

雾化吸入盐酸肾上腺素注射液的过敏性和刺激性研究

吴友苹¹, 徐聪², 顾利强², 林晓波², 陈颖², 徐潘生², 缪静¹, 张升^{2*}(1.浙江大学医学院附属儿童医院, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 杭州 310003; 2.杭州医学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 通过豚鼠雾化吸入给予盐酸肾上腺素注射液, 评价临床超说明书给予盐酸肾上腺素注射液的安全性。方法 通过建立雾化给药药物浓度检测方法, 确定吸入给药实际给药量。以临床使用盐酸肾上腺素给药频次与剂量结合过敏性试验评价方法, 采用豚鼠全身主动过敏试验方案, 评价盐酸肾上腺素注射液雾化吸入后对豚鼠产生的全身过敏反应及呼吸系统毒性反应。32 只豚鼠按体质量随机分成 4 组: 阴性对照组(等体积的生理盐水)、阳性对照组(致敏剂量: 20 mg·kg⁻¹ 卵白蛋白)、低剂量组(致敏剂量: 15.5 μg·kg⁻¹ 盐酸肾上腺素)和高剂量组(致敏剂量: 31 μg·kg⁻¹ 盐酸肾上腺素)。各组激发剂量是致敏剂量的 2 倍, 激发时观察过敏反应症状, 激发后采集血液与肺泡灌洗液, 全血用于检测血液学, 分离血清和肺泡灌洗液用于检测 IgE。动物解剖后取支气管与肺脏组织做组织学检测与免疫组化。**结果** 使用雾化装置给予豚鼠盐酸肾上腺素在给药 3.95 min 时可达到临床等效剂量。各组豚鼠在致敏给药期间体质量正常增长, 无明显异常反应。激发时, 阳性对照组豚鼠出现强阳性过敏反应, 阴性对照组、低剂量组和高剂量组豚鼠均无明显过敏反应。与阴性对照组比较, 阳性对照组豚鼠血液中嗜酸性粒细胞显著升高($P<0.05$), 血清和肺泡灌洗液中 IgE 含量明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 组织病理学结果显示阳性对照组豚鼠激发后肺组织内出现炎性细胞浸润, 肺泡内出现大量红细胞和渗出液; 免疫组化结果提示阳性组豚鼠肺组织内炎症症状与 B 淋巴细胞增多相关。而低剂量组和高剂量组豚鼠血液学指标、血清 IgE 含量、免疫组化和组织学检查结果均与阴性对照组无明显差异。**结论** 盐酸肾上腺素注射液经雾化给予豚鼠不发生过敏反应, 且未产生呼吸系统毒性。盐酸肾上腺素注射液雾化吸入是安全可行的。

关键词: 肾上腺素注射液; 雾化吸入; 安全性; 主动过敏; 呼吸系统

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)19-2652-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230392

引用本文: 吴友苹, 徐聪, 顾利强, 等. 雾化吸入盐酸肾上腺素注射液的过敏性和刺激性研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(19): 2652-2658.

Allergic and Irritation Study of Nebulized Inhaled Epinephrine Hydrochloride Injection

WU Youping¹, XU Cong², GU Liqiang², LIN Xiaobo², CHEN Ying², XU Pansheng², MIAO Jing¹, ZHANG Sheng^{2*}(1.Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, National Clinical Research Center for Child Health, Hangzhou 310003, China; 2.Hangzhou Medical College, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the safety of epinephrine hydrochloride injection(EHI) given by nebulized inhalation in guinea pigs with the off-label drug use. **METHODS** The actual dose of inhalation administration was determined by establishing a nebulized administration drug concentration assay. The systemic allergic reactions and respiratory toxicity of EHI after nebulized inhalation were evaluated by guinea pigs using the allergy test protocol with the combination of frequency and dose of epinephrine hydrochloride administration and allergy test. Thirty-two guinea pigs were randomly divided into 4 groups according to body weight: negative control group(equal volume of saline), positive control group(sensitizing dose: 20 mg·kg⁻¹ ovalbumin), low dose group(sensitizing dose: 15.5 μg·kg⁻¹ EHI) and high dose group(sensitizing dose: 31 μg·kg⁻¹ EHI). The excitation dose of each group was two times the sensitization dose, at the time of excitation, the symptoms of allergic reaction were observed. After excitation, blood and alveolar lavage fluid were collected, whole blood was collected for hematological testing and isolated serum and alveolar lavage fluid were used for IgE testing. Bronchial and lung tissues were taken for histological testing and immunohistochemistry after dissection. **RESULTS** Using a nebulizer device to administer EHI to guinea pigs at a clinically equivalent dose at 3.95 min of administration. The guinea pigs in all groups showed normal weight gain during sensitization administration. At the time of excitation, the guinea pigs in the positive control group showed strong positive allergic reactions, while the guinea pigs in the negative control group, low dose group and high dose group showed no significant allergic reactions. Compared with the negative control group, eosinophils in the blood of the positive control guinea pigs were significantly higher($P<0.05$) and the IgE content in the serum and alveolar lavage fluid was significantly increased($P<0.05$ or $P<0.01$). Histopathological results showed that inflammatory cells infiltrated in the lung tissue of the positive control guinea pigs after excitation, and a large number of erythrocytes and exudate appeared in the alveoli. The

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2021KY634, 2020KY529); 浙江省教育厅一般科研项目(Y202249207)

作者简介: 吴友苹, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: wuyouping@zju.edu.cn *通信作者: 张升, 男, 硕士, 助理研究员 E-mail: zhangsheng160@sina.com.cn

immunohistochemical indicated that the inflammatory symptoms in the lung tissues of the positive guinea pigs were associated with an increase in B lymphocytes. The hematological indexes, serum IgE content, immunohistochemical and histological examination results of guinea pigs in the low and high dose groups were not significantly different from those of the negative control group. **CONCLUSION** No allergic reaction and no respiratory toxicity occurred in guinea pigs given EHI by nebulization, and the administration of EHI by nebulized inhalation off-label drug use is safe and feasible.

KEYWORDS: epinephrine hydrochloride injection; nebulized inhalation; safety; active systemic anaphylaxis; respiratory system

急性喉炎为儿科常见呼吸道感染，多系病毒感染所致。因其起病急、病情进展迅速、病死率较高被列为儿科重急症。患儿发病后，如不采取及时、有效治疗极易并发喉梗阻，严重者可因呼吸循环衰竭而死亡^[1]。因此，对于急性喉炎的治疗，以消除气道炎症、保持呼吸道畅通为治疗关键。由于国内还没有儿童急性喉气管炎治疗指南，儿科临床中多以 2015 年波兰出版的《儿童喉炎、哮喘支气管炎和毛细支气管炎治疗指南》为参考，该指南明确指出对于儿童中重度喉炎(Westley 评分>3 分)推荐雾化给予肾上腺素，积极治疗并监测。糖皮质激素联合肾上腺素雾化吸入治疗急性喉炎临床疗效明确，是近年来临床广泛应用的方案^[2-4]。盐酸肾上腺素通过雾化吸入，可使药物液化成高浓度的微小雾粒，更密集、高效地分布于咽喉部及气道黏膜受体，使咽喉部和支气管黏膜血管收缩，毛细血管通透性降低，从而改善气道梗阻和减轻黏膜水肿^[5]。

目前，国外临床药物中有肾上腺素吸入溶液和消旋肾上腺素雾化剂，而国内医药市场缺乏该药的雾化吸入剂型。因此，国内儿科临床上需要使用盐酸肾上腺素治疗或缓解呼吸系统的应激反应时，常使用盐酸肾上腺素注射液经雾化装置雾化后吸入来替代。但其静脉制剂用于雾化方式给药的安全性尚需论证，属于超说明书用药，且国内外均未见注射液超给药途径雾化给药的安全性研究报道。本研究使用盐酸肾上腺素注射液，模拟临床超给药途径和给药频次，结合药物安全性评价中过敏性和刺激性研究方案，通过雾化方式使豚鼠吸入盐酸肾上腺素注射液获得药物暴露，最终探索超给药途径下盐酸肾上腺素注射液对豚鼠的过敏反应和呼吸系统毒性，以期为临床超说明书使用盐酸肾上腺素提供非临床数据支持。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司，批号：10210101；规格：1 mL : 1 mg)；肾上腺素标准品(中国食品药品检定研究院标准物质国

家标准物质中心，批号：100154-201605；纯度：99.7%)；卵白蛋白(Sigma 公司，批号：SLCD9242)。0.9%氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司，批号：OJ00A2；规格：10 mL : 0.09 g)。CD79a 一抗(ThermoFisher，货号：MA5-13212)。IgE 检测试剂盒(Bioswamp 武汉贝茵莱生物科技有限公司，货号：GU80018)。

1.2 仪器

Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司)；Promo2000 气溶胶光谱仪(德国 PALAS 公司)；Filler Holder 质量采样器(美国 Airmetrics MiniVol TAS 便携式大气粉尘采样器配件)；PARI boy SX 压缩雾化吸入机(德国百瑞有限公司)；Biotek Synergy H1 酶标仪(美国伯腾)；Leica DM4000B 显微镜(德国 Leica 公司)；ADVIA 2120 血细胞分析仪(德国拜耳)；HYJD-I-20T 离心机(北京京立离心机有限公司，离心半径 13.5 cm)。

1.3 动物

普通级 Hartley 豚鼠 32 只，雌雄各半，体质量为 275~352 g，由新昌县大市聚镇欣健兔场提供，实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2020-0005。实验动物质量合格证号：20210322Cdzz0412999820。普通环境动物实验区饲养，饲养室内温度 20.0~21.5 °C，相对湿度 45%~59%，中央空调集中通风 8~10 次·h⁻¹，光照 12 h 暗、12 h 明。自由饮水和饲料。

1.4 盐酸肾上腺素注射液雾化给药定量方法

1.4.1 雾化给药箱内样品检测方法的建立 本研究建立 HPLC 检测雾化给药箱内样品气溶胶中肾上腺素的浓度。Extend-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)，以甲醇-乙腈-庚烷磺酸钠溶液(1 : 1 : 8)为流动相；流速 2.0 mL·min⁻¹；进样量：20 μL；柱温：30 °C；检测波长：280 nm。定量方法学考察了专属性、定量限、准确度、重复性、中间精密度、线性与范围、进样盘稳定性等指标。吸入药物样品经适当处理后，取吸入药物样品 20 μL 进样分析。另取肾上腺素标准品适量，用流动相稀释成一系列浓度标准溶液(2, 4, 8, 16,

32 μg·mL⁻¹)(获得标准曲线 $y=1.649x-0.421$), 同法测定, 按外标法计算吸入药物样品中肾上腺素的含量。

1.4.2 雾化给药箱内样品的采样及浓度分析 将样品打开加入雾化给药箱内, 在雾化给药开始约 3 min 后采样, 采样时采用质量采集器从雾化给药箱中间位置收集气溶胶至滤膜上, 采样时间 5 min, 采样气流为 0.5 L·min⁻¹。然后取下滤膜至离心管中, 用 5 mL 流动相洗脱滤膜, 然后利用建立的 HPLC 分析方法检测分析洗脱液中肾上腺素的浓度, 平行样品检测浓度的 RSD 应 <10%。

1.4.3 盐酸肾上腺素注射液雾化给药剂量设计 临床上盐酸肾上腺素雾化吸入量为 1~2 mL (1~2 mg) 每次。由于雾化吸入给药的的特殊性, 吸入溶液的实际吸入药量约为总雾化药量的 10%^[6], 以 2 mL 剂量计算, 人临床实际用药剂量为 0.2 mg。按照人与动物等效剂量折算^[7], 豚鼠与人之间的折算系数为 0.031, 豚鼠体质量以 400 g 计。因此, 豚鼠的最大等效剂量以盐酸肾上腺素计为 $0.2 \text{ mg} \times 0.031 / 0.4 \text{ kg} = 0.0155 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 即 $15.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。吸入制剂类药物的用药特殊性, 需通过控制给药时间计算给药剂量, 实际给药剂量按照以下公式计算:

$$\text{给药剂量} = \frac{\text{气溶胶中药物浓度} \times \text{通气量} \times \text{给药时间}}{\text{体质量}}$$

其中, 气溶胶中药物浓度和通气量用以下公式计算:

$$\text{气溶胶中药物浓度} = \frac{\text{采样溶剂中药物浓度} \times \text{溶剂体积}}{\text{气溶胶采样体积}}$$

$$\text{通气量} (\text{L} \cdot \text{min}^{-1}) = 0.608 \times [\text{体质量}]^{0.852}$$

1.5 豚鼠雾化吸入盐酸肾上腺素过敏性及呼吸系统毒性评价

1.5.1 分组及动物实验 豚鼠 32 只, 雌雄各半, 按体质量随机分成 4 组, 每组 8 只。阴性对照组: 致敏和激发分别雾化吸入 4 mL 和 8 mL 的生理盐水; 阳性对照组: 致敏剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的卵白蛋白溶液雾化吸入 5 min, 激发剂量为同浓度的卵白蛋白溶液雾化吸入 10 min; 低剂量组: 致敏剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸肾上腺素注射液雾化吸入 4 min, 激发剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸肾上腺素注射液雾化吸入 8 min; 高剂量组: 致敏剂量为

$1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸肾上腺素注射液雾化吸入 8 min, 激发剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的盐酸肾上腺素注射液雾化吸入 16 min。

1.5.2 豚鼠过敏试验 参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[8]豚鼠全身主动过敏试验方法, 致敏阶段豚鼠雾化吸入给药 3 次, 隔日 1 次。末次给药后第 14 天以致敏 2 倍剂量吸入药物激发。致敏期间, 每天观察动物一般反应症状, 并于第 1 次和最后 1 次致敏及激发给药前测定每个动物的体质量。激发开始后即刻观察动物反应至给药结束后 30 min, 按表 1 症状详细记录症状, 判断过敏反应发生程度, 计算过敏反应发生率, 根据反应程度判断过敏反应结果。

表 1 过敏反应症状及评价标准

Tab. 1 Symptoms and evaluation criteria of allergic reaction

评分	症状	反应分级	评分	症状	反应分级
0	正常	-	11	呼吸困难	+++
1	不安宁	+	12	哮喘音	+++
2	竖毛	+	13	紫癜	+++
3	发抖	+	14	步态不稳	+++
4	搔鼻	+	15	跳跃	+++
5	喷嚏	++	16	喘息	+++
6	咳嗽	++	17	痉挛	+++
7	呼吸急促	++	18	旋转	+++
8	排尿	++	19	潮式呼吸	+++
9	排便	++	20	死亡	++++
10	流泪	++			

注: -过敏反应阴性; +过敏反应弱阳性; ++过敏反应阳性; +++过敏反应强阳性; ++++过敏反应极强阳性。

Note: - Negative results for allergic reaction; + weakly positive results for allergic reaction; ++ positive results for allergic reaction; +++ strongly positive results for allergic reaction; ++++ extremely positive results for allergic reaction.

1.5.3 血液样本采集及检测 豚鼠激发后 30 min, 以 1%戊巴比妥钠麻醉动物, 剖开腹腔, 分离出腹腔动脉, 采集新鲜血液。取 1 mL 全血加入含 EDTA-K2 的抗凝管中, 用五分类血细胞分析仪对抗凝血中白细胞进行分类检测。剩余全血加入试管中静置 1 h 后, 以 $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液用于 IgE 检测。

1.5.4 肺泡灌洗液的采集及肺、气管组织收集 豚鼠采血完毕后, 用组织剪剪开豚鼠颈部皮肤分离并暴露气管, 同时打开胸腔, 用止血钳钳住左侧肺支气管末端(隔离左肺用于组织学检测), 在气管连喉处剪一“Y”型切口, 插入带有 16 号灌胃针的 10 mL 注射器并结扎, 缓缓注入生理盐水 5 mL, 静置 10 s

后,轻轻顺时针按压胸部,将生理盐水缓慢抽回,加入离心管中,每只豚鼠重复抽取3次灌洗液^[9]。灌洗液采集结束后,剪取各豚鼠左肺和气管,放入配好的甲醛固定液中固定48 h,包埋后,脱水、脱蜡切制成厚度适中的切片,待用。

1.5.5 肺泡灌洗液与血清中 IgE 含量的检测 按 ELISA 试剂盒要求,采用双抗夹心法测定肺泡灌洗液和血清中 IgE,根据标准曲线计算出各样本中 IgE 浓度。

1.5.6 肺、气管组织切片 HE 染色 取制备好的组织切片至于 60 °C 烤片机上烤片 1 h,二甲苯脱蜡 2 次,每次 10 min,100%→90%→80%→70%梯度浓度酒精中放置 5 min,苏木素染色 5 min,冲洗干净后在 1%盐酸乙醇溶液中浸泡 3 s,碱水反蓝。而后伊红浸染 1 min,流水冲洗 1 min,70%→80%→90%→100%梯度酒精脱水,二甲苯浸泡 5 min,中性树胶封片,显微镜观察。

1.5.7 肺、支气管免疫组化试验 取脱蜡、水化后的组织切片,放入 10 mmol·L⁻¹的枸橼酸钠中微波炉加热 15 min,冷却后滴加 3% H₂O₂ 酶灭活液灭活酶 15 min, PBST 洗涤后用 3% BSA-PBST 液封闭 1 h。弃去封闭液,加入 CD79a 一抗 4 °C 孵育过夜,次日洗涤一抗后加 HRP 标签的二抗室温孵育 1 h, DAB 显色,1%盐酸乙醇溶液脱色, PBST 反蓝,封片后显微镜拍照记录。

1.6 数据处理与统计

用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据比较采用单因素方法分析(one-way ANOVA),两组间比较再采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 吸入药物浓度分析结果及吸入剂量的确定

首次给药前,对所采样的雾化箱内中间位置的样品气溶胶中肾上腺素的浓度进行检测。分析结果如下:雾化箱充满气溶胶后,采样 5 min 所得的药物吸附滤纸用 5 mL 流动相洗脱,洗脱液平行样品中肾上腺素的浓度分别为 7.418, 7.790, 8.279 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,平均浓度为 7.829 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD 为 5.51%,符合可接受标准(RSD<10%)。所以豚鼠以 400 g 计,代入“1.4.3”项下公式计算,豚鼠在雾化吸入装置中进行吸入给药约 3.95 min 可达到肾上腺素等效剂量为 15.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。因此,本试验设计低剂量组豚鼠致敏阶段在雾化吸入装置中吸

入给药时间为 4 min,激发 8 min;高剂量组豚鼠致敏阶段在雾化吸入装置中吸入给药时间为 8 min,激发 16 min。

2.2 过敏试验动物一般反应结果

致敏期间各豚鼠的饮食、活动等状态均正常。初次、末次致敏和激发当日各组动物体质量均呈增长趋势。与阴性对照组比较,阳性对照组、低剂量组和高剂量组各阶段均未见明显差异,见表 2。末次给药后 14 d 激发时,阳性对照组豚鼠均不同程度地出现搔鼻、咳嗽、发抖、呼吸困难、痉挛等明显的过敏反应症状。其中 3 只动物在激发后 8 min 内死亡,呈过敏反应极强阳性。另 5 只未死亡豚鼠在出现过敏反应症状后 1 h 内陆续恢复正常,呈过敏反应强阳性。阴性对照组激发后无明显异常反应,过敏反应呈阴性结果。结果见表 3。

表 2 豚鼠盐酸肾上腺素注射液过敏试验体质量统计结果($\bar{x} \pm s$, n=8)

Tab. 2 Weight statistics of guinea pig allergic test with epinephrin hydrochloride injection($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量		体质量/g		
	浓度/ mg·mL ⁻¹	吸入时间致 敏/激发/min	初次致敏	末次致敏	激发当日
阴性对照组	-	4/8	335±18	365±34	435±47
阳性对照组	20	5/10	332±22	357±20	458±53
低剂量组	1	4/8	337±19	349±42	463±66
高剂量组	1	8/16	336±23	353±31	438±63

表 3 盐酸肾上腺素注射液过敏性试验结果(n=8)

Tab. 3 Allergic test results of epinephrin hydrochloride injection(n=8)

过敏反应强度	各反应级别动物数 n(♂/♀)			
	阴性对照组	阳性对照组	低剂量组	高剂量组
- (阴性)	8(4/4)	0	8(4/4)	8(4/4)
+ (弱阳性)	0	0	0	0
++ (阳性)	0	0	0	0
+++ (强阳性)	0	5(3/2)	0	0
++++ (极强阳性)	0	3(1/2)	0	0

2.3 血液学检测结果

与阴性对照组比较,阳性对照组白细胞计数、淋巴细胞计数和嗜酸性粒细胞计数显著升高(P<0.05 或 P<0.01)。盐酸肾上腺素注射液处理的豚鼠白细胞分类未见明显变化。结果见表 4。

2.4 血清和肺泡灌洗液中 IgE 含量的变化

ELISA 结果显示,阳性组豚鼠激发后血清和肺泡灌洗液中 IgE 水平显著升高(P<0.05 或 P<0.01);与对照组比较,给予盐酸肾上腺素的豚

鼠经激发后血清和肺泡灌洗液内 IgE 含量未见明显变化。结果见图 1。

表 4 盐酸肾上腺素对豚鼠血细胞分类计数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 4 Effect of epinephrin hydrochloride injection on blood cell count in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, $n=8$) $\times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$

组别	白细胞计数	淋巴细胞计数	中性粒细胞计数	嗜酸性粒细胞计数	嗜碱性粒细胞计数
阴性对照组	3.18±1.87	1.41±0.78	1.53±0.97	0.03±0.01	0.05±0.03
阳性对照组	4.89±1.25 ¹⁾	2.34±0.78 ¹⁾	2.26±0.93	0.05±0.01 ²⁾	0.07±0.03
低剂量组	4.29±1.96	2.21±0.98	1.88±1.04	0.04±0.01	0.06±0.03
高剂量组	4.35±1.99	2.22±1.03	1.90±1.04	0.04±0.01	0.06±0.02

注: 与阴性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

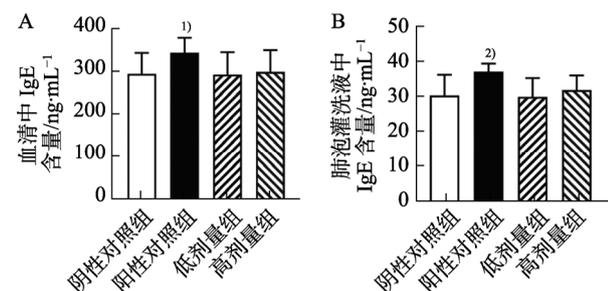


图 1 盐酸肾上腺素对豚鼠血清和肺泡灌洗液中 IgE 水平的影响

A-豚鼠血清中 IgE 含量; B-豚鼠肺泡灌洗液中 IgE 含量。与阴性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of epinephrin hydrochloride injection on IgE levels in serum and alveolar lavage fluid

A-IgE content in guinea pig serum; B-IgE content in alveolar lavage fluid of guinea pigs. Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.5 组织 HE 染色检查结果

豚鼠组织病理学切片结果显示, 阴性对照组、低剂量组和高剂量组动物肺组织生理结构完整, 肺泡大小均匀, 气管、肺泡及间质未见或少见炎性细胞浸润; 而阳性对照组可见不同程度肺组织破坏, 肺及气管壁增厚, 肺泡及间质水肿, 并可见多处炎性细胞浸润, 伴随肺泡积聚大量红细胞和渗出液, 气管周边血管扩张伴有淋巴细胞渗入。结果见图 2。

2.6 组织免疫组化结果

为考察 B 淋巴细胞在组织中的占比及活化程度, 本实验选用 CD79a(B 淋巴细胞标志蛋白)为标记物探索过敏反应发生机制。阴性对照组、低剂量组和高剂量组动物肺和器官及其附属组织内未见或偶见少量成熟 B 淋巴细胞, 而阳性对照组豚鼠肺组织中充斥大量 B 淋巴细胞分泌液, 气管基层组织中淋巴管内聚集大量 B 淋巴细胞, 气管绒毛可见 B 淋巴细胞浸润。结果见图 3。

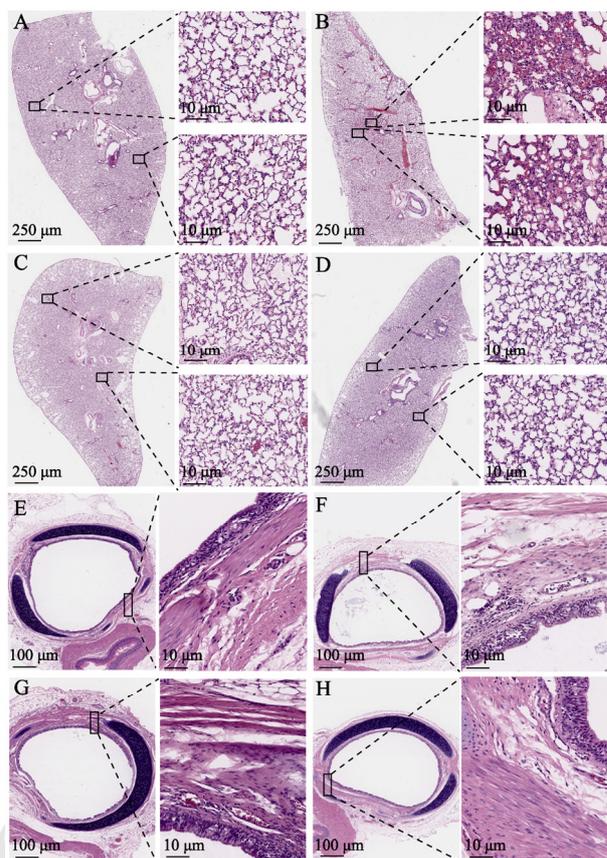


图 2 盐酸肾上腺素对豚鼠肺和气管组织的影响(HE, 4 \times , 100 \times)

A-阴性对照组肺组织; B-阳性对照组肺组织; C-低剂量组肺组织; D-高剂量组肺组织; E-阴性对照组气管组织; F-阳性对照组气管组织; G-低剂量组气管组织; H-高剂量组气管组织。

Fig. 2 Effects of epinephrin hydrochloride injection on lung and trachea of guinea pigs(HE, 4 \times , 100 \times)

A-lung tissue of negative control group; B-lung tissue of positive group; C-lung tissue in low dose group; D-lung tissue in high dose group; E-tracheal tissue of negative control group; F-tracheal tissue of positive group; G-tracheal tissue in low dose group; H-tracheal tissue in high dose group.

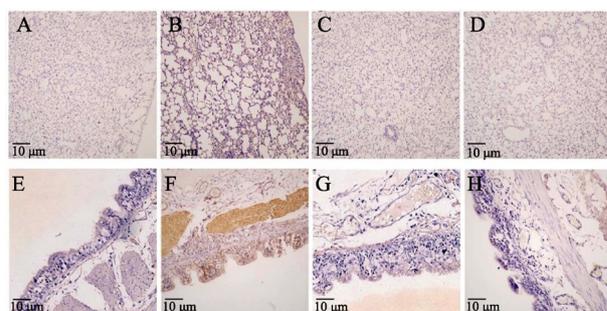


图 3 豚鼠肺和气管组织中 CD79a 表达量的变化(IHC, 100 \times)

A-阴性对照组肺组织; B-阳性对照组肺组织; C-低剂量组肺组织; D-高剂量组肺组织; E-阴性对照组气管组织; F-阳性对照组气管组织; G-低剂量组气管组织; H-高剂量组气管组织。

Fig. 3 Changes of CD79a expression in lung and trachea of guinea pigs(IHC, 100 \times)

A-lung tissue of negative control group; B-lung tissue of positive group; C-lung tissue in low dose group; D-lung tissue in high dose group; E-tracheal tissue in negative control group; F-tracheal tissue of positive group; G-tracheal tissue in low dose group; H-tracheal tissue in high dose group.

3 讨论

肾上腺素在肠液、肠黏膜等碱性环境下失效，不能口服。注射肾上腺素容易引起局部血管发生收缩，且能被神经末梢摄取，经儿茶酚氧位甲基转移酶和单胺氧化酶代谢排泄，效果短暂且需要局部护理^[10]。而雾化吸入肾上腺素因其直接作用于患处、局部药物浓度大、全身不良反应小和安全性高的特点在儿科呼吸系统疾病治疗中广泛应用，患儿依从性良好。但是中国已上市雾化吸入剂种类相对较少，肾上腺素临床应用治疗儿童急性喉炎常以其静脉制剂代替，属于超说明书用药。药物剂型和给药途径选择与临床疗效密切相关，不同给药途径需考虑不同的安全性问题。如经雾化后吸入给药的药物仍需要考虑 pH 值、辅料、渗透压、脂溶性等是否合适。雾化剂 pH 以中性为佳，酸性或碱性药液、高渗盐水等都会刺激呼吸道黏膜，导致支气管痉挛，引起气道高反应；防腐剂酚、亚硫酸盐等辅料，可诱发支气管哮喘；渗透压过高会引起咳嗽和气道痉挛；油性制剂也不能以吸入方式给药，否则可引起脂质肺炎^[11-12]。除此之外还需考虑雾化药液理化性质，是否形成气溶胶，供雾化吸入直达病灶；颗粒数量是否合适，颗粒过多会引起气道痉挛或刺激膈肌，引起呃逆反应等。目前，市售盐酸肾上腺素注射液制剂辅料中存在焦亚硫酸钠、氢氧化钠和盐酸，这 3 种成分均具有潜在的呼吸道刺激性。因此，在药物临床应用时，对任一剂型的改变或者辅料的添加都需要进行制剂安全性评价，特别是使用超说明书用药的药物。

动物试验验证药物安全性时以临床等效剂量为基础，采用大于临床用药剂量，或长于临床用药时间给动物用药，评价药物对动物机体潜在不良反应、毒性表现、靶器官损伤的可逆性^[13]。本研究通过雾化吸入装置结合高效液相检测方法对动物实验吸入性给药方式进行定量，在此条件下以临床等效剂量，使盐酸肾上腺素对动物实现充分的药物暴露，评价毒理学指标。通过检测发现，阳性对照组豚鼠白细胞值显著高于阴性对照组，其中嗜酸性粒细胞计数的明显升高提示卵白蛋白的雾化吸入给药能够致敏豚鼠，诱发过敏反应。同时阳性对照组血清和肺泡灌洗液中 IgE 含量的增加和免疫组化结果也验证了吸入性的卵白蛋白是以活化 B

淋巴细胞，分泌 IgE 介导 I 型过敏反应^[14]。而盐酸肾上腺注射液以雾化方式给予豚鼠不能致敏豚鼠，也未见过敏症状产生。

临床用药的复杂性、药物本身的特殊性与说明书的信息滞后性形成强烈对比，临床治疗中说明书内容远远不够。但是药品说明书是具有法律效力的重要文件，是医师开具处方和患者安全、有效用药的最基本直接的保障^[15]。超说明书用药并不意味着不合理用药、违法用药或试验性用药，更多的临床专家致力于规范化、实践化超说明书用药^[16]。2018 年《儿童支气管扩张症诊断与治疗专家共识》指出可以妥布霉素注射液辅助雾化治疗支气管及肺部感染，推动国内首款自主研发的妥布霉素吸入溶液成功上市。在明确临床药效的前提下重视患者知情同意，增加用药后安全性监测，必要时开展临床前超说明书应用的药物安全性评价是十分必要的。因此，笔者针对盐酸肾上腺素注射液用于雾化的超说明书用法，设计了临床前安全性评价的实验方案，考察豚鼠 IgE 介导的 I 型过敏反应和药物接触的呼吸系统毒性。结果显示，肾上腺素注射液 ≤ 2 倍临床等效剂量，经雾化给药作用于豚鼠不会产生过敏反应或呼吸系统毒性，可为临床超给药途径给予盐酸肾上腺素提供数据支持，也为制药企业新剂型的研发提供思路和临床前研究数据。

REFERENCES

- [1] LIYANAGEDARA S, MCLEOD R, ELHASSAN H A. Exercise induced laryngeal obstruction: A review of diagnosis and management[J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2017, 274(4): 1781-1789.
- [2] ALCAIDE M L, BISNO A L. Pharyngitis and epiglottitis[J]. *Infect Dis Clin N Am*, 2007, 21(2): 449-469.
- [3] TAPIAINEN T, AITTONIEMI J, IMMONEN J, et al. Finnish guidelines for the treatment of laryngitis, wheezing bronchitis and bronchiolitis in children[J]. *Acta Paediatr*, 2016, 105(1): 44-49.
- [4] SKJERVEN H O, HUNDERI J O, BRÜGMANN-PIEPER S K, et al. Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(24): 2286-2293.
- [5] GELBART B, MCSHARRY B, DELZOPPO C, et al. Pragmatic randomized trial of corticosteroids and inhaled epinephrine for bronchiolitis in children in intensive care[J]. *J Pediatr*, 2022(244): 17-23.
- [6] ZAINUDIN B M, BIDDISCOMBE M, TOLFREY S E, et al. Comparison of bronchodilator responses and deposition

- patterns of salbutamol inhaled from a pressurised metered dose inhaler, as a dry powder, and as a nebulised solution[J]. Thorax, 1990, 45(6): 469-473.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.
- [8] [H]GPT4-1, 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005: 25
- [9] ZOU L, SUN Z M, GUO C R, et al. Progress in airway remodeling related signal pathways in the treatment of asthma with traditional Chinese medicine[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2018, 33(11): 5057-5060.
- [10] DU T R, ZHUO C K. Analysis of efficacy and safety of atomization inhalation of adrenaline and Pulmicort in the treatment of acute laryngitis in children[J]. China Pract Med(中国实用医药), 2018, 13(13): 14-16.
- [11] 成人慢性气道疾病雾化吸入治疗专家组. 成人慢性气道疾病雾化吸入治疗专家共识[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(2): 105-110.
- [12] 李秋, 王珊. 药物剂型及给药途径的临床合理应用性分析[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(18): 1547-1548
- [13] 楼宜嘉. 药物毒理学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 214.
- [14] KATIKANENI D S, JIN L. B cell MHC class II signaling: A story of life and death[J]. Hum Immunol, 2019, 80(1): 37-43.
- [15] YANG B, SUN Y F, ZHENG Z Q, et al. Legal interpretation and coping strategy analysis on off-label use[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(8): 993-996.
- [16] HOU Q S, YE J F, ZHU G H, et al. Discussion on the rationality of common off-label use in neonates[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(5): 760-763.
- 收稿日期: 2023-02-16
(本文责编: 沈倩)