

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.16.015

骨康宁洗剂皮肤刺激性和过敏性实验研究*

张晓萌,王康俊,陈国彪,王巨才[△]

(海南省药品检验所·海南省药物质量研究重点实验室,海南 海口 570216)

摘要:目的 探讨骨康宁洗剂的皮肤刺激性和过敏性。方法 取家兔8只,随机分为完整皮肤组和破损皮肤组,每组4只,雌雄各半。以无菌针头划破制备破损皮肤。采用自体左右侧自身对比法,脱毛后,左侧以纱布浸骨康宁洗剂原液20 mL贴敷,右侧同法贴敷等体积纯水,单次药物刺激1,24,48,72 h及多次药物刺激1 h后,观察贴敷部位的红斑、水肿、色素沉着、出血点、皮肤粗糙、皮肤菲薄等情况,以及发生和消退时间。取豚鼠40只,随机分为药物组(20只)、空白对照组(10只)和模型组(10只),脱毛,致敏,激发。激发给药后24,48 h时观察豚鼠皮肤红斑、水肿等过敏反应症状并评分,以及是否有哮喘、站立不稳、休克等严重全身性过敏反应出现。结果 单次给药后,两组家兔的受试皮肤未见明显异常;多次给药后,破损皮肤组有2只家兔的受试皮肤出现不规则的轻度红斑(24 h后消失),其余家兔皮肤未见明显异常。激发给药24,48 h后,模型组豚鼠皮肤出现重度红斑、中度水肿,致敏率100%,药物组和空白对照组豚鼠未见过敏反应及严重的全身性过敏反应。结论 骨康宁洗剂的皮肤刺激性和皮肤过敏性均较低。

关键词:骨康宁洗剂;皮肤刺激性;皮肤过敏性;动物实验;家兔

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)16-0059-03

Skin Irritation and Hypersensitivity of Gukangning Lotion

ZHANG Xiaomeng, WANG Kangjun, CHEN Guobiao, WANG Jucan

(Hainan Institute for Drug Control · Hainan Key Laboratory for Pharmaceutical Quality Research, Haikou, Hainan, China 570216)

Abstract: Objective To investigate the skin irritation and hypersensitivity of Gukangning Lotion. Methods Eight rabbits were randomly divided into intact skin group and damaged skin group, four rabbits in each group with half male and half female. The damaged skin was prepared by cutting with a sterile needle. The homobody left and right sides self-comparison method was adopted. After depilation, 20 mL of Gukangning Lotion was applied on the left side of the rabbit with gauze, and an equal volume of pure water was applied on the right side of the rabbit with the same method. After single drug stimulation for 1, 24, 48, 72 h and multiple drug stimulation for 1 h, the erythema, edema, pigmentation, bleeding point, rough skin and thin skin at the application site were observed, as well as the occurrence and regression time. A total of 40 guinea pigs were randomly divided into the drug group (20 guinea pigs), blank control group (10 guinea pigs) and model group (10 guinea pigs), and they were depilated, sensitized and stimulated. After 24 h and 48 h of stimulation, the hypersensitivity reactions symptoms such as skin erythema and edema of guinea pigs were observed and scored. Meanwhile, whether there were severe systemic hypersensitivity such as asthma, instability or shock were closely observed. Results After a single administration, there was no obvious abnormality in the tested skin of rabbits in the two groups. After repeated administration, irregular mild erythema appeared on the skin of two rabbits in the damaged skin group (disappeared after 24 h), and no obvious abnormality was found on the skin of other rabbits. After 24 h and 48 h of stimulation, severe erythema and toxic edema appeared on the skin of guinea pigs in the model group, and the sensitization rate was 100%. Guinea pigs in the drug group and the blank control group had no allergy and severe systemic hypersensitivity reactions. Conclusion Gukangning Lotion has a low risk of skin irritation and hypersensitivity.

Key words: Gukangning Lotion; skin irritation; skin hypersensitivity; animal experiment; rabbits

膝骨关节炎(KOA)为严重影响中老年患者生活质量的慢性退行性疾病,属中医“痹证”范畴,中医药在临床治疗 KOA 中发挥了重要作用。骨康宁洗剂主要由红花、防风、当归、羌活、血竭组方,主要功效为活血止痛、通络除湿,可用于治疗膝骨关节功能障碍、风寒湿痹引起的关节炎等。为保证骨康宁洗剂临床用药的安全、有效、可控,根据国家药品监督管理局《证候类中药新药临床研究技术指导原则》及原国家食品药品监督管理局药品评审中心《中药、天然药物刺激性和溶血性研究的指

导原则》《中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究的技术指导原则》等文件,通过动物实验,对骨康宁洗剂的皮肤刺激性和过敏性进行了系统研究,为其临床应用提供参考^[1]。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); UW8200S 型电子天平(日本 Shimadzu 公司); RTZ-10A-RT 型婴儿秤(无锡市衡器厂有限公司)。

*基金项目:国家科技支撑计划项目[2007BA127B00]。

第一作者:张晓萌,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品检验,(电话)0898-66832940。

[△]通信作者:王巨才,男,大学本科,主任药师,研究方向为药品、医疗器械、化妆品检验检测,(电话)0898-66832908。

试药:骨康宁洗剂(驻马店骨科医院自制,批号为20191101);2,4-二硝基氯代苯(上海试剂一厂,批号为89-09-01);丙酮(洛阳市化学试剂厂,批号为130304);水为娃哈哈纯净水。

动物:健康成年日本大耳家兔8只,普通级,体质量2.0~3.0 kg,雌雄各半,购自华兰生物疫苗有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(豫)2020-0003,合格证号为NO. 1109662011000098。健康 Hartely 白色豚鼠,普通级,体质量250~350 g,雌雄不拘(雌性无孕或未曾产仔),购自陕西省实验动物质量监督检测中心,实验动物生产许可证号为SCXK(豫)2017-001,合格证号为NO. 61003200000425。动物实验室符合国家相关规定,实验期间家兔单笼饲养,豚鼠雌雄分笼饲养、每笼5只,环境温度(23±2)℃,相对湿度50%~65%,光照明暗交替各12 h,动物自由饮水、摄食,通风良好,适应性喂养3 d后进行实验。本实验经我所实验动物伦理委员会审核通过,符合《实验动物福利伦理审查指南》要求。

1.2 实验方法

1.2.1 皮肤刺激性实验

分组:取家兔8只,随机分为完整皮肤组和破损皮肤组,每组4只,雌雄各半。实验前24 h,用理发器对家兔背部(脊柱两侧)进行剃毛,再用6%硫化钠溶液进行脱毛,去毛范围左、右各10 cm×10 cm。破损皮肤组在用药部位用无菌8号针头划“井”字,以渗血为度制备破损皮肤。给药前检查去毛皮肤的完整性,有损伤者不得纳入完整皮肤组。

给药:采用同体左右侧自身对比法,取纱布7.5 cm×7.5 cm,4层,浸骨康宁洗剂原液(20 mL,参照人体用法用量),贴于左侧已去毛的皮肤上,用塑料薄膜覆盖,再用无刺激性胶布和绷带固定;右侧皮肤同法贴敷纯净水(20 mL)浸润纱布,作为空白对照。贴敷6 h后,除去受试物后用温水清洁给药部位,破损皮肤采用无菌操作。每天给药1次,连续7 d。

观察指标:单次给药时于首次贴敷去除药物后1, 24, 48, 72 h,多次给药时于每次去除药物后1 h,肉眼观察并记录贴敷部位是否有红斑、水肿、色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄等情况,以及发生时间和消退时间。如存在持久性损伤,则延长观察期限,以评价上述变化的恢复情况和时间(不超过14 d)。对于出现中度及中度以上皮肤刺激性的家兔,在观察期结束时对给药局部进行病理组织学检查。

评分标准:无红斑、轻度红斑、中度红斑、重度红斑和水肿性红斑分别计0,1,2,3,4分;无水肿、轻度水肿、中度水肿、重度水肿、严重水肿分别计0,1,2,3,4分(过敏反应中后2种水肿均计3分)。刺激分值=(红斑积分+水肿积分)/动物只数。刺激分值<0.50为无刺激性,

0.50~2.99为轻度刺激性,3.00~5.99为中度刺激性,6.00~8.00为强度刺激性。

1.2.2 皮肤过敏性实验

分组:取豚鼠40只,随机分为药物组(20只)、空白对照组(10只)和模型组(10只)。致敏前24 h,用理发器对豚鼠脊柱左侧进行剃毛,再用6%硫化钠溶液脱毛,去毛范围10 cm×6 cm,激发前24 h同法对脊柱右侧进行脱毛处理。

给药:致敏,各组分别于第0,7,14天对左侧去毛皮肤给予骨康宁洗剂(20 mL)、纯净水(20 mL)和1% 2,4-二硝基氯代苯丙酮溶液(0.2 mL),将骨康宁洗剂和纯净水分别浸入4层7.5 cm×7.5 cm的纱布后贴于左侧去毛皮肤上,2,4-二硝基氯代苯丙酮溶液均匀涂于左侧去毛皮肤上,均用塑料薄膜覆盖,再用无刺激性胶布和绷带加以固定,贴敷6 h后除去受试物,用温水清洁给药部位。激发,首次致敏后第28天,各组豚鼠右侧去毛区贴敷受试物,操作同致敏给药。

观察指标:激发给药后24,48 h观察豚鼠皮肤红斑、水肿等过敏反应症状并评分,同时密切观察豚鼠是否有哮喘、站立不稳、休克等严重的全身性过敏反应出现。如结果难以判定,1周后再次激发。

评分标准:基本同皮肤刺激性实验,但最高分1分。皮肤过敏反应积分≥1分的均判为皮肤过敏反应阳性,强度分为弱敏性、轻度致敏、中度致敏、强致敏、极强致敏,对应的过敏反应发生率分别为0~8%,9%~28%,29%~64%,65%~80%,81%~100%。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,过敏反应评分用Kruskal-Wallis检验,计数资料行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤刺激性实验

单次给药后,破损皮肤组和完整皮肤组家兔的受试皮肤未见明显异常。多次给药后,破损皮肤组2只家兔受试皮肤出现不规则的轻度红斑,24 h后红斑消失,均未见色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄、水肿现象发生。完整皮肤组家兔的皮肤未见明显异常。详见表1。

外用药对破损皮肤有轻微的刺激性是普遍现象。本实验中,破损皮肤组的家兔受试皮肤出现的轻度红斑无规律性,持续时间短,与自身空白对照比较无明显差异($P > 0.05$),考虑为建模、活动刚蹭时的刺激引起,非药物引起的刺激反应。

2.2 皮肤过敏性实验

激发给药24 h和48 h后,模型组豚鼠皮肤出现重度红斑、中度水肿,致敏率100%,药物组和空白对照组豚鼠皮肤未见过敏现象,未出现哮喘、站立不稳、休克等

表 1 家兔皮肤刺激性实验结果 ($\bar{X} \pm s$, 分, $n=4$)

Tab. 1 Results of skin irritation test in rabbits ($\bar{X} \pm s$, point, $n=4$)

时间点		完整皮肤组		破损皮肤组	
		骨康宁洗剂	纯净水	骨康宁洗剂	纯净水
单次给药后	1 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
多次给药后	1 d	0	0	0	0
	2 d	0	0	0	0
	3 d	0	0	0.25 ± 0.5	0
	4 d	0	0	0	0
	5 d	0	0	0	0
	6 d	0	0	0.25 ± 0.5	0
	7 d	0	0	0	0

表 2 豚鼠激发实验结果

Tab. 2 Results of the stimulation test in guinea pigs

组别	致敏反应积分(分)		致敏强度		评价
	24 h	48 h	致敏数(只)	致敏率(%)	
药物组($n=20$)	0*	0*	0	0	无致敏性
空白对照组($n=10$)	0*	0*	0	0	无致敏性
模型组($n=10$)	3.3	2.9	10	100	强致敏性

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in the model group,* $P < 0.05$.

严重的全身性过敏反应($P < 0.05$),可判断骨康宁洗剂无致敏性。详见表 2。

3 讨论

KOA 主要临床表现为膝关节疼痛、肿胀、僵硬、功能障碍,严重时导致关节畸形甚至丧失功能,影响患者的正常生活和工作^[2]。《膝关节炎中医诊疗指南(2020 年版)》指出,中草药/成药外用适用于 KOA 的发作期、缓解期、康复期。对治疗 KOA 的中成药组方规律进行分析^[3],涉及的 289 味中药用药频次排序,当归(75 次)第 1,红花(53 次)第 3,羌活(47 次)第 6,防风(45 次)第 8;常用药材组合中,当归-羌活出现频率排第 3。

骨康宁洗剂组方中,红花所含红花黄素属查耳酮类化合物,可通过抗氧化、抑制一氧化氮产生、调节免疫应答等机制发挥抗炎作用^[4]。金晓东等^[5-6]的研究结果显示,红花能降低兔关节液中前列腺素 E_2 和白细胞介素 8 的含量,通过抑制上述致炎因子起到抑制关节炎症的作用。防风含有色原酮、多糖、挥发油、香豆素等化学成分,具有解热、抗炎、镇痛等药理活性^[7-8]。当归所含挥发油藁本内酯具有良好的镇痛作用,有机酸阿魏酸可抑制血小板聚集、改善血液循环,当归多糖的活血功效显著^[9]。羌活主要含羌胡醇、异欧前胡素、阿魏酸苯乙醇酯、挥发油等,具有抗炎、镇痛的药理作用,与当归配伍可祛风止

痛,与防风配伍可宣通气血^[10]。血竭主要成分为黄酮类、苯丙素类、皂苷类、甾醇类等,具有活血化瘀、消肿止痛功效^[11],被誉为活血化瘀“圣药”。我国现有的血竭是百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen. 和海南龙血树 *Dracaena cambodiana* Pierre ex Gagnep. 的树脂提取而成,其基源植物主要分布在我国广西和海南一带,剑叶龙血树所产血竭,又称国产血竭或广西血竭,在 1991 年被国家批准为一类新药(药材),海南龙血树所产血竭也被收入海南省地方标准^[12]。

骨康宁洗剂用于关节功能障碍、跌打损伤、腰肌劳损及风寒湿痹所致关节炎等症状的治疗,主要通过熏洗、敷贴等方式作用于体表皮肤,故有必要通过建立动物模型进行安全性的初步研究。皮肤刺激性实验中,破损皮肤组的家兔出现过不规律的轻度红斑,持续时间短,与自身空白对照比较无明显差异,考虑为破损皮肤建模、家兔活动刚蹭时的刺激所引起,非药物引起的刺激反应。皮肤过敏性实验中,药物组豚鼠未见局部和全身过敏反应。在所设实验条件下,骨康宁洗剂未引起明显的刺激性和致敏性反应,局部用药安全。

参考文献

- [1] 陶虹,耿文宁,高晓黎,等. 黄体酮热熔胶透皮贴剂皮肤用药安全性研究[J]. 中国药业,2015,24(21):76-78.
- [2] 陆艳红,石晓兵. 膝关节炎国内外流行病学研究现状及进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2012,20(6):81-84.
- [3] 高欢欢,薛志鹏,李泰贤,等. 治疗膝关节炎的中成药的组方规律分析[J]. 中国药房,2019,30(15):2096-2100.
- [4] 张宇,郑为超. 红花黄素抗炎作用机制研究概况[J]. 江苏中医药,2010,42(9):128-129.
- [5] 金晓东,张鸣. 红花注射液对兔膝关节炎组织学及关节滑液 PGE_2 、IL-8 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2009,17(3):18-19.
- [6] 金晓东,张鸣. 红花注射液对兔骨关节炎病理组织学的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2009,17(5):13-15.
- [7] 曹思思,史磊,孙佳琳,等. 防风的化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2021,35(1):95-102.
- [8] 韩晶晶,王晖. 防风妙用之药理阐发[J]. 浙江中医杂志,2015,50(2):128-129.
- [9] 黄红泓,覃日宏,柳贤福. 中药当归的化学成分分析与药理作用探究[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(58):127-153.
- [10] 赵怡坤,邸莎,徐坤元,等. 羌活的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药,2020,40(9):1232-1235.
- [11] 林忆龙,文亦磊,黄洪,等. 龙血竭化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2020,29(6):50-55.
- [12] 王辉,杨宁,吴晓鹏,等. 海南龙血树人工血竭与天然血竭的抗炎镇痛活性比较[J]. 热带生物学报,2019,10(2):159-164.

(收稿日期:2021-03-06)