. The rectal mucosal stimulation group was given rectal administration of 2 mL/kg per day, according to the clinical dosage, and the rectal mucosal stimulation was observed after continuous administration for 7 days. **Results** There was no significant difference in body mass between the acute toxicity experimental group and the control group after enema ($P>0.05$). There were no poisoning symptoms and no death of the juvenile rats 7 days after enema. Rectal mucosa irritation of juvenile rats in the experimental group was similar to that in the control group. No injury or secretion was observed in the mucosa, and some mild to moderate hyperemia was observed. **Conclusion** The rectal administration of Reduning Injection is safe and non-toxic, with mild irritation to the rectal mucosa without damage.

KEY WORDS: Reduning Injection; juvenile rats; acute toxicity; rectal mucosal irritation

收稿日期: 2022-12-01

^{*} 基金项目: 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA297169); 广西中医药适宜技术开发与推广项目(GZSY20-57); 云南省科技厅重点研发计划(202103AC100005); 柳州市科技项目(2020NBAB0802)

第一作者简介: 李妙媛(1980-), 女, 在读博士研究生, 副主任医师, 研究方向: 中医儿科。

△通信作者: 熊磊, Email: xlluck@sina.com

直肠给药是一种传统的中医外治法,此方法应用范围广泛,见效快,疗效可靠,操作简便,儿童较易接受。但目前直肠给药多为中药煎剂或中成药稀释液,没有统一的标准与要求,除了个别中成药栓剂外,尚缺乏中成药灌肠专用制剂,影响了灌肠疗法的普及和推广。热毒宁注射液是儿科临床常用的中成药,是由中药青蒿、金银花、栀子制成的现代中药制剂,具有清热、疏风、解毒功效,有研究提示热毒宁具有退热、抗病毒、抗感染及提高免疫力的作用^[1-3]。研究发现热毒宁注射液对单纯疱疹病毒 HSV、肠道病毒 71 型、流感病毒 H1N1、柯萨奇病毒等均有抑制作用^[4-7]。热毒宁也是中医儿科临床诊疗指南中治疗手足口病的 A 级推荐用药,中药灌肠疗法是中医儿科临床诊疗指南中治疗手足口病的 B 级推荐疗法。为了明确热毒宁注射液直肠给药的安全性,本研究进行幼年大鼠的急性毒性实验及直肠黏膜刺激实验。

1 资料与方法

1.1 实验药物 热毒宁注射液(10 mL/支):由江苏康缘药业股份有限公司生产。批号:国药准字 Z20050217。

1.2 实验动物 SPF 级 SD 5 周龄幼鼠 40 只,体重(140±10)g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证编号为 SCXK(湘)2019-0004。室温:(23±2)℃,相对湿度:(60±10)%,光暗周期:12 h。经过 1 周适应性喂养后开始实验。

1.3 急性毒性实验 取 5 周龄 SPF 级幼鼠 20 只,雌雄各半,将雌雄幼鼠按性别随机分为 4 组,每组 5 只,将 4 组幼鼠不同性别之间随机组合为 2 组,每组 10 只,雌雄各半,分为对照组和实验组。因热毒宁注射液浓度和幼鼠肠道体积限制,且热毒宁注射液药物毒性低,单次灌肠给药无法测定半数致死量(LD50),故据大鼠直肠容纳最大量(20 mL/kg)予以最大给药量实验。实验组每次以热毒宁注射液最大浓度(35 g 生药/10 mL)和最大容积 20 mL/kg 灌肠,对照组以等量 0.9%生理盐水灌肠。灌肠时,经幼鼠肛门置入导管,深度约 5 cm,推注受试液,限制幼鼠活动,2 h 后再分别给幼鼠重复给药,药物用量均同第 1 次,共灌肠 3 次,相当于幼儿临床给药量 30 倍。灌肠后放入笼中,在室温:(23±2)℃,相对湿度:(60±10)%,光暗周期:12 h 条件下饲养。观察并记录给药后 30 min、2 h 及随后 7 d 幼鼠外观、四肢活动、饮食、排泄、体质量

等情况。每日观察幼鼠毒性反应情况,记录症状出现、加重、减轻或死亡的时间和出现反应的幼鼠数量,计算幼鼠死亡率,出现死亡幼鼠立即解剖,观察其内脏病理变化。

1.4 直肠黏膜刺激实验 取 5 周龄 SPF 级幼鼠 20 只,雌雄各半,将雌雄幼鼠按性别随机分为 4 组,每组 5 只,将 4 组幼鼠不同性别之间随机组合为 2 组,每组 10 只,雌雄各半,分为对照组和实验组。实验组使用热毒宁注射液 2 mL/kg 灌肠给药,对照组以等量 0.9%生理盐水灌肠,每日 1 次。给药后,限制幼鼠活动 2 h,以保证药液与直肠黏膜接触,连续灌肠 7 d。每日观察幼鼠外观、体质量、饮食、肛门、四肢活动、中枢神经系统等情况。第 8 d 脱颈处死后检查直肠黏膜,并取该部位(距肛门 2~10 cm)的肠段,经固定、切片、HE 染色等处理后,进行光镜观察,了解其组织结构状况,观察局部黏膜刺激情况,具体黏膜刺激分级标准见表 1。

表 1 局部黏膜刺激及反应分级标准	
形态改变	分级评分
无改变或无明显改变	0
轻度充血,少量分泌物	1
中度充血,分泌物较多	2
重度淤血水肿,分泌很多,黏膜变性	3

注:平均分值 0~0.4 为无刺激性;平均分值在 0.41~1.5 为轻度刺激性;平均分值在 1.51~2.5 为中度刺激性;平均分值>2.5 为重度刺激性

1.5 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件处理资料,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,属于正态分布采用 *t* 检验,属于非正态分布采用秩和检验方法,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性毒性实验结果

2.1.1 幼鼠一般情况及死亡率 实验组在首日连续灌肠 30 min 后出现短暂活动减少、进食减少及轻度反应冷漠外无明显的其他毒性反应,约当日灌肠结束 2 h 后恢复,灌肠后实验组大鼠口鼻及肛门无异常分泌物,与对照组幼鼠无明显差异。连续观察 7 d,动物一般情况良好,活动自如,皮毛光滑,饮食及大小便均未见明显异常;无死亡幼鼠,实验结束处死所有幼鼠,解剖后肉眼观察幼鼠心脏、肝脏、脾

脏、肺脏、肾脏未见异常。

表 2 热毒宁注射液灌肠急性毒性实验对小鼠死亡情况的影响

组别	n	给药次数(次)	给药浓度	给药容积 (mL/kg)	死亡数 (只)	病死率 (%)
对照组	10	3	0.9% NaCl	20	0	0
实验组	10	3	35 g 生药/10 mL	20	0	0

2.1.2 幼鼠体质量变化 热毒宁注射液灌肠给药后,观察 7 d 后幼鼠体质量变化情况。灌肠前 2 组间体质量比较差异无统计学差异($P>0.05$),具有可比性;灌肠后 2 组间体质量比较差异无统计学差异($P>0.05$),提示热毒宁灌肠对幼鼠体质量无影响。对照组、实验组灌肠前后自身体质量比较差异有统计学差异 ($P<0.05$),提示 2 组幼鼠体质量均增长。

表 3 灌肠前后 2 组幼鼠体质量变化

组别	给药前体质量(g)	给药 7 d 后体质量(g)	Z 值	P 值
对照组	185.90±24.07	229.40±34.41	-2.831	0.005
实验组	185.50±23.89	229.30±32.57	-2.818	0.005
t 值	0.37	0.007		
P 值	0.971	0.995		

2.2 直肠黏膜刺激实验结果

2.2.1 幼鼠一般情况 给药后每日观察幼鼠外观、体

质量、饮食、肛门、四肢活动、中枢神经系统等情况均正常。2 组体质量均呈现明显增长($P<0.05$),具体见表 4。

表 4 灌肠前后 2 组幼鼠体质量变化

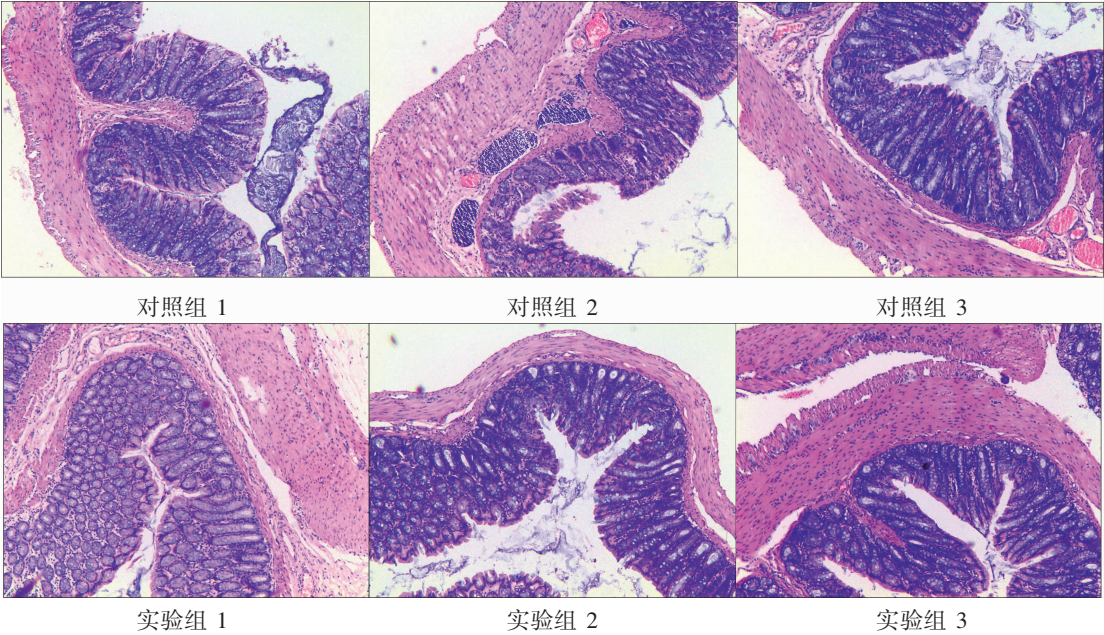
组别	给药前体质量(g)	给药 7 d 后体质量(g)	t 值	P 值
对照组	187.60±21.36	232.10±33.90	9.814	0.000
实验组	186.30±23.21	229.70±32.79	13.286	0.000
t 值	0.13	0.16		
P 值	0.89	0.87		

2.2.2 直肠黏膜刺激性 第 8 d 脱颈处死幼鼠后检查直肠黏膜,解剖观察灌肠部位黏膜完整,无异常分泌物,血管走行清晰,无局部硬结。光镜下肠黏膜完整,腺体结构无改变,黏膜腺体间无淋巴细胞浸润,上皮细胞结构完整,排列规则,部份黏膜下血管可见轻度充血,肌层完整。黏膜刺激分级参照见表 1,评分结果见表 5,切片 HE 染色见图 1。

表 5 热毒宁注射液灌肠后对直肠黏膜的刺激

组别	n	评价均值(分)	评价结果
对照组	10	0.55±0.44	轻度刺激
实验组	10	0.65±0.41 [△]	轻度刺激

注:实验组与对照组比较, [△] $P>0.05$ 。



注:对照组 1 轻度充血,对照组 2 轻度充血,对照组 3 正常;实验组 1 正常,实验组 2 中度充血,实验组 3 轻度充血。

图 1 直肠黏膜刺激实验病理切片(HE 染色×100)

3 讨论

《临证指南医案·幼科要略》强调“小儿热病最多者,以体属纯阳,六气着人,气血皆化为热也,饮食不化,蕴蒸于里,亦从热化矣”,从中医学角度分析儿童疾病以热性居多,且多与饮食不节导致胃肠功能受损相关,并最终引起呼吸道、泌尿系统等疾病发生,这与现代黏膜免疫系统理论中黏膜在局部诱导后各处黏膜出现共同免疫应答的观点是吻合的。即当某处黏膜受到免疫刺激后产生的免疫应答,可能通过黏膜免疫调节途径将免疫信号传达至另一处,从而将局部刺激扩大成一个系统或多个系统,甚至全身的免疫应答^[8]。我们推测此类免疫应答是中药灌肠疗法起效的现代生物学基础,但此方法是否会损伤黏膜或存在毒副作用,这是临床人员关注的问题。热毒宁注射液是常用清热解毒制剂,它不仅可降低患者机体肺部的炎症反应、降低外周血炎症指标^[9],并且能降低并发症,改善临床指标^[10],但临床由于中成药静脉使用的过敏风险而逐渐被限制使用或不敢使用,笔者临床常用热毒宁注射液直肠用药治疗手足口病、疱疹性咽峡炎等获效,但其毒副反应还需进一步验证。该急性毒性实验采用最大药量法进行,以幼鼠肠道体积允许的最大剂量给予幼鼠热毒宁注射液,观察幼鼠出现的急性毒性反应及体质量变化。以幼鼠灌肠的最大体积给药量为20 mL/kg,24 h内灌肠给药3次(相当于儿童临床每日等效用量的30倍),当日未见明显毒性反应,与对照组幼鼠表现无明显差异;7 d后,观察两组间幼鼠体质量无统计学意义,两组体质量增长幅度一致,提示安全无毒性反应。热毒宁注射液临床给药儿童每日剂量为0.6 mL/kg,对应大鼠实验剂量是2 mL/kg,连续给药7 d,热毒宁注射液直肠给药对大鼠直肠黏膜刺激性与对照组刺激性水平相当,黏膜未见损伤及未见分泌物,部分可见轻中度充血,评为轻度刺激性,考虑可能与多次灌肠反复刺激肠粘膜及黏膜在短时间内超负荷吸收有关。本次实验条件下,使用热毒宁注射液相当于30倍临床静脉使用剂量予大鼠直肠给药未见急性毒性反应,表明热毒宁制剂单次灌肠毒性非常低,符合安全性要求,提示拟定的儿童临床灌肠剂量安全无毒。临床剂量灌肠未见对直肠黏膜明显损伤,

与既往相关中药灌肠研究结果相符^[11]。

该实验表明:(1)热毒宁注射液单次灌肠给药无法测定LD₅₀,在最大给药量时对幼鼠无急性毒副作用,故临床拟用热毒宁注射液直肠给药是安全的。(2)热毒宁注射液多次直肠给药对幼鼠直肠黏膜有轻度刺激性,但对黏膜组织无病理性损伤。综上,提示热毒宁注射液直肠给药符合安全性要求,可供进一步临床研究使用。

参考文献:

- [1] 常秀娟,范麒麟,王红梅,等.热毒宁拆方对RAW264.7细胞炎症相关因子表达的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(2):286-290.
- [2] 张帅,王红梅,常秀娟,等.热毒宁注射液抗菌及调节免疫活性作用研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(5):1056-1060.
- [3] 赵慧,王丽,冷红春,等.热毒宁注射液治疗小儿胃肠型上呼吸道感染的效果观察[J].中华医院感染学杂志,2016,26(11):2581-2583.
- [4] 王振中,鲍琳琳,孙兰,等.热毒宁注射液抗甲型H1N1流感病毒作用机制研究[J].中草药,2014,45(1):90-93.
- [5] 李秀惠,李双杰,温韬,等.热毒宁注射液治疗重型手足口病的临床疗效评价[J].中华中医药杂志,2014,29(2):362-365.
- [6] 陈敏,乐汉娥,冯静.热毒宁注射液治疗肠道病毒71型感染重症手足口病的临床研究[J].中华医院感染学杂志,2014,24(17):4231-4233.
- [7] 葛雯,李海波,于洋,等.热毒宁注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中草药,2017,48(5):1027-1036.
- [8] 张欣悦,高永翔,谢怡敏.黏膜免疫系统研究进展[J].中药与临床,2015,6(5):64-68.
- [9] 董斌斌,赵普庆,贾维,等.热毒宁注射液治疗医院获得性肺炎前后的外周血NLR和CRP的相关性[J].云南中医学院学报,2017,40(5):40-43.
- [10] 陈勇,蒋宇桐,杨慧敏.热毒宁治疗儿童社区获得性肺炎的随机对照双盲试验研究[J].云南中医学院学报,2015,38(4):73-77.
- [11] 朱凤,楚思,吴慧,等.复方苦参灌肠剂急性毒性及直肠黏膜刺激实验研究[J].天津中医药大学学报,2020,39(5):559-563.