

## 富马酸比索洛尔鼻喷剂对蟾蜍上颌纤毛运动的影响

吴春芝<sup>1</sup>, 郝朵<sup>2</sup>, 孟根达来<sup>1</sup>, 王毅<sup>1</sup>, 谷福根<sup>1\*</sup>

1. 内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050

2. 鄂尔多斯市中心医院, 内蒙古 鄂尔多斯 017000

**摘要:** **目的** 考察富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂对蟾蜍上颌纤毛运动的影响。**方法** 以生理盐水作为对照, 10 mg/mL 去氧胆酸钠溶液作为阳性对照, 比较 100  $\mu$ L 富马酸比索洛尔鼻喷剂、25 mg/mL 富马酸比索洛尔溶液、5 mg/mL 三氯叔丁醇溶液以及 30 mg/mL 2,6-二甲基- $\beta$ -环糊精 (2,6-DM- $\beta$ -CD) 溶液对离体、在体蟾蜍上颌黏膜纤毛持续运动时间 (LTCM), 并观察组织形态的变化。**结果** 离体实验中对对照组测得的 LTCM 为最大值, 黏膜表面和纤毛清晰完整, 纤毛运动活跃。25 mg/mL 富马酸比索洛尔溶液、5 mg/mL 三氯叔丁醇溶液和 30 mg/mL 2,6-DM- $\beta$ -CD 溶液组黏膜纤毛持续摆动 30~50 min 后, 以生理盐水冲洗后, 则又很快恢复摆动, 而且持续时间很长, 且黏膜表面完整, 未见纤毛脱落现象。在体实验中对对照组黏膜表面完整, 纤毛运动非常活跃, 测得其 LTCM 为 300 min, 富马酸比索洛尔鼻喷剂组与对照组比较, 差异无显著性。**结论** 富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂经鼻腔给药后对鼻黏膜纤毛的毒性较小且为短暂和可逆的, 为今后研究该药物的鼻腔给药新制剂提供了重要参考。

**关键词:** 富马酸比索洛尔鼻喷剂; 蟾蜍上颌黏膜; 纤毛持续运动时间

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)11-1320-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.11.004

## Effect of Bisoprolol Fumarate Nasal Spray on ciliary movement of toad palate

WU Chun-zhi<sup>1</sup>, HAO Duo<sup>1</sup>, MENG Gen-da-lai<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, GU Fu-gen<sup>1</sup>

1. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

2. Ordos Central Hospital, Ordos 017000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of Bisoprolol Fumarate Nasal Spray and its formulation additives on the ciliary movement of toad palate. **Methods** Normal saline (0.9%) and 10 mg/mL sodium deoxycholate solution were used as control and positive control, respectively. The lasting time of ciliary movement (LTCM) of 100  $\mu$ L Bisoprolol Fumarate Nasal Spray, 25 mg/mL bisoprolol fumarate, 5 mg/mL chlorobutanol, and 30 mg/mL 2,6-DM- $\beta$ -CD was compared *in vitro* and *in vivo*. Also the changes of toad palate models were observed. **Results** *In vitro* experiment results indicated that the LTCM of control group was the maximum, and the mucosal surface and the cilia were clear and complete, and the ciliary movement was active. LTCMs of 25 mg/mL bisoprolol fumarate, 5 mg/mL chlorobutanol, and 30 mg/mL 2,6-DM- $\beta$ -CD group were 30—50 min, and had a longer swing time after washed with normal saline. The mucosal surface was complete with no cilia off phenomenon. *In vivo* experiment results indicated that the LTCM of control group was 300 min, and mucosal surface was complete, and cilia movement was very active. There were no significant differences between control group and Bisoprolol Fumarate Nasal Spray group. **Conclusion** Nasal cilitoxicity of Bisoprolol Fumarate Nasal Spray and its formulation additives after nasal administration is mild, transient, and reversible which can provide reference for studying a new nasal preparation of Bisoprolol Fumarate in future.

**Key words:** Bisoprolol Fumarate Nasal Spray; toad palate; lasting time of ciliary movement

富马酸比索洛尔是一种高选择性  $\beta_1$  受体阻滞剂, 具有使用剂量小, 作用时间长, 副作用小的特点, 临床用于高血压、冠心病、心律失常、心肌梗死等心血管疾病的治疗<sup>[1-2]</sup>。富马酸比索洛尔现上市

收稿日期: 2015-08-19

基金项目: 内蒙古医科大学附属医院科研基金项目 (NYFYB2010009)

作者简介: 吴春芝 (1968—), 女, 内蒙古通辽人, 副主任药师, 研究方向: 临床药学。Tel: 15947513665 E-mail: fgczh@sina.com

\*通信作者 谷福根 (1968—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 主任药师, 研究方向: 药物新剂型。Tel: (0471)6636650 E-mail: gfg1968@163.com

剂型有片剂、胶囊等口服制剂,但普遍存在吸收起效缓慢、首关效应明显、生物利用度低等缺点<sup>[3-4]</sup>。鼻腔给药制剂具有吸收起效迅速、无首关效应、生物利用度高、给药方便等优点,已成为近年来制剂领域研究的热点<sup>[5-7]</sup>。由于某些药物或附加剂可对鼻黏膜组织及黏膜纤毛产生毒性作用,从而使鼻黏膜的正常生理功能受到严重影响。因此研究药物或附加剂对鼻黏膜纤毛毒性的影响是研制药物鼻腔给药制剂的重要内容之一<sup>[8]</sup>。本研究将在前期研究富马酸比索洛尔鼻喷剂<sup>[9]</sup>的基础上,采用蟾蜍上腭黏膜模型法来评价富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂对鼻黏膜纤毛的毒性大小,旨在为今后研究富马酸比索洛尔的鼻黏膜给药新制剂提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试药与仪器

富马酸比索洛尔原料药(质量分数为 99.8%,批号 070302,海南万特制药有限公司);去氧胆酸钠(质量分数为 99.0%,批号 F20110420,国药集团化学试剂有限公司);三氯叔丁醇(质量分数≥98.0%,国药集团化学试剂有限公司);2,6-二甲基-β-环糊精(2,6-DM-β-CD,质量分数为 98.3%,山东滨州智源生物有限公司);富马酸比索洛尔鼻喷剂(批号 121105,自制,规格 5 mL:125 mg,50 掀/瓶,每掀含富马酸比索洛尔 2.5 mg)。光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 动物

中华大蟾蜍,体质量 30~50 g,雌雄不限,动物许可证书号 SCXK(蒙)2012-0001,由内蒙古医

科大学实验动物中心提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 药液的配制

按照富马酸比索洛尔鼻喷剂处方中各组份比例,以生理盐水为溶剂,分别配制 25 mg/mL 富马酸比索洛尔溶液、5 mg/mL 三氯叔丁醇溶液、30 mg/mL 2,6-DM-β-CD 溶液,置于冰箱中冷藏,备用。

### 2.2 蟾蜍上腭模型—离体法<sup>[10]</sup>

将蟾蜍仰卧,固定于蛙板上,使口腔张开,用手术剪小心分离剪取上腭黏膜,再分割成 3 mm×3 mm 的黏膜小片。用生理盐水洗去血块及杂物,将其平铺在载玻片上,于黏膜表面分别滴加 100 μL 富马酸比索洛尔鼻喷剂、25 mg/mL 富马酸比索洛尔溶液、5 mg/mL 三氯叔丁醇溶液以及 30 mg/mL 2,6-DM-β-CD 溶液,盖上盖玻片,于 40 倍光学显微镜下观察黏膜纤毛摆动情况。随后置于水蒸气饱和的层析缸中,温度保持在 20~25 ℃。此后,隔一定时间取出样品观察,如纤毛继续摆动则放回层析缸中,直至纤毛停止摆动,记录纤毛持续摆动时间(lasting time of ciliary movement, LTCM)。如纤毛停止摆动后,则用生理盐水洗去黏膜上的药液,继续观察黏膜摆动可否恢复,如可恢复摆动,记录恢复后的 LTCM。

总 LTCM=首次 LTCM+恢复后 LTCM

以生理盐水组作为对照组,以 10 mg/mL 去氧胆酸钠溶液作为阳性对照,同法测定 LTCM,计算各组的 LTCM 相对百分率。结果见表 1。

相对百分率=给药组的 LTCM/对照组的 LTCM

表 1 富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂对离体蟾蜍上腭黏膜纤毛摆动的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1 Effect of Bisoprolol Fumarate Nasal Spray and its additives on cilia movement of toad palate *in vitro* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 组 别         | 首次 LTCM/min | 恢复后 LTCM/min | 总 LTCM/min | 相对百分率/% |
|-------------|-------------|--------------|------------|---------|
| 对照          | 296.6±7.6   | 0            | 296.6±7.5  | 100     |
| 去氧胆酸钠       | 4.3±0.6     | 0            | 4.3±0.8*   | 0.02    |
| 三氯叔丁醇       | 35.3±1.6    | 125.6±5.1    | 165.2±4.8* | 0.56    |
| 2,6-DM-β-CD | 54.2±4.0    | 253.3±13.5   | 302.2±11.9 | 101.8   |
| 富马酸比索洛尔     | 30.3±4.0    | 223.3±12.3   | 251.6±5.8* | 84.8    |
| 富马酸比索洛尔鼻喷剂  | 45.3±1.5    | 234.3±16.9   | 280.5±12.3 | 94.6    |

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

对照组测得的 LTCM 为最大值,其显微镜下可观察到上腭黏膜表面和纤毛清晰完整,纤毛运动活跃,呈流水状摆动。而去氧胆酸钠组的纤毛摆动时

间仅为 4 min,非常短暂,随时间推移,镜下可见黏膜表面变得杂乱,纤毛逐步脱落;而对于 25 mg/mL 富马酸比索洛尔溶液、5 mg/mL 三氯叔丁醇

溶液和 30 mg/mL 2,6-DM- $\beta$ -CD 溶液组, 给药后黏膜纤毛持续摆动 30~50 min 后, 停止摆动, 立即以生理盐水冲洗后, 则又很快恢复摆动, 而且恢复后的持续摆动时间很长, 且镜下可见黏膜表面完整, 未见纤毛脱落现象。

阳性对照药去氧胆酸钠对离体蟾蜍上颌黏膜的纤毛毒性非常严重, 且这种抑制作用不可逆。富马酸比索洛尔鼻喷剂处方组成中主药、防腐剂三氯叔丁醇以及增溶促渗剂 2,6-DM- $\beta$ -CD 均存在不同程度的纤毛毒性, 如以 LTCM 的大小作为衡量标准, 可初步确定纤毛毒性大小的顺序为: 三氯叔丁醇 > 富马酸比索洛尔 > 2,6-DM- $\beta$ -CD, 但它们的纤毛毒

性作用都是短暂和可逆的。

### 2.3 蟾蜍上腭模型—在体法<sup>[11]</sup>

取蟾蜍 9 只, 随机分为 3 组, 分别为生理盐水组、10 mg/mL 去氧胆酸钠溶液和富马酸比索洛尔鼻喷剂组。将蟾蜍仰卧, 固定于蛙板上, 使口腔张开, 用止血钳牵拉, 防止闭合和吞咽。在其上腭黏膜处分别滴加上述药液 0.5 mL, 使药液完全浸没上腭, 30 min 后将蟾蜍断头处死, 立即用手术剪剪取上颌黏膜, 并用生理盐水洗去药物及血块。将上颌黏膜纤毛向上平铺于载玻片上, 滴加生理盐水, 盖上盖玻片, 于 40 倍光学显微镜下观察黏膜纤毛的摆动情况, 计算每组样本的 LTCM。结果见表 2。

表 2 富马酸比索洛尔鼻喷剂对在体蟾蜍上颌黏膜纤毛摆动的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Effect of Bisoprolol Fumarate Nasal Spray on cilia movement of toad palate *in vivo* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 组 别        | LTCM/min        | 恢复后 LTCM/min     | 总 LTCM/min       |
|------------|-----------------|------------------|------------------|
| 生理盐水       | 305.6 $\pm$ 4.0 | —                | 305.6 $\pm$ 4.0  |
| 富马酸比索洛尔鼻喷剂 | 42.0 $\pm$ 1.7  | 257.3 $\pm$ 20.6 | 300.5 $\pm$ 10.6 |
| 去氧胆酸钠溶液    | 0               | —                | 0                |

—未检测出数据

— no data detected

可见, 对于生理盐水组, 蟾蜍上腭黏膜表面完整, 纤毛运动非常活跃, 测得其 LTCM 为 300 min, 而去氧胆酸钠溶液组, 其黏膜表面纤毛脱落严重, 未脱落纤毛已完全停止摆动, 即使用生理盐水多次冲洗, 纤毛也未恢复摆动。对于富马酸比索洛尔鼻喷剂组, 测得其 LTCM 为 40 min, 经生理盐水冲洗后, 恢复摆动后测得其 LTCM 为 260 min, 总的 LTCM 也为 300 min, 与生理盐水组比较, 差异无显著性。

### 3 讨论

目前, 评价药物或附加剂对鼻黏膜纤毛毒性的动物模型主要有鸡胚胎气管黏膜纤毛、蛙上腭黏膜纤毛以及大鼠黏膜纤毛。其中蛙上腭黏膜纤毛模型, 廉价易得, 操作简便, 应用更广<sup>[12]</sup>。在本研究中, 采用了蟾蜍上腭黏膜纤毛模型来研究富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂对鼻黏膜纤毛毒性的影响。为了使实验结果更加可靠, 研究中同时采用了离体法与在体法两种模型。两种方法各有优缺点, 前一方法操作方便, 一只动物可同时制作多个标本, 并可作自身对照使用; 后一方法操作较烦琐, 但更接近实际用药情况, 研究结果更加可靠, 缺点是不能作自身对照。

富马酸比索洛尔鼻喷剂处方中 2,6-DM- $\beta$ -CD 既作为促渗剂, 促进富马酸比索洛尔的鼻腔黏膜吸收, 又可作为增溶剂, 改善水难溶性防腐剂三氯叔丁醇的溶解度<sup>[13-14]</sup>; 此外, 2,6-DM- $\beta$ -CD 还可减轻药物特别是三氯叔丁醇的纤毛毒性, 其原因可能为在该鼻喷剂处方中富马酸比索洛尔以及三氯叔丁醇均可与 2,6-DM- $\beta$ -CD 形成水溶性环糊精包合物, 从而使二者与上颌黏膜接触的实际浓度有所下降<sup>[9, 15]</sup>。鉴于以上原因, 富马酸比索洛尔鼻喷剂组的总 LTCM 与生理盐水对照组相比, 差异无显著性。

在体法研究中, 取样时间是在给药后 30 min, 这是基于任何粉末和颗粒在鼻腔的总滞留时间为 20~30 min, 对于液体制剂其滞留时间仅为 15 min 左右<sup>[16]</sup>。本研究结果发现, 与前述离体实验结果类似, 阳性对照组给药 30 min 后, 黏膜纤毛完全停止摆动且严重脱落, 表明其具有严重的黏膜纤毛毒性, 而对于富马酸比索洛尔鼻喷剂组, 尽管给药后黏膜纤毛摆动受到一定的抑制, 但这种影响是短暂和可逆的, 其总的 LTCM 与阴性对照组比较, 差异无显著性。

综上所述, 本实验通过蟾蜍上颌模型离体法、在体法两种方法, 考察了富马酸比索洛尔鼻喷剂及

其附加剂对鼻黏膜纤毛毒性的影响。研究结果提示,富马酸比索洛尔鼻喷剂及其附加剂均具有程度不同的纤毛毒性作用,但它们的这种不良作用都是短暂和可逆的。至于该鼻喷剂及其附加剂对人体鼻黏膜纤毛的毒性以及对鼻黏膜组织形态和生理功能的影响,还有待于在今后的研究中继续深入探讨。但本研究结果,将对今后研究开发富马酸比索洛尔的鼻腔给药制剂提供重要参考。

#### 参考文献

- [1] Zhao J H, Fu J H, Wang S M, *et al.* A novel transdermal patch incorporating isosorbide dinitrate with bisoprolol: *in vitro* and *in vivo* characterization [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1-2): 88-101.
- [2] Ishiguro H, Ikeda T, Abe A, *et al.* Antiarrhythmic effect of bisoprolol, a highly selective beta1-blocker, in patients with paroxysmal atrial fibrillation [J]. *Int Heart J*, 2008, 49(3): 281-293.
- [3] 张振清, 袁淑兰, 乔建忠, 等. 富马酸比索洛尔片剂人体药代动力学及相对生物利用度 [J]. 解放军药理学学报, 2001, 17(5): 237-239.
- [4] 刘锡钧, 陈鹭颖, 杨正管, 等. 国产富马酸比索洛尔胶囊的人体相对生物利用度研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16(1): 40-42.
- [5] 邓晋丽, 马莉, 韩峰, 等. 家兔鼻腔给药冰片-羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物的药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(3): 258-261.
- [6] 李颖, 高永良, 刘刚, 等. 经鼻腔给药的替莫唑胺脑靶向制剂对大鼠胶质瘤的治疗效果 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(5): 631-635.
- [7] 徐雄波, 潘育方, 黄志军, 等. 鼻腔给药尼莫地平纳米乳的制备及脑组织靶向性初步评价 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(8): 594-598.
- [8] Costantino H R, Illum L, Brandt G, *et al.* Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1): 1-24.
- [9] 郝朵. 富马酸比索洛尔鼻喷剂的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2013.
- [10] 张奕, 蒋新国. 鼻腔给药系统的鼻黏膜毒性及解决途径 [J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(7): 323-327.
- [11] 蒋新国, 崔景斌, 方晓玲, 等. 药物的鼻黏膜纤毛毒性及评价方法 [J]. 药学学报, 1995, 30(11): 848-853.
- [12] 张望刚, 郑高利, 吕良忠, 等. 石杉碱甲微乳鼻腔给药对蟾蜍上腭纤毛和大鼠鼻黏膜纤毛的安全性评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(12): 1160-1162.
- [13] Merkus F W, Verhoef J C, Romeijn S G, *et al.* Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats [J]. *Pharm Res*, 1991, 8(5): 588-592.
- [14] Hermens W A, Deurloo M J, Romeyn S G, *et al.* Nasal absorption enhancement of 17 beta-estradiol by dimethyl-beta-cyclodextrin in rabbits and rats [J]. *Pharm Res*, 1990, 7(5): 500-503.
- [15] Rajewski R A, Stella V J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(11): 1142-1169.
- [16] Romeo V D, deMeireles J, Sileno A P, *et al.* Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 29(1-2): 89-116.