

蜜蜂蜂毒涂膜剂经皮给药的安全性评价[△]

高源^{1,2*},朱凤^{1,2},杨志斌^{1,2,3},张成桂^{1,2,3},赵海荣^{1,2,3},巫秀美^{1,2,3},李玥^{1,2,3},刘衡^{1,2,3#}(1.药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心,大理大学,云南大理 671000;2.云南省昆虫生物医药研发重点实验室,大理大学,云南大理 671000;3.中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用2011协同创新中心,大理大学,云南大理 671000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2181-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.05

摘要 目的:考察蜜蜂蜂毒(BV)涂膜剂经皮给药的急性毒性、长期毒性、皮肤刺激性及过敏性反应,以评价该涂膜剂的临床前安全性。方法:以大鼠为研究对象,按BV涂膜剂高、中、低剂量(144、96、48 mg/kg)给药,进行急性毒性考察;按BV涂膜剂高、中、低剂量(72、48、24 mg/kg)连续给药28 d,进行长期毒性考察。以家兔为研究对象,采用自体左右侧自身对照法,按BV涂膜剂8 mg/kg剂量给药,进行完整皮肤和破损皮肤的刺激性考察。以豚鼠为研究对象,在其左侧背部按BV涂膜剂15 mg/kg(第0、7、14天各1次)致敏给药,右侧背部按BV涂膜剂15 mg/kg激发给药,进行皮肤过敏性考察。结果:BV涂膜剂经皮给药急性毒性实验结果显示,大鼠脏器外观、脏器指数及体质量均无异常变化,未见明显全身毒性反应。长期毒性实验结果显示,末次给药24 h后,除BV涂膜剂低剂量组大鼠脾脏指数,BV涂膜剂中剂量组大鼠睾丸指数以及BV涂膜剂高、中剂量组大鼠附睾指数均显著升高,BV涂膜剂中、低剂量组大鼠血浆中PT显著延长外($P<0.05$),大鼠脏器外观及其余脏器指数、凝血指标、血液生化指标均无异常变化;2周恢复期结束后,上述指标均恢复正常。皮肤刺激性实验结果显示,部分家兔皮肤出现轻微红斑或明显的结痂现象,BV涂膜剂对家兔完整或破损皮肤均有轻度刺激性。皮肤过敏性实验结果显示,部分豚鼠皮肤出现轻微红斑,BV涂膜剂对豚鼠皮肤有轻度致敏性。结论:BV涂膜剂经皮给药未表现出急性毒性或长期毒性,仅对皮肤具有轻度刺激性和致敏性,表明该涂膜剂在实验剂量范围内安全性良好。

关键词 蜜蜂蜂毒;涂膜剂;经皮给药;急性毒性;长期毒性;刺激性;过敏性

Safety Evaluation of Bee Venom Plastics with Transdermal Administration

GAO Yuan^{1,2}, ZHU Feng^{1,2}, YANG Zhibin^{1,2,3}, ZHANG Chenggui^{1,2,3}, ZHAO Hairong^{1,2,3}, WU Xiumei^{1,2,3}, LI Yue^{1,2,3}, LIU Heng^{1,2,3} (1. National-Local Joint Engineering Research Center of Entomocetics, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Yunnan Dali 671000, China; 3. Yunnan Provincial 2011 Collaborative Innovation Center for Entomocetics, Dali University, Yunnan Dali 671000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the acute toxicity, long-term toxicity, skin irritation and anaphylaxis of Bee venom (BV) plastics, and to evaluate its preclinical safety. METHODS: The acute toxicity of BV plastics to rats was investigated after administration of high-dose, medium-dose and low-dose (144, 96, 48 mg/kg) of BV plastics. The long-term toxicity of BV plastics was investigated by continuous administration of high-dose, medium-dose and low-dose (72, 48, 24 mg/kg) of BV plastics for 28 days. The irritation of intact and damaged skin in rabbits with 8 mg/kg BV plastics was investigated by using the self-control method of left and right homologous body. The skin anaphylaxis of guinea pig were investigated after sensitized with 15 mg/kg BV plastics on the left back (on 0, 7th, 14th day) and stimulated with 15 mg/kg BV plastics on the right back. RESULTS: During the acute toxicity experiment with BV plastic, the weight of rats and the changes of viscera were normal, and there was no relevant toxic reaction. Long-term toxicity test results showed that no significant pathological changes were observed at 24 h after the last administration; the spleen index of rats in BV low-dose group, testicular index in middle-dose group and epididymis index in high-dose and middle-dose groups were significantly increased, while PT in plasma of rats in BV medium-dose and low-dose groups was significantly prolonged ($P<0.05$). There were no abnormal changes in organ appearance, other organ index, coagulation index and blood biochemical index. All above indexes became normal at the end of 2-week recovery period. Skin irritation test showed that BV plastics could cause slight erythema and obvious scab on the skin of rabbits which along

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360679、81703742);云南省科技计划重点项目(No.2017FA050)

* 硕士研究生。研究方向:心脑血管药理学。E-mail: gaoyuan4832@163.com

通信作者:研究实习生,博士研究生。研究方向:中药抗炎与免疫药理。E-mail: lheng125@126.com

with little irritation on intact or damaged skin. Skin anaphylaxis test showed that BV plastics produced mild erythema in the skin of guinea pigs, belonging to light allergy. CONCLUSIONS: No acute or long-term toxicity is observed after transdermal administration of BV plastics, which is safe and only causes mild irritation and irritability to skin, indicating there is good safety of the plastic under experiment doses.

KEYWORDS Bee venom; Plastics; Transdermal administration; Acute toxicity; Long-term toxicity; Irritation; Anaphylaxis

蜜蜂蜂毒(Bee venom, BV)为蜜蜂科动物中华蜜蜂(*Apis cerana Fabricius*)等的工蜂尾部螫刺腺体中排出的毒液^[1],具有祛风除湿、止痛等功效^[2]。BV是一种毒性很强的毒素,但同时又是一种从古至今应用广泛的天然药物,具有抗炎^[3]、镇痛^[4]、抗肿瘤^[5]等多种药理活性。多项研究表明,其在体内外均能明显延长血液凝固时间,改善微循环、溶栓等,具有活血化瘀的作用^[6-8]。

目前, BV已上市的剂型主要为注射液,主要用于治疗风湿性或类风湿性关节炎、周围神经炎及神经痛等,在获得显著临床疗效的同时也有关于其注射用药后出现不同程度过敏现象及溶血毒性的报道,严重者还会出现如过敏性休克^[9-12]等,故后来逐步被蜂针疗法替代。蜂针疗法是一种用蜜蜂或其他蜂类的螫器官作为针具,对人体相关穴位进行针刺的治疗方法^[13]。蜂针疗法集针、灸、药为一身,操作简单,疗效显著,可有效治疗强直性脊柱炎^[13]、类风湿关节炎^[14]、中风后偏瘫^[15]等。但由于蜂针刺破皮肤后,毒素经血管和淋巴管吸收,极易引起过敏反应^[16],这也是近年来蜂针疗法未能在临床治疗中广泛应用的主要原因。

因此,为改善蜂毒注射或蜂针疗法所引起的过敏反应,本课题组研发了BV新型制剂——涂膜剂。该涂膜剂不仅制备工艺简单,且使用后可在用药部位形成药膜以保护创面,具有使用舒适、刺激性小等优点,是一种很有发展前途的剂型^[17]。为验证BV涂膜剂的毒性反应和过敏反应,本课题组对其经皮给药的急性毒性、长期毒性、皮肤刺激性及过敏性进行考察,为评价该制剂临床用药的安全性提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AE240型精密电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; TL-16R型台式高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所); CA-510型全自动血凝分析仪(日本SYSMEX株式会社); xfa600型全自动血液细胞分析仪(南昌市铭志诚商贸有限公司)。

1.2 药品与试剂

BV原料药[药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心(云南),批号:20151020;采用高效液相色谱法测得纯度大于98%];涂膜剂空白基质由本课题组自制(称取聚乙烯醇-124 1.0 g,加水6.25 g,称定质量,室温溶胀24 h后,于85℃水浴加热2 h并不断搅拌,使之混匀溶胀成凝胶状,然后冷却至室温,加水补足缺失质量;另

称取95%乙醇1.875 g,依次加入0.625 g甘油、0.002 5 g聚山梨酯80、0.002 5 g氮酮,搅拌均匀;将上述后一种溶液缓慢加入前一种溶液中,搅拌均匀,即得);2,4-二硝基氯苯(DNCB,成都格雷西亚化学技术有限公司,批号:201208071);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 动物

SD大鼠, SPF级, 雄性, 体质量250~300 g; 家兔, 普通级, 雌雄各半, 体质量1.8~2.0 kg, 均由湖南莱斯克景达实验动物有限公司提供。白色成年豚鼠, 清洁级, 体质量250~350 g, 由昆明医科大学动物实验中心提供。动物使用合格证号:SYXK(滇)2018-0002。所有动物均在光照明/暗12 h交替、温度20~26℃、相对湿度40%~70%的条件下适应性喂养一定时间, 自由取食专用标准饲料、纯净水;豚鼠单笼饲养, 每天补充适量维生素C。本研究动物处置方法均符合动物实验伦理学要求。

2 方法

2.1 急性毒性实验

根据急性毒性实验要求^[18], 取大鼠60只, 随机分为正常对照组、空白基质组和BV涂膜剂高、中、低剂量组[144、96、48 mg/kg(以主药BV计算)]; 给药剂量根据本课题组前期研究摸索所得BV有效剂量1.67 mg/kg^[19]的约90、60、30倍制定, 每组12只。于实验前一天使用脱毛膏脱去大鼠眼角至耳朵部位两侧的皮毛, 作为给药部位。BV涂膜剂高、中、低剂量组大鼠分别涂抹质量浓度为20 mg/mL的BV涂膜剂(将BV原料药与涂膜剂空白基质混匀即得, 下同)3、2、1次, 单次给药体积为600 μL, 两侧给药面积均为4 cm×4 cm, 末次给药24 h后洗去残留药物;空白基质组大鼠同法涂抹涂膜剂空白基质;正常对照组大鼠不作任何处理。给药期间和给药完毕(即洗去药物)后, 每天观察并记录大鼠状态、毛发光泽、行为活动、死亡情况等;分别于给药前(第0天)和给药完毕后第7、14天称量并记录大鼠体质量。给药完毕后第14天, 各组大鼠进行大体解剖学检查, 观察心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、脑、睾丸、附睾等脏器的外观变化, 称量脏器质量并计算脏器指数[脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(g)]。

2.2 长期毒性实验

根据长期毒性实验要求^[20], 取大鼠64只, 随机分为空白基质组和BV涂膜剂高、中、低剂量组(72、48、24 mg/kg; 给药剂量根据BV有效剂量的约44、22、11倍制

定),每组16只。按“2.1”项下方法对大鼠眼角至耳朵部位进行脱毛处理,并按同样方法涂抹涂膜剂空白基质或质量浓度为20 mg/mL的BV涂膜剂300 μ L,连续给药28 d。末次给药24 h后,各组大鼠均取10只进行大体解剖,并观察心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、脑、睾丸、附睾等脏器的外观变化,计算脏器指数;同时,采用全自动凝血分析仪检测大鼠活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)、纤维蛋白降解物(FDP)和D-二聚体(D-Dimer)等凝血指标,采用全自动血液细胞分析仪检测大鼠白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、血小板(PLT)等血液生化指标。各组剩余的共24只大鼠在给药结束后继续恢复性观察2周,在恢复期结束后全部剖杀,并同法观察及检测上述指标。

2.3 皮肤刺激性实验

根据皮肤刺激性实验要求^[21],取家兔8只,随机分为完整皮肤组和破损皮肤组,每组4只。破损皮肤组家兔于首次给药前,使用无菌注射器针头划伤给药部位(即左右背部皮肤脱毛区)的表皮,以不伤真皮、有轻度渗血为度。两组家兔均采用自体左右侧自身对照法给药,右侧去毛部位涂抹质量浓度为15.6 mg/mL的BV涂膜剂0.5 mL(相当于主药BV 8 mg/kg;剂量根据大鼠有效剂量的约5倍换算制定),左侧去毛部位则涂抹相同体积的涂膜剂空白基质作为对照,给药面积均为3 cm \times 3 cm。连续给药7 d,每天1次,末次给药24 h后洗去残留药物。分别于洗去药物后第1、24、48、72 h时,观察并记录给药部位有无红斑和水肿等情况,按照皮肤刺激反应评分标准^[22]进行评分:皮肤出现红斑或焦痂时按无、极轻微、清晰、中度、重度各记0、1、2、3、4分;出现水肿时按无、轻度、清晰、中度、重度各记0、1、2、3、4分。按公式计算刺激性反应平均得分[(各时间点红斑形成总评分+各时间点水肿形成总评分)/受试动物总数]。按平均得分判定皮肤刺激性^[22]:0~0.49分为无刺激性,0.50~2.99分为轻度刺激性,3.00~5.99分为中度刺激性,6.00~8.00分为强刺激性。同时,记录家兔体质量变化、死亡情况,观察其口腔黏膜、眼睑及眼球是否出现异常情况,以及是否出现咳嗽、喷嚏、流涎、流鼻涕、流泪等行为或体征异常。

2.4 皮肤过敏性实验

根据皮肤过敏性实验要求^[21],取豚鼠24只,随机分为空白基质组、阳性对照组(DNCB)和BV涂膜剂组,每组8只。豚鼠背部两侧去毛,面积均为3 cm \times 3 cm,左侧用于致敏给药,右侧用于激发给药。分别在各组豚鼠左侧脱毛区涂抹涂膜剂空白基质、DNCB的1%丙酮溶液0.2 mL和质量浓度为100 mg/mL的BV涂膜剂0.12 mL(相当于主药BV 15 mg/kg;剂量根据大鼠有效剂量的约10倍换算制定),6 h后洗去残留药物,并于第7、14天时

以同样的方法重复上述给药过程进行致敏。于末次致敏给药后第14天时,在右侧脱毛区按上述方法给药1次进行激发。激发给药6 h后洗去残留药物,于洗去药物后即刻(0 h)和第24、48、72 h时分别观察皮肤过敏反应。按皮肤过敏反应评分标准^[22]进行评分:皮肤出现红斑或水肿时按无、轻度、中度、重度各记0、1、2、3分,出现水肿性红斑时记4分。按公式计算皮肤过敏反应平均得分[(红斑形成总分+水肿形成总分)/受试动物总数]和过敏发生率[出现皮肤红斑或(/)水肿的动物例数(不论程度轻重)/受试动物总数 \times 100%]。按过敏发生率判定皮肤致敏性^[23]:过敏发生率为0~8%、9%~28%、29%~64%、85%~80%、81%~100%分别表示较弱、轻度、中度、重度、极度致敏性。同时,观察豚鼠是否出现哮喘、站立不稳或休克等严重的全身变态反应。

2.5 统计学方法

采用Excel 2007软件处理实验数据,采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。对于正态分布的计量资料进行方差分析,若方差齐,则采用Dunnet's检验进行组间两两比较;对于非正态分布的计量资料和经数据转换后方差仍不齐的计量资料,则采用非参数检验如秩和检验进行分析;对于计数资料,采用 χ^2 检验进行分析。PT、APTT、TT水平采用中位数 \pm 标准误($M \pm D$)表示,脏器指数及FIB、FDP、D-Dimer水平采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠急性毒性实验结果

3.1.1 大鼠一般情况及全身毒性反应发生情况 给药后,BV涂膜剂各剂量组大鼠的活动程度降低,给药部位在数分钟内出现不同程度的肿大,BV涂膜剂高剂量组个别大鼠出现轻微的腹式呼吸;洗去药物后,大鼠给药部位肿胀程度有所减轻,且约在6 h后完全消失,48 h后腹式呼吸完全消失,基本恢复正常状态。正常对照组和空白基质组大鼠在此过程中均未观察到异常现象。给药完毕后观察14 d,结果全部大鼠均存活,BV涂膜剂各剂量组大鼠体质量变化与空白基质组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),结果见表1。

表1 急性毒性实验中各组大鼠体质量变化比较($\bar{x} \pm s$, $n = 12, g$)

Tab 1 Comparison of body weight change of rats in acute toxicity test of each group ($\bar{x} \pm s, n = 12, g$)

组别	给药完毕时	给药完毕后第7天	给药完毕后第14天
正常对照组	220.8 \pm 5.3	225.7 \pm 8.3	237.5 \pm 12.5
空白基质组	218.3 \pm 4.2	223.2 \pm 6.7	233.5 \pm 12.8
BV涂膜剂高剂量组	217.1 \pm 5.8	222.4 \pm 9.5	232.6 \pm 12.7
BV涂膜剂中剂量组	218.3 \pm 4.7	225.5 \pm 10.1	233.3 \pm 11.6
BV涂膜剂低剂量组	217.6 \pm 6.5	219.8 \pm 12.5	231.7 \pm 12.9

3.1.2 脏器外观变化及脏器指数 与正常对照组比较,空白基质组和BV涂膜剂各剂量组大鼠的各脏器外观均

无明显异常病变;与空白基质组比较,BV涂膜剂各剂量组大鼠的各脏器指数差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表2。

表2 急性毒性实验中各组大鼠脏器指数比较($\bar{x} \pm s, n=12, \text{mg/g}$)

Tab 2 Comparison of viscera indexes of rats in acute toxicity test of each group($\bar{x} \pm s, n=12, \text{mg/g}$)

组别	心	肝	脾	肺	肾
正常对照组	2.79±0.22	29.55±1.75	1.76±0.16	4.80±0.55	7.07±0.61
空白基质组	2.79±0.23	28.79±1.96	1.84±0.27	4.47±0.18	7.02±0.54
BV涂膜剂高剂量组	2.71±0.18	27.95±1.41	1.82±0.24	4.66±0.30	7.15±0.51
BV涂膜剂中剂量组	2.80±0.24	28.82±2.56	1.98±0.29	4.83±0.47	7.36±0.39
BV涂膜剂低剂量组	2.93±0.20	29.02±4.24	1.88±0.33	4.69±0.72	6.99±0.52
组别	胸腺	肾上腺	脑	睾丸	附睾
正常对照组	1.04±0.28	0.14±0.04	5.50±0.30	13.47±1.11	3.04±0.31
空白基质组	1.04±0.30	0.12±0.05	5.56±0.37	13.35±1.15	2.95±0.33
BV涂膜剂高剂量组	0.99±0.16	0.14±0.03	5.53±0.49	13.03±0.69	3.10±0.40
BV涂膜剂中剂量组	1.19±0.29	0.15±0.05	5.74±0.44	13.83±0.88	3.15±0.28
BV涂膜剂低剂量组	1.03±0.31	0.13±0.04	5.32±0.52	13.22±0.85	3.13±0.34

3.2 大鼠长期毒性实验结果

3.2.1 脏器外观变化及脏器指数 在末次给药24 h后及恢复期结束后,经解剖观察可见,BV涂膜剂各剂量组大鼠脏器均未见明显病变。在末次给药24 h后,与空白基质组比较,BV涂膜剂低剂量组大鼠的脾脏指数,BV涂膜剂中剂量组大鼠的睾丸指数,BV涂膜剂高、中剂量组大鼠的附睾指数均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);BV涂膜剂各剂量组大鼠的胸腺指数虽有升高的趋势,但差异均无统计学意义($P>0.05$);其他脏器指数未出现明显变化,结果见表3。恢复性观察2周后,BV涂膜剂各剂量组大鼠脏器指数与空白基质组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表4。

表3 长期毒性实验末次给药24 h后各组大鼠脏器指数比较($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$)

Tab 3 Comparison of viscera indexes of rats in long-term toxicity test 24 h after last administration of each group($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg/g}$)

组别	心	肝	脾	肺	肾
空白基质组	2.58±0.28	27.03±1.63	1.54±0.20	4.18±0.33	6.25±0.54
BV涂膜剂高剂量组	2.56±0.25	27.04±3.07	1.73±0.22	4.38±0.29	6.35±0.66
BV涂膜剂中剂量组	2.56±0.26	26.89±3.23	1.69±0.20	4.35±0.40	6.06±0.49
BV涂膜剂低剂量组	2.56±0.20	26.01±1.98	1.79±0.14 ^a	4.25±0.50	6.17±0.50
组别	胸腺	肾上腺	脑	睾丸	附睾
空白基质组	0.47±0.30	0.10±0.04	4.91±0.45	11.42±1.39	3.39±0.42
BV涂膜剂高剂量组	0.56±0.19	0.15±0.05	4.84±0.51	11.98±1.60	3.95±0.46 ^a
BV涂膜剂中剂量组	0.53±0.18	0.14±0.06	4.52±0.37	12.78±0.83 ^a	3.88±0.23 ^a
BV涂膜剂低剂量组	0.59±0.28	0.14±0.06	4.60±0.76	12.38±1.84	3.77±0.58

注:与空白基质组比较,^a $P<0.05$

Note: vs. blank matrix group, ^a $P<0.05$

3.2.2 凝血指标 末次给药24 h后,与空白基质组比较,BV涂膜剂中、低剂量组大鼠血浆中PT显著延长,差异均有统计学意义($P<0.05$),其余指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表5。2周恢复期结束后,

表4 长期毒性实验恢复期结束后各组大鼠脏器指数比较($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mg/g}$)

Tab 4 Comparison of viscera indexes of rats in long-term toxicity test after the end of recovery period of each group($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mg/g}$)

组别	心	肝	脾	肺	肾
空白基质组	2.63±0.15	24.98±1.71	1.72±0.28	4.43±0.44	6.14±1.06
BV涂膜剂高剂量组	2.62±0.22	24.79±2.06	1.82±0.34	4.29±0.36	6.38±0.63
BV涂膜剂中剂量组	2.57±0.17	23.90±1.83	1.81±0.35	4.63±0.46	6.31±0.37
BV涂膜剂低剂量组	2.69±0.20	25.21±1.58	1.72±0.22	4.26±0.49	6.16±1.20
组别	胸腺	肾上腺	脑	睾丸	附睾
空白基质组	0.42±0.30	0.14±0.04	5.45±0.46	13.04±1.60	4.21±0.64
BV涂膜剂高剂量组	0.56±0.19	0.13±0.03	4.71±0.36	11.93±0.76	3.92±0.19
BV涂膜剂中剂量组	0.55±0.18	0.14±0.04	4.84±0.58	12.91±1.15	4.40±0.46
BV涂膜剂低剂量组	0.59±0.28	0.13±0.02	4.83±0.56	12.86±1.22	4.13±0.42

与空白基质组比较,BV涂膜剂各剂量组大鼠的各指标水平差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表6(注:表5、表6中PT、APTT、TT水平用 $M \pm D$ 表示;FIB、FDP、D-Dimer水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示)。

表5 长期毒性实验末次给药24 h后各组大鼠凝血指标比较($n=10$)

Tab 5 Comparison of coagulation indexes of rats in long-term toxicity test 24 h after last administration of each group($n=10$)

组别	PT, s	APTT, s	TT, s	FIB, g/L	FDP, mg/L	D-Dimer, mg/L
空白基质组	15.87±0.34	40.61±6.02	29.47±0.82	2.05±0.21	3.17±3.02	0.79±0.23
BV涂膜剂高剂量组	16.04±0.19	34.81±5.22	29.04±0.71	2.06±0.10	3.54±3.84	0.85±0.06
BV涂膜剂中剂量组	16.37±0.25 ^a	40.73±5.12	31.89±1.09	1.95±0.28	3.06±3.49	0.84±0.07
BV涂膜剂低剂量组	16.26±0.13 ^a	40.57±4.74	30.99±0.76	1.98±0.13	2.19±0.23	0.93±0.20

注:与空白基质组比较,^a $P<0.05$

Note: vs. blank matrix group, ^a $P<0.05$

表6 长期毒性实验恢复期结束后各组大鼠凝血指标比较($n=6$)

Tab 6 Comparison of blood coagulation indexes in rats after the end of recovery period of each group($n=6$)

组别	PT, s	APTT, s	TT, s	FIB, g/L	FDP, mg/L	D-Dimer, mg/L
空白基质组	16.57±0.96	39.53±5.56	29.20±0.63	2.06±0.18	3.53±2.42	0.82±0.13
BV涂膜剂高剂量组	16.32±0.62	37.75±7.16	29.00±0.64	2.11±0.22	3.58±1.88	0.80±0.08
BV涂膜剂中剂量组	14.93±3.75	34.60±3.99	29.62±0.74	1.97±0.11	3.77±1.65	0.82±0.03
BV涂膜剂低剂量组	16.04±0.59	36.14±5.68	29.94±1.32	1.94±0.35	3.12±2.14	0.82±0.07

3.2.3 血液生化指标 末次给药24 h后及2周恢复期结束后,与空白基质组比较,BV涂膜剂各剂量组大鼠血液生化指标水平差异均无统计学意义($P<0.05$),结果见表7、表8。

3.3 家兔皮肤刺激性实验结果

给药期间,各组家兔均存活,体质量平稳增长;结膜、口腔黏膜和气管黏膜未见有分泌物、充血、紫绀、黄疸等现象;未见眼睑下垂,眼球突出、震颤和混浊现象;未见咳嗽、喷嚏、流涎、流鼻涕、流泪等现象,呼吸平稳;

行为、动作和肌肉张力等均未见异常表现,饮食、大小便也未见异常。

表7 长期毒性实验末次给药24 h后各组大鼠血液生化指标比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 7 Comparison of blood biochemical parameters of rats in long-term toxicity test 24 h after last medication of each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	WBC, $\times 10^9 L^{-1}$	RBC, $\times 10^{12} L^{-1}$	HGB, g/L	PLT, $\times 10^9 L^{-1}$
空白基质组	4.47 ± 1.34	7.36 ± 1.45	189.67 ± 41.26	327.78 ± 72.94
BV涂膜剂高剂量组	5.54 ± 2.13	6.92 ± 1.25	185.50 ± 6.49	374.90 ± 75.09
BV涂膜剂中剂量组	5.99 ± 2.27	6.82 ± 0.48	181.60 ± 18.36	297.70 ± 56.73
BV涂膜剂低剂量组	5.41 ± 2.32	7.24 ± 0.50	191.90 ± 11.43	342.70 ± 63.01

表8 长期毒性实验恢复期结束后各组大鼠血液生化指标比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 8 Comparison of blood biochemical parameters of rats in long-term toxicity test after the end of recovery period of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	WBC, $\times 10^9 L^{-1}$	RBC, $\times 10^{12} L^{-1}$	HGB, g/L	PLT, $\times 10^9 L^{-1}$
空白基质组	5.50 ± 0.40	7.75 ± 0.58	211.17 ± 10.48	359.50 ± 39.13
BV涂膜剂高剂量组	5.90 ± 1.33	7.61 ± 0.49	205.00 ± 23.00	407.00 ± 140.50
BV涂膜剂中剂量组	5.86 ± 0.42	7.39 ± 0.40	196.67 ± 9.24	380.17 ± 74.48
BV涂膜剂低剂量组	5.18 ± 1.63	7.48 ± 0.54	201.00 ± 6.07	333.17 ± 107.48

给药3 d后,完整皮肤组部分家兔BV涂膜剂侧出现轻微红斑,皮肤破损组部分家兔BV涂膜剂侧出现明显的结痂现象,两组家兔BV涂膜剂侧均未见红肿现象,提示BV涂膜剂对家兔的完整皮肤和破损皮肤均有轻度刺激性,结果见表9、表10。在去除药物后1、24、48、72 h时,两组家兔涂膜剂侧皮肤的红斑情况较连续给药结束时明显减轻,仅1只家兔皮肤恢复较慢,并伴有色素沉着、皮肤粗糙及出血点等情况。

表9 皮肤刺激性实验中完整皮肤组家兔刺激性评分($n=4$)

Tab 9 The irritation score of rabbits in intact skin group in irritation test ($n=4$)

给药部位	动物编号	红斑分值	水肿分值	总平均分	结果判断
BV涂膜剂侧	1	1.5	0	0.625	轻度刺激性
	2	0	0		
	3	0	0		
	4	1.0	0		
涂膜剂空白基质侧	1	0	0	0	无刺激性
	2	0	0		
	3	0	0		
	4	0	0		

3.4 豚鼠皮肤过敏性实验结果

给药期间,3组豚鼠均未出现哮喘、站立不稳或休克等严重的全身变态反应。空白基质组豚鼠给药部位皮肤均未见红斑及水肿现象;阳性对照组豚鼠给药部位皮肤均出现明显红斑或水肿;BV涂膜剂组有3只豚鼠皮肤即刻产生轻微红斑,其中2只豚鼠的红斑在24 h内消失,1只豚鼠的红斑在72 h仍未消失,但均未发生水肿现象,提示BV涂膜剂对皮肤具有轻度致敏性,结果见表11。

表10 皮肤刺激性实验中破损皮肤组家兔刺激性评分($n=4$)

Tab 10 The irritation score of rabbits in damaged skin group in skin irritation test ($n=4$)

给药部位	动物编号	红斑分值	水肿分值	总平均分	结果判断
BV涂膜剂侧	1	1.0	0	1.25	轻度刺激性
	2	1.0	0		
	3	1.5	0		
	4	1.5	0		
涂膜剂空白基质侧	1	0	0	0	无刺激性
	2	0	0		
	3	0	0		
	4	0	0		

表11 皮肤过敏性实验中各组豚鼠皮肤过敏性反应得分及过敏发生率比较($n=8$)

Tab 11 Comparison of skin allergic reaction score and the incidence of allergy in guinea pigs in skin anaphylaxis test of each group ($n=8$)

组别	过敏性反应平均得分				过敏发生率, %				过敏性评价结果
	即刻	24 h	48 h	72 h	即刻	24 h	48 h	72 h	
空白基质组	0	0	0	0	0	0	0	0	无致敏性
阳性对照组	2	2.625	2.125	1.625	100	100	100	100	极度致敏性
BV涂膜剂组	0.8125	0.25	0.25	0.125	25	12.5	12.5	12.5	弱致敏性

4 讨论

皮肤是人体的天然屏障,也是人体主要的排泄器官,对人体具有重要的保护作用。皮肤是药物吸收的重要系统之一,当药物经皮肤进入血液循环时,可避免消化道内消化酶的破坏及肝脏的首关效应,在不会引起胃肠道反应的同时,还能直接作用于靶部位发挥疗效^[24]。涂膜剂是药物与成膜材料制成的供外用涂抹,可形成薄膜的局部液体制剂^[25],相较于注射剂和传统中药膏剂、巴布剂等,其具有体积小、使用方便等优势。

本课题组前期研究发现,BV在体内外均具有抗血栓活性^[26],且在溶栓^[27]和治疗类风湿性关节炎^[16]、中风^[25]等方面效果显著。为减轻蜂毒注射液等制剂的不良反应、改善患者顺应性,本课题组基于传统蜂针疗法理念研制BV涂膜剂,旨在使其具备以下优势:(1)避免药物在胃肠道及肝的首关效应;(2)维持恒定的血药浓度或药理效应,增强治疗效果;(3)减少副作用,降低毒性,患者若有不适感随时可将膜撕去,且短期内即可恢复正常;(4)延长作用时间,减少用药次数;(5)患者可自主用药,增加用药顺应性。

基于此,本研究采用BV涂膜剂经皮给药,对其安全性进行考察。急性毒性实验结果显示,给予BV涂膜剂后,大鼠体质量及脏器均无异常变化,且未出现相关性反应。长期毒性实验结果显示,连续给药28 d,与空白基质组比较,除BV涂膜剂低剂量组大鼠脾脏指数,中剂量组大鼠睾丸指数以及高、中剂量组大鼠附睾指数显著增加外($P < 0.05$),其余脏器指数未见显著差异。同时,为了解毒性反应的可逆程度和可能出现的延迟性毒

性反应,在长期给药完毕后2周恢复期间观察发现,大鼠各脏器指数均恢复正常,且未见明显的外观异常变化。此外,大鼠凝血指标检测结果显示,与空白基质组比较,BV涂膜剂高、中剂量组大鼠血浆PT显著延长($P < 0.05$),提示其正常凝血功能受影响,但给药完毕后观察2周后上述凝血指标即恢复正常;其余凝血指标及血液生化指标均未见异常变化。该结果也提示BV涂膜剂可能具有抗凝作用,可为新型抗凝药物的研发提供新思路。急性毒性实验和长期毒性实验均表明BV涂膜剂经皮给药基本无毒。皮肤刺激性实验结果显示,BV涂膜剂经皮给药虽可引起家兔完整皮肤和破损皮肤出现轻微的红斑,但只有轻度的皮肤刺激性,且随时间延长该刺激性逐渐减弱。皮肤过敏性实验结果显示,BV涂膜剂激发了豚鼠过敏反应,过敏发生率为12.5%,表明其对豚鼠皮肤有弱致敏性。整个实验期间,各组无一动物死亡,表明BV涂膜剂以上述剂量经皮给药基本无毒,安全范围大,为临床开发BV新剂型及临床安全用药提供了实验依据。

综上所述,BV涂膜剂经皮给药在一定剂量范围内无毒性,其产生的皮肤过敏性和刺激性反应均较弱,且容易恢复,基本符合临床前安全性要求。

参考文献

- [1] MORENO M, GIRALT E. Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan[J]. *Toxins*, 2015, 7(4):1126-1150.
- [2] 钱锐.蜜蜂毒的成分、药理及医用[J].蜜蜂杂志,1998(5):7-9.
- [3] CHOI MS, PARK S, CHOI T, et al. Bee venom ameliorates ovalbumin induced allergic asthma via modulating CD4+CD25+ regulatory T cells in mice[J]. *Cytokine*, 2013, 61(1):256-265.
- [4] KANG SY, ROHDH, CHOI JW, et al. Repetitive treatment with diluted bee venom attenuates the induction of below-level neuropathic pain behaviors in a rat spinal cord injury model[J]. *Toxins*, 2015, 7(7):2571-2585.
- [5] CHOI KE, HWANG CJ, GU SM, et al. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells[J]. *Toxins*, 2014, 6(8):2210-2228.
- [6] 刘自元,孟令瑜,吴围屏,等.蜂毒有效成分分离及其抗血栓作用的研究[J].中国生化药物杂志,1998,19(6):381-383.
- [7] 徐彭,欧阳永伟,肖诚.蜂毒活血化淤作用的实验观察[J].中草药,1996,27(9):542-544.
- [8] 吴围屏,刘自元,孟令瑜.蜂毒体外抗凝和降粘作用初探[J].蜜蜂杂志,1999(6):3-4.
- [9] SOBOTKA AK, FRANKLIN RM, ADKINSON NF JR, et al. Allergy to insect stings: II: phospholipase A: the major allergen in honeybee venom[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1976, 57(1):29-40.
- [10] 刘红云,童富淡.蜂毒的研究进展及其临床应用[J].中药材,2003,26(6):456-458.
- [11] TOSTESON MT, HOLMES SJ, RAZIN M, et al. Melittin lysis of red cells[J]. *J Membr Biol*, 1985, 87(1):35-44.
- [12] 刘仙明,刘宗庆,刘爱兰.蜂毒注射液致严重过敏性休克1例[J].山东医药,1995(1):60.
- [13] 朱现民,尹连海.强直性脊柱炎的中医治疗与临证体会[J].黑龙江中医药,2012(1):36-37.
- [14] 段海龙.中华蜜蜂(*Apis cerana*)毒液生物活性研究及其蜂针疗法对实验性类风湿关节炎小鼠的治疗作用[D].重庆:重庆师范大学,2016.
- [15] 李全良,唐菊芬.蜂针治疗中风后遗症多组穴位交替临床观察[C]//首届全国中医蜂疗临床技术推广暨学术研讨会论文集.北京:中华中医药学会,2009.
- [16] 李万瑶,邓金峰,赖先娥,等.蜂针疗法过敏反应观察[J].蜜蜂杂志,1995(7):3-5.
- [17] 王锋,李文娜,但家立,等.蒙药消肿散涂膜剂皮肤刺激和皮肤过敏实验研究[J].遵义医学院学报,2008,31(3):243-244.
- [18] 国家食品药品监督管理局.化学药物急性毒性试验技术指导原则[S].2005.
- [19] 何苗,张枝雪,赵海荣,等.蜜蜂蜂毒涂膜剂经皮给药对实验性脑血栓大鼠的改善作用[J].中国药房,2019,30(2):182-187.
- [20] 国家食品药品监督管理局.化学药物长期毒性试验技术指导原则[S].2005.
- [21] 国家食品药品监督管理局.化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S].2005.
- [22] 申理,王春梅,赵毅,等. RT-Q 医用生物膜的生物相容性评价[J].中国组织工程研究,2012,16(34):6354-6358.
- [23] 李彦林,周云丰,李琳,等.平痠洗剂皮肤刺激和过敏性实验研究[J].中国中医药信息杂志,2016,23(2):56-58.
- [24] 朱凤,金凡茂,赵昱,等.微针经皮给药技术研究进展[J].中国生化药物杂志,2016,36(8):149-152.
- [25] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:21.
- [26] 黄茜,胡园,张成桂,等.蜜蜂蜂毒涂膜剂对SD大鼠动静脉旁路血栓形成的影响[J].中国民族民间医药,2017,26(20):45-49.
- [27] 何亚楠,张枝雪,高源,等.蜜蜂蜂毒对大鼠急性血瘀证的影响[J].中国民族民间医药,2018,27(11):10-13.

(收稿日期:2019-02-21 修回日期:2019-07-05)

(编辑:段思怡)