



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105726920 B

(45)授权公告日 2019.08.27

(21)申请号 201610216744.6

A23L 33/00(2016.01)

(22)申请日 2016.04.06

A23P 10/28(2016.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105726920 A

(56)对比文件

CN 104587194 A,2015.05.06,

CN 104998055 A,2015.10.28,

(43)申请公布日 2016.07.06

审查员 张慧艳

(73)专利权人 杭州环特生物科技股份有限公司

地址 310051 浙江省杭州市滨江区江陵路

88号5幢1楼A区

(72)发明人 劳乔聪 宋如顺 徐懿乔 俞航萍

沈锡明 朱晓宇 李春启

(51)Int.Cl.

A61K 36/8967(2006.01)

A61K 9/20(2006.01)

A61P 9/00(2006.01)

A61P 39/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种抗PM2.5咀嚼片及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种抗PM2.5咀嚼片,由含有如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,所含的原料各组分及其含量为:百合40~160份,桔梗10~25份,杏仁10~40份。本发明提供的一种抗PM2.5咀嚼片,处方设计科学合理,不存在配伍禁忌,有效成分联用能起到协同增效的作用;口感独特,服用方便,利于吸收,能有效降低因PM2.5摄入过多引起的心血管毒性,促进PM2.5在IGCSP通路分泌和排泄,提高机体免疫力,是一款可药可食的多选择性产品。

1. 一种抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,由如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,原料各组分及其含量为:百合浸膏粉40~160份,桔梗浸膏粉10~25份,杏仁浸膏粉10~40份。

2. 根据权利要求1所述的抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,所述的浸膏粉经如下方式制得:取处方量的百合或桔梗或杏仁,加水提取不少于2次,提取时间为1~4小时,合并每次提取的提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,即得。

3. 根据权利要求1~2中任一项所述的抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,所述的辅料包括矫味剂、黏合剂、润滑剂,其中矫味剂为山梨糖醇、D-甘露醇糖、柠檬酸、蓝莓果汁粉、草莓果汁粉、金桔果汁粉、薄荷香精中的一种或几种,黏合剂为麦芽糊精、淀粉、明胶、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素中的一种或几种,润滑剂为硬脂酸镁、滑石粉和二氧化硅中的一种或几种。

4. 根据权利要求3所述的抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,所述的辅料中,矫味剂为山梨糖醇、D-甘露醇糖、蓝莓果汁粉、柠檬酸和薄荷香精中的一种或几种,黏合剂为麦芽糊精,润滑剂为硬脂酸镁。

5. 一种抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,由如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,原料各组分及其含量为:百合浸膏粉40~160份,桔梗浸膏粉10~40份,杏仁浸膏粉10~40份;辅料各组分及其含量为:山梨糖醇250~350份,D-甘露醇糖为305~389份,麦芽糊精为30~150份,硬脂酸镁为5~15份,蓝莓果汁粉30~150份,柠檬酸5~15份,薄荷香精1~5份。

6. 根据权利要求5所述的抗PM2.5咀嚼片,其特征在于,由如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,原料各组分及其含量为:百合浸膏粉100份,桔梗浸膏粉25份,杏仁浸膏粉25份;辅料各组分及其含量为:山梨糖醇300份、D-甘露醇糖348份、麦芽糊精100份、硬脂酸镁10份、蓝莓果汁粉80份、柠檬酸10份、薄荷香精2份。

7. 一种制备如权利要求1或5所述的抗PM2.5咀嚼片的方法,包括如下步骤:

1) 取适量百合,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加的水量是药材重量的6~30倍,第二次加的水量是药材重量的5~25倍;合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得百合浸膏粉;

2) 取适量桔梗,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加的水量是药材重量的6~30倍,第二次加的水量是药材重量的6~25倍,合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得桔梗浸膏粉;

3) 取适量杏仁,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加的水量是药材重量的6~20倍,第二次加的水量是药材重量的5~15倍,合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得杏仁浸膏粉;

4) 取处方量的百合浸膏粉、桔梗浸膏粉、杏仁浸膏粉和辅料,混合,过筛,直接压片,即得。

## 一种抗PM2.5咀嚼片及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种食品和保健食品领域,特别涉及一种具有抗PM2.5咀嚼片,可有效防治因PM2.5侵袭引起的相关病症。

### 背景技术

[0002] 近年来,随着工业化的发展,空气污染越来越严重,雾霾天也越来越多,对人的侵害也越来越严重。二氧化硫、氮氧化物、可吸入颗粒物(PM10)和细颗粒物(PM2.5)是雾霾的主要组成成分,前两者为气态污染物,后两者才是加重雾霾天气污染的罪魁祸首,因为这些颗粒本身是一种污染物,又是重金属、多环芳烃等有毒物质的载体。

[0003] PM2.5即细颗粒物,又称细粒或细颗粒,是指环境空气中空气动力学当量直径小于等于2.5微米的颗粒物。细颗粒物可携带重金属、硫酸盐、有机物、病毒等直接进入呼吸道、肺部和体内;细颗粒物进入呼吸道内表面后,与肺组织相互作用,被肺泡巨噬细胞吞噬,通过肺的内呼吸进入血液到达其他器官,或长期滞留于肺泡中,进入肺间质,形成病灶<sup>[1]</sup>。中国现行的PM2.5日平均标准值为75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,年平均值为35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。2014年1月10日,绿色和平组织发布的中国74个城市2013年的PM2.5年均浓度排名中,92%的城市PM2.5值不达标,43%的城市PM2.5超标2倍以上。有研究表明,当空气中PM2.5的浓度长期高于10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,就会带来死亡风险的上升,浓度每增加10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,总死亡风险上升4%,心肺疾病带来的死亡风险上升6%,肺癌带来的死亡风险上升8%<sup>[2]</sup>。中科院陈竺院士等研究者,于《柳叶刀》杂志上发表的文章中估计,中国每年因室外空气污染导致的早死人数在35~50万人之间<sup>[3]</sup>。军事医学科学院张英鸽教授在《纳米毒理学》专著中指出,纳米颗粒存在于PM2.5中,与PM2.5相比,纳米颗粒可以更容易地进入人类呼吸道及肺泡,并在其中沉积,颗粒越小沉积越多,对人体的危害也就越大;因此,纳米颗粒常常被用作PM2.5的替代材料进行毒理学研究<sup>[1]</sup>。

[0004] 科学实验中,利用纳米颗粒代替PM2.5进行相关研究,发现:(1)PM2.5能引起心血管毒性,首都医科大学公共卫生学院孙志伟教授在文献<sup>[5]</sup>中使用纳米二氧化硅作为PM2.5替代颗粒,证实了PM2.5能引起心血管毒性;(2)长期吸入PM2.5会损伤体内的巨噬细胞(免疫细胞的一种),导致人体自身免疫力下降;(3)PM2.5通过呼吸道后会进入肺泡,75%会沉积在肺泡内难以排泄,张英鸽团队与本专利申请的发明人李春启博士最新合作研究发现,进入斑马鱼和大鼠体内的纳米活性炭颗粒能通过肠道的杯状细胞分泌而排泄,这一新颖的纳米排泄途径被命名为肠杯状细胞分泌通路(IGCSP)<sup>[4]</sup>,即PM2.5可通过IGCSP通路分泌而排出。

[0005] 目前市售的产品或文献中,多为抗雾霾的中药制剂,制剂所含的各组分也都是从清肺润喉、止咳化痰等类似功能的角度来实现治疗因雾霾引起的呼吸道病症,例如公开号为CN104026691A的中国发明专利,公开了一种抗雾霾饮料及其制备方法,每1000重量份的抗雾霾饮料,包括如下重量份原料的水提取物:桔梗1.5~7.5份,百合1.5~7.5份,玉竹1.5~7.5份,南杏仁3~15份,佛手1.5~7.5份,桑叶2~10份,雪梨干6~30份;可有效缓解雾霾气候导致的咽红咽干、咳嗽、咯痰等症状,同时还具有清肺润肺、养阴润燥等功效。又例如公

开号为CN103405699A的中国发明专利,公开了一种防治雾霾引起的呼吸道病症的饮品,由以下重量份的原料药制成:桑叶20-30份,鲜芦根10-20份,甜杏仁10-20份,百合10-20份,北沙参10-20份,黄芪10-20份,桔梗7-15份,麦冬6-12份,陈皮6-12份,高良姜5-10份,浙贝母5-10份,金银花5-10份,苦杏仁3-6份,薄荷脑0.5-1份;可益气补虚,宣肺润燥、化痰止咳,止痛散结,对雾霾引起的咳嗽、痰多等症状有很好的作用。上述产品或文献、专利的不足之处在于:并未解决本发明申请在背景技术中所提出的、因PM2.5侵袭引起的特定病理,包括:①引起心血管毒性,②损伤巨噬细胞致使机体免疫力下降,③对IGCSP通路分泌和排泄PM2.5的影响。这三点,无论是现有产品,抑或是文献报道,都未曾对此进行深入研究,故不能真正有效的“抗PM2.5”。

[0006] 综上所述,如何提供一种能真正有效防治因PM2.5侵袭引起的相关病症的产品,是本领域技术人员急需解决的技术难题。

### 发明内容

[0007] 本发明目的在于提供一种抗PM2.5咀嚼片及其制备方法,解决了上述现有技术中所提到相关缺陷。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明采取了以下技术方案:

[0009] 一种抗PM2.5咀嚼片,由含有如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,所含的原料各组分及其含量为:百合40~160份,桔梗10~25份,杏仁10~40份。

[0010] 优选的,所述的原料以提取的方式制成浸膏粉。

[0011] 更优选的,所述的浸膏粉经如下方式制得:取处方量的百合或桔梗或杏仁,加水提取N次,合并每次提取的提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,即得。

[0012] 更优选的,所述的浸膏粉提取工艺中,提取的次数 $N \geq 2$ ,提取时间为1~4小时。

[0013] 优选的,所述的辅料包括矫味剂、黏合剂、润滑剂,其中矫味剂为山梨糖醇、D-甘露醇糖、柠檬酸、蓝莓果汁粉、草莓果汁粉、金桔果汁粉、薄荷香精中的一种或几种,黏合剂为麦芽糊精、淀粉、明胶、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素中的一种或几种,润滑剂为硬脂酸镁、微粉硅胶、滑石粉和二氧化硅中的一种或几种。

[0014] 更优选的,所述的辅料中,矫味剂为山梨糖醇、D-甘露醇糖、蓝莓果汁粉、柠檬酸和薄荷香精中的一种或几种,黏合剂为麦芽糊精,润滑剂为硬脂酸镁。

[0015] 一种抗PM2.5咀嚼片,由含有如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,所含的原料各组分及其含量为:百合浸膏粉40~160份,桔梗浸膏粉10~40份,杏仁浸膏粉10~40份;所述的辅料各组分及其含量为:山梨糖醇250~350份,D-甘露醇糖为305~389份,麦芽糊精为30~150份,硬脂酸镁为5~15份,蓝莓果汁粉30~150份,柠檬酸5~15份,薄荷香精1~5份。

[0016] 更优选的,由含有如下重量份的原料和药学上可接受的辅料组成,以1000重量份的咀嚼片计,所含的原料各组分及其含量为:百合浸膏粉100份,桔梗浸膏粉25份,杏仁浸膏粉25份;所述的辅料各组分及其含量为:山梨糖醇300份、D-甘露醇糖348份、麦芽糊精100份、硬脂酸镁10份、蓝莓果汁粉80份、柠檬酸10份、薄荷香精2份。

[0017] 一种制备如前所述的抗PM2.5咀嚼片的方法,包括如下步骤:

[0018] 1) 取适量百合,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加水提取所加的溶剂量是药材重量的6~30倍的量,第二次加的溶剂是药材重量的5~25倍;合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得百合浸膏粉;

[0019] 2) 取适量桔梗,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加水溶液提取所加的溶剂量是药材重量的6~30倍的量,第二次加的溶剂是药材重量的6~25倍,合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得桔梗浸膏粉;

[0020] 3) 取适量杏仁,加水提取2次,每次1~4小时,第一次加水提取所加的水量是药材重量的6~20倍的水量,第二次加的水量是药材重量的5~15倍,合并提取液,滤过,减压浓缩,喷雾干燥,得杏仁浸膏粉;

[0021] 4) 取处方量的百合浸膏粉、桔梗浸膏粉、杏仁浸膏粉和辅料,混合,过筛,直接压片,即得。

[0022] 本发明的处方原理和优点如下:

[0023] 1、处方中百合、桔梗和杏仁均为收录于2015版《中国药典》的药食两用植物,容易获得,并且无任何毒性,三味中药在2015版《中国药典》中的功能与主治具体如下:

[0024] 百合:养阴润肺,清心安神。用于阴虚燥咳,劳嗽咳血,虚烦惊悸,失眠多梦,精神恍惚。

[0025] 桔梗:宣肺,利咽,祛痰,排脓。用于咳嗽痰多,胸闷不畅,咽痛音哑,肺痈吐脓。

[0026] 杏仁:降气止咳平喘,润肠通便。用于咳嗽气喘,胸满痰多,肠燥便秘。

[0027] 2、百合、桔梗和杏仁均是走肺经的中药,对多种呼吸系统疾病有确切的疗效,这一点已于《中国药典》中记载;而本发明申请人关注的是前述三味中药联用后在非呼吸系统疾病中的药效,具体包括:①能显著降低PM2.5引起的心血管毒性;②能显著提高体内巨噬细胞吞噬PM2.5能力,使进入体内的PM2.5快速地被巨噬细胞吞噬,并且在溶酶体和氧化爆发的作用下消化PM2.5中的有害物质,达到减毒的效果,也极大增强了机体免疫力;③能显著促进体内的PM2.5分泌进入肠道,并加速PM2.5从肠道排出,从而减少PM2.5对细胞、组织和器官的损害,最终达到清除体内PM2.5的效果。

[0028] 值得一提的,由于市售产品均未对因PM2.5侵袭引起的特定病理(包括①引起心血管毒性,②损伤巨噬细胞致使机体免疫力下降,③对IGCSP通路分泌和排泄PM2.5的影响)进行评价,也未见相关文献的评价报道,本发明申请人拟通过斑马鱼筛药评价体系对本发明制备的抗PM2.5咀嚼片进行效果评价,以得到更为科学、客观的实验结果。

[0029] 斑马鱼是一种常见的热带鱼,由于饲育容易、胚胎透明、体外受精、突变种多、遗传学工具成熟等诸多优点,近年来已成为新药研发的新兴模式动物[6-8]。由于斑马鱼基因与人类基因的相似度达到87%,这意味着在其身上做药物实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体<sup>[9-10]</sup>。这也是本发明申请人采用斑马鱼筛药评价体系进行效果评价的目的。

[0030] 3、咀嚼片是指于口腔中咀嚼或吮服使片溶化后吞服的片剂,将本发明的处方制成咀嚼片这一剂型,基于如下考虑:①本产品于口腔嚼碎后表面积增大,可促进有效成分在体内的溶解和吸收,提高生物利用度;②服用方便,即使在缺水情况下也可服用,尤其适合老人、小孩、中风患者、吞服困难及胃肠功能差的群体,可减轻胃肠道的负担;③通过增加一些特殊的调香剂形成独特的口感,使用户更乐于“咀嚼”;④产品稳定性高,保存时间长,携带

方便。

[0031] 总之,本发明提供一种抗PM2.5咀嚼片,处方设计科学合理,不存在配伍禁忌,有效成分联用能起到协同增效的作用;口感独特,服用方便,利于吸收,能有效降低因PM2.5摄入过多引起的心血管毒性,促进PM2.5在IGCSP通路分泌和排泄,提高机体免疫力,是一款可药可食的多选择性产品。

#### 附图说明

[0032] 图1为本发明咀嚼片降低PM2.5引起的心血管毒性的实验结果。

[0033] 图2为本发明咀嚼片促进体内巨噬细胞的吞噬PM2.5功能的实验结果。

[0034] 图3为本发明咀嚼片促进体内的PM2.5分泌进入肠道的实验结果。

[0035] 图4为本发明咀嚼片促进肠道内的PM2.5排泄的实验结果。

#### 具体实施方式

[0036] 以下是本发明的具体实施例,对本发明的技术方案做进一步的描述,但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。

[0037] 实施例1:

[0038] 配方1:以1000重量份的咀嚼片,

百合浸膏粉 40 份      桔梗浸膏粉 10 份

杏仁浸膏粉 10 份      山梨糖醇 350 份

[0039] D-甘露醇糖 389 份      麦芽糊精 30 份

硬脂酸镁 5 份      蓝莓果汁粉 150 份

柠檬酸 15 份      薄荷香精 1 份

[0040] 制备工艺:取处方量的上述原料和辅料,混合,过筛,直接压片,即得。

[0041] 实施例2:

[0042] 配方2:以1000重量份的咀嚼片

百合浸膏粉 160 份      桔梗浸膏粉 40 份

杏仁浸膏粉 40 份      山梨糖醇 250 份

[0043] D-甘露醇糖 305 份      麦芽糊精 150 份

硬脂酸镁 15 份      蓝莓果汁粉 30 份

[0044] 柠檬酸 5 份      薄荷香精 5 份

[0045] 制备工艺:取处方量的上述原料和辅料,混合,过筛,直接压片,即得。

[0046] 实施例3:

- [0047] 配方3:以1000重量份的咀嚼片,  
百合浸膏粉 100 份 桔梗浸膏粉 25 份  
杏仁浸膏粉 25 份 山梨糖醇 300 份
- [0048] D-甘露醇糖 348 份 麦芽糊精 100 份  
硬脂酸镁 10 份 蓝莓果汁粉 80 份  
柠檬酸 10 份 薄荷香精 2 份

[0049] 制备工艺:取处方量的上述原料和辅料,混合,过筛,直接压片,即得。

[0050] 实施例4:本发明咀嚼片能否降低PM2.5引起的心血管毒性的评价实验

[0051] 1、实验动物

[0052] 野生型AB系斑马鱼,在28℃条件下用养鱼用水培养(养鱼)用水水质:每1L反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为480~510 $\mu$ S/cm;pH为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6mg/L CaCO<sub>3</sub>)。取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield<sup>[11]</sup>的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6孔微孔板中。实验完成后,用三卡因甲磺酸对的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0053] 2、受试药:

[0054] 按实施例1~3的方法制备获得的三种抗PM2.5咀嚼片,依次标记为配方1、配方2、配方3。

[0055] 3、实验仪器与试剂

[0056] 解剖显微镜(SMZ645,Nikon公司);6孔板(Nest Biotech);PM2.5材料(纳米二氧化硅,由首都医科大学公共卫生学院提供);显微注射仪(IM300,Narishige)。

[0057] 4、实验方法

[0058] 通过显微注射的方法,将PM2.5材料(纳米二氧化硅)注射到斑马鱼幼鱼的血液循环内,将注射后的斑马鱼分成6组(每组30斑马鱼),分别为模型对照组,1mg/mL辅料对照组(只含辅料),受试药3种配方组,养鱼用水处理的斑马鱼作为正常对照组。受试药以溶解的方式给药,相当于人的口服给药和经皮吸收;给药浓度根据预实验的无可见不良反应剂量水平(NOEL=1mg/mL)而得。给药1天后,统计每组心包水肿发生率,使用卡方检验进行统计学分析, $p < 0.05$ 表示有统计学差异。

[0059] 5、实验结果

[0060] 受试药处理结束后,对各实验组进行拍照,并将典型图片汇总为图1,在图1中,黑色虚线为斑马鱼心包区域,面积越大,水肿越严重;水肿发生率的数据汇总为表1。

[0061] 由结果可知,模型对照组心包水肿发生率为100%,与正常对照组(0%)比较 $p < 0.001$ ,说明纳米二氧化硅(PM2.5材料)能引起明显的心血管毒性,表现为心包水肿;辅料对照组心包水肿发生率为100%,与模型对照组比较 $p > 0.05$ ,说明辅料不能改善PM2.5引起的心血管毒性;受试药3种配方的心包水肿发生率分别为50%、33%和10%,与模型对照组比较均 $p < 0.001$ ,说明3种配方均能明显降低PM2.5引起的心血管毒性,功效从高到低分别为

配方3>配方2>配方 1(见表1,图1)。

[0062] 表1受试药降低PM2.5引起的心血管毒性作用

组别	正常对照 组	模型对照组	辅料对照组	抗 PM2.5 咀嚼片 (1mg/mL)		
				配方 1	配方 2	配方 3
[0063] 心包水肿数/总数	0/30	30/30	30/30	15/30	10/30	3/30
水肿发生率 (%)	0	100	100	50***	33***	10***

[0064] 与模型对照组比较,\*\*\*p<0.001

[0065] 实施例5:本发明咀嚼片能否促进体内巨噬细胞的吞噬PM2.5功能的评价实验1、实验动物

[0066] 转基因Albino斑马鱼,在28℃条件下用养鱼用水培养(养鱼)用水水质:每1L反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为480~510μS/cm;pH为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6mg/L CaCO<sub>3</sub>)。取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield<sup>[11]</sup>的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6孔微孔板中。实验完成后,用三卡因甲磺酸对的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0067] 2、受试药:

[0068] 按实施例1~3的方法制备获得的三种抗PM2.5咀嚼片,依次标记为配方1、配方2、配方3。

[0069] 3、实验仪器与试剂

[0070] 解剖显微镜(SMZ645,Nikon公司);6孔板(Nest Biotech);PM2.5材料(纳米活性炭,由军事医学科学院张英鸽教授提供);显微注射仪(IM300,Narishige)。

[0071] 4、实验方法

[0072] 通过显微注射的方法,将PM2.5材料(纳米活性炭)注射到Albino斑马鱼幼鱼的血液循环内,将注射后的斑马鱼分成6组(每组30斑马鱼),分别为模型对照组,1mg/mL辅料对照组(只含辅料),受试药3种配方组,养鱼用水处理的斑马鱼作为正常对照组。受试药以溶解的方式给药,相当于人的口服给药;给药浓度根据预实验的无可见不良反应剂量水平(NOEL=1mg/mL)而得。给药1天后,使用中性红进行整体斑马鱼巨噬细胞染色<sup>[12]</sup>,并在解剖显微镜下统计斑马鱼脑部巨噬细胞总数量和吞噬了活性炭的巨噬细胞数量,计算比值,并通过与模型对照组相比(卡方检验),评价受试药能否提高体内巨噬细胞吞噬PM2.5的能力。

[0073] 5、实验结果

[0074] 受试药处理结束后,对各实验组进行拍照,并将典型图片汇总为图2。在图2中,图片为斑马鱼头部区域,黑色虚线为巨噬细胞吞噬的分析区域,红色斑块为中性红染色后的巨噬细胞,黑色箭头所指为吞噬了纳米活性炭的巨噬细胞(巨噬细胞由于吞噬了纳米活性炭而显示为黑色)。正常对照组的巨噬细胞均为红色,而吞噬了纳米活性炭的巨噬细胞为黑色(黑色箭头所指),说明进入体内的PM2.5能被巨噬细胞吞噬。巨噬细胞吞噬率的数据汇总为表2。

[0075] 由结果可知,模型对照组吞噬率29%,与正常对照组(0%)比较p<0.001,说明模

型对照组,辅料对照组巨噬细胞吞噬率为31%,与模型对照组比较 $p>0.05$ ,表明辅料不具有促进巨噬细胞吞噬功能;受试药3种配方的巨噬细胞吞噬率分别为53%、75%和85%,与模型对照组比较均 $p<0.001$ ,结果提示,受试药对巨噬细胞吞噬PM2.5功能均有明显的促进作用,功效从高到低分别为配方3>配方2>配方1(见表2,图2)。

[0076] 表2受试药促进巨噬细胞吞噬功能结果(n=30)

	实验组别	巨噬细胞吞噬率(%)
	正常对照组	0
	模型对照组	29
[0077]	辅料对照组	31
	配方1	53***
	配方2	75***
	配方3	85***

[0078] 与模型对照组相比,\*\*\* $p<0.001$

[0079] 实施例6:本发明咀嚼片能否促进体内的PM2.5分泌进入肠道的评价实验

[0080] 1、实验动物

[0081] 野生型AB系斑马鱼,在28℃条件下用养鱼用水培养(养鱼)用水水质:每1L反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为480~510 $\mu$ S/cm;pH为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6mg/L CaCO<sub>3</sub>)。取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield<sup>[11]</sup>的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6孔微孔板中。实验完成后,用三卡因甲磺酸对的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0082] 2、受试药:

[0083] 按实施例1~3的方法制备获得的三种抗PM2.5咀嚼片,依次标记为配方1、配方2、配方3。

[0084] 3、实验仪器与试剂

[0085] 解剖显微镜(SMZ645,Nikon公司);6孔板(Nest Biotech);PM2.5材料(纳米活性炭,由军事医学科学院张英鸽教授提供);显微注射仪(IM300,Narishige)。

[0086] 4、实验方法

[0087] 通过显微注射的方法,将PM2.5材料(纳米活性炭)注射到斑马鱼幼鱼的卵黄囊内(相当于肌肉注射),将注射后的斑马鱼分成6组(每组30斑马鱼),分别为模型对照组,1mg/mL辅料对照组(只含辅料),受试药3种配方组,养鱼用水处理的斑马鱼作为正常对照组。受试药以溶解的方式给药,相当于人的口服给药;给药浓度根据预实验的无可见不良反应剂量水平(NOEL=1mg/mL)而得。给药处理5天后,统计肠道分泌纳米活性炭的斑马鱼数量,并计算PM2.5分泌发生率(分泌率=肠道分泌纳米活性炭的斑马鱼数量/斑马鱼总数量),通过与模型对照组相比(卡方检验),评价受试药能否促进体内PM2.5分泌进入肠道。

[0088] 5、实验结果

[0089] 受试药处理结束后,对各实验组进行拍照,并将典型图片汇总为图3;由图3可知,注射到斑马鱼体内的纳米活性炭能进入肠道,说明体内的纳米活性炭通过肠道排泄,这一现象与张英鸽教授团队的研究结果一致<sup>[1]</sup>。PM2.5分泌发生率的数据汇总为表3。

[0090] 由结果可知,模型对照组PM2.5分泌发生率为12%,辅料对照组PM2.5分泌发生率为13%,两者比较 $p > 0.05$ ,表明辅料不具有促进肠道分泌PM 2.5功能;受试药3种配方的PM2.5分泌发生率分别为39%、60和90%,与模型对照组比较均 $p < 0.001$ ,结果提示,受试药对斑马鱼肠道分泌PM2.5功能有明显的促进作用,功效从高到低分别为配方3 > 配方2 > 配方1(见表3,图3)。

[0091] 表3斑马鱼体内PM2.5分泌发生率(n=30)

	实验组别	PM2.5 分泌发生率 (%)
	正常对照组	-
	模型对照组	12
[0092]	辅料对照组	13
	配方 1	39***
	配方 2	60***
	配方 3	90***

[0093] 与模型对照组相比,\*\*\* $p < 0.001$

[0094] 实施例7:本发明咀嚼片能否促进肠道内的PM2.5排泄的评价实验

[0095] 1、实验动物

[0096] 野生型AB系斑马鱼,在28℃条件下用养鱼用水培养(养鱼)用水水质:每1L反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为480~510 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ;pH为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6mg/L CaCO<sub>3</sub>)。取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield<sup>[11]</sup>的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常的斑马鱼移入6孔微孔板中。实验完成后,用三卡因甲磺酸对的斑马鱼进行过度暴露处理,从而将斑马鱼麻醉处死。麻醉处死的操作步骤符合美国兽医协会(AVMA)对动物麻醉处死的规范要求。

[0097] 2、受试药:

[0098] 按实施例1~3的方法制备获得的三种抗PM2.5咀嚼片,依次标记为配方1、配方2、配方3。

[0099] 3、实验仪器与试剂

[0100] 解剖显微镜(SMZ645,Nikon公司);6孔板(Nest Biotech);PM2.5材料(纳米活性炭,由军事医学科学院张英鸽教授提供);显微注射仪(IM300,Narishige)。

[0101] 4、实验方法

[0102] 先让斑马鱼将混悬于水中的PM2.5材料(纳米活性炭)吞入肠道,然后挑取肠道纳米活性炭吞入量较一致的斑马鱼,分成5组(每组30斑马鱼),分别为模型对照组,1mg/mL辅料对照组(只含辅料),受试药3种配方组,养鱼用水处理的斑马鱼作为正常对照组。受试药以溶解的方式给药,相当于人的口服给药;给药浓度根据预实验的无可见不良反应剂量水平(NOEL=1mg/mL)而得。给药处理1天后,统计各实验组全排空(肠道内不含纳米活性炭)的斑马鱼数量,计算各实验组的全排空率(全排空数/总数),通过比较给药组与模型对照组的全排空率(卡方检验),评价受试药能否促进肠道内纳米活性炭(PM2.5)排泄。

[0103] 5、实验结果

[0104] 受试药处理结束后,对各实验组进行拍照,并将典型图片汇总为图4。肠道PM2.5排空率的数据汇总为表4。

[0105] 由结果可知,模型对照组全排空率为4%,辅料组全排空率亦为4%,两者比较 $p > 0.05$ ,表明辅料不具有促进肠道排泄PM 2.5功能;抗PM2.5咀嚼片3种配方的全排空率分别为46%、75%和90%,与模型对照组比较均 $p < 0.001$ ,结果提示,受试药均具能促进斑马鱼肠道排泄PM 2.5,功效从高到低分别为配方3>配方2>配方1(见表4、图4)。

[0106] 表4斑马鱼肠道PM2.5全排空率(n=30)

	实验组别	PM2.5 全排空率 (%)
	正常对照组	-
	模型对照组	4
[0107]	辅料组	4
	配方 1	46***
	配方 2	75***
	配方 3	90***

[0108] 与模型对照组相比,\*\*\* $p < 0.001$

[0109] 附:参考文献

[0110] [1]张英鸽,郭树仁,张振中,崔大祥.粒子与大气复合污染.(纳米毒理学).中国协和医科大学出版社.866-869.2010.

[0111] [2]Pope,C Arden;et al.Cancer,cardiopulmonary mortality,and long-term exposure to fine particulate air pollution.J.Amer.Med.Assoc.2002,287(9):1132-1141.

[0112] [3]Chen,Zhu.China tackles the health effects of air pollution.Lancet 382.9909Dec 2013.

[0113] [4]Zhao B,Sun L,Zhang W,et al.Secretion of intestinal goblet cells:A novel excretion pathway of nanoparticles.Nanomedicine.P ii,2013:S1549-9634(13)00580-7.

[0114] [5]Duan JC,Yu Y,et al.Low-dose exposure of silica nanoparticles induces cardiac dysfunction via neutrophil-mediated inflammation and cardiac contraction in zebrafish embryos.Nanotoxicology.2016,10(5):575-585.

[0115] [6]Li CQ,Luo LQ,McGrath P.Zebrafish xenotransplant cancer model for drug screening.In zebrafish:methods for assessing drug safety and toxicity.McGrath P(Ed.).West Sussex,UK:West Sussex,UK:Wiley-Blackwell,2011:219-232.

[0116] [7]Li CQ,Luo LQ,Awerman J,McGrath P.Whole zebrafish cytochrome P450 assay for assessing drug metabolism and safety.In zebrafish:methods for assessing drug safety and toxicity.McGrath P(Ed.).West Sussex,UK:Wiley-Blackwell,2011:103-115.

[0117] [8]Li CQ,Seng WL,Park D,et al.Methods for assessing neurotoxicity in zebrafish.Zebrafish:In methods for assessing drug safety and toxicity[M].Phylonix,Cambridge,MA,USA.McGrath P(Ed.).West Sussex,UK:Wiley Blackwell,2011:117-134.

- [0118] [9] 辛昌盛,赵艳秋,李松,等.斑马鱼模型在药物筛选中的应用[J].遗传,2012,34(9):1144-1152.
- [0119] [10] Howe K,Clark MD,Torroja CF,et al.The Zebrafish Reference Genome Sequence and its Relationship to the Human Genome[J].Nature,2013,496(7446):498-503.
- [0120] [11] Westerfield M.The Zebrafish Book:A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish.Eugene,Oregon:The University of Oregon Press,1993.
- [0121] [12] Philippe H,Bernard T,Christine T.Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain,Retina,and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process[J].Developmental Biology,2001,238:274-288.

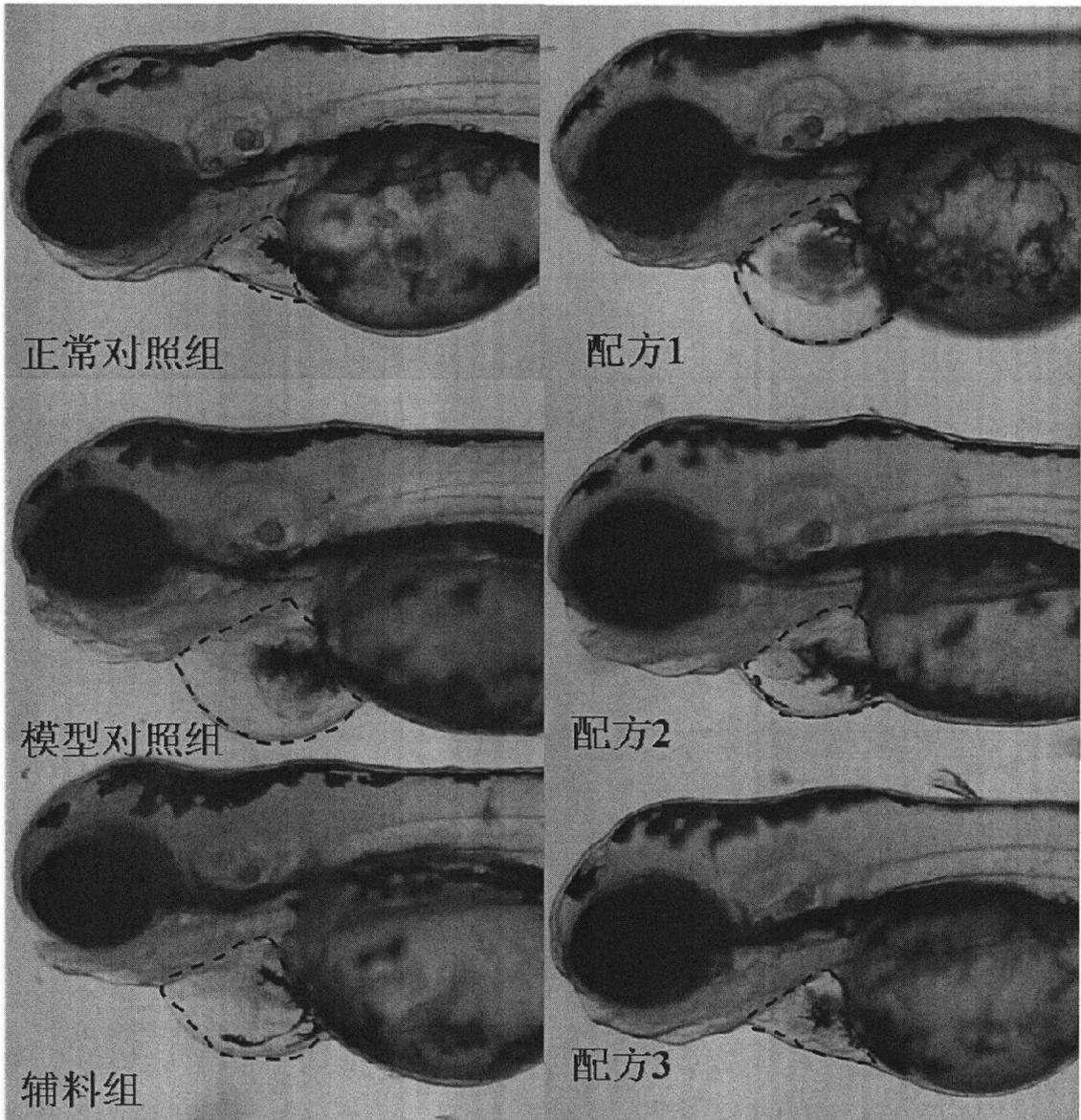


图1

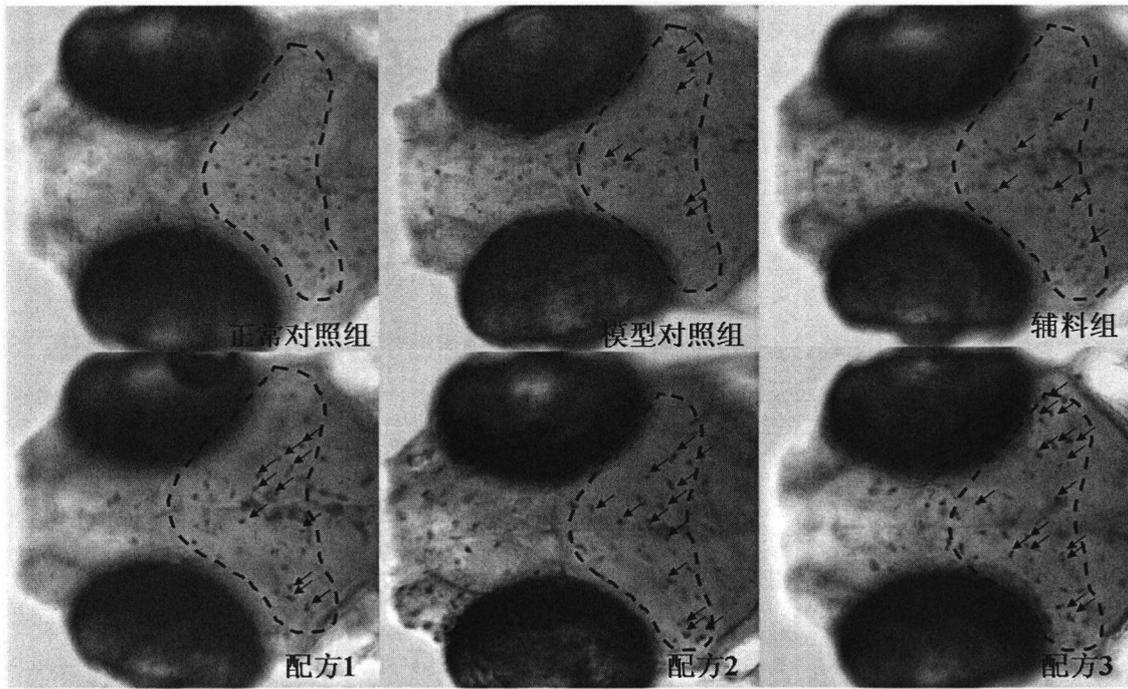


图2

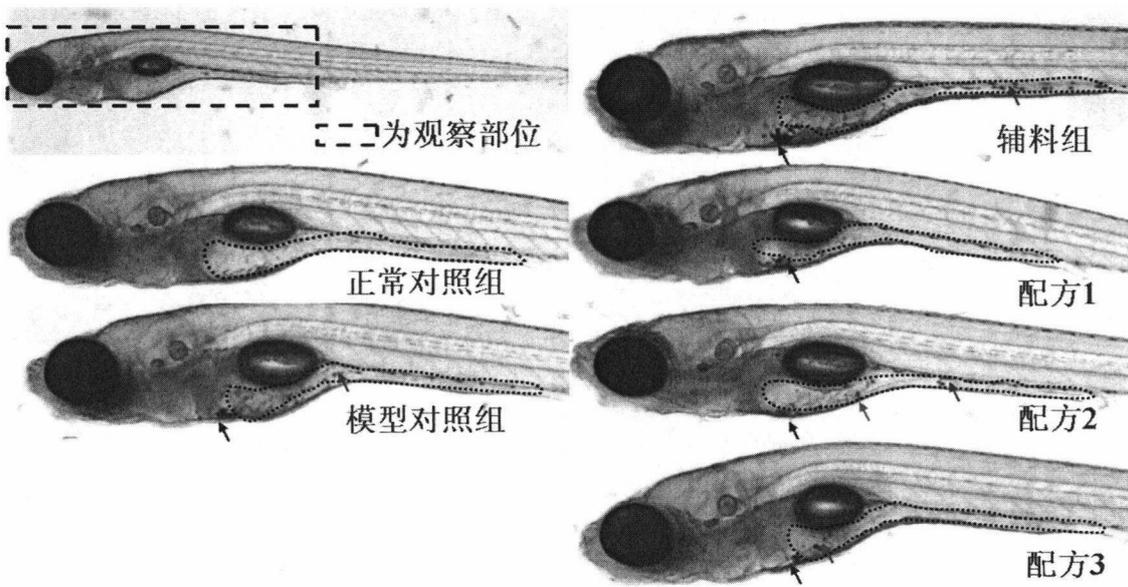


图3

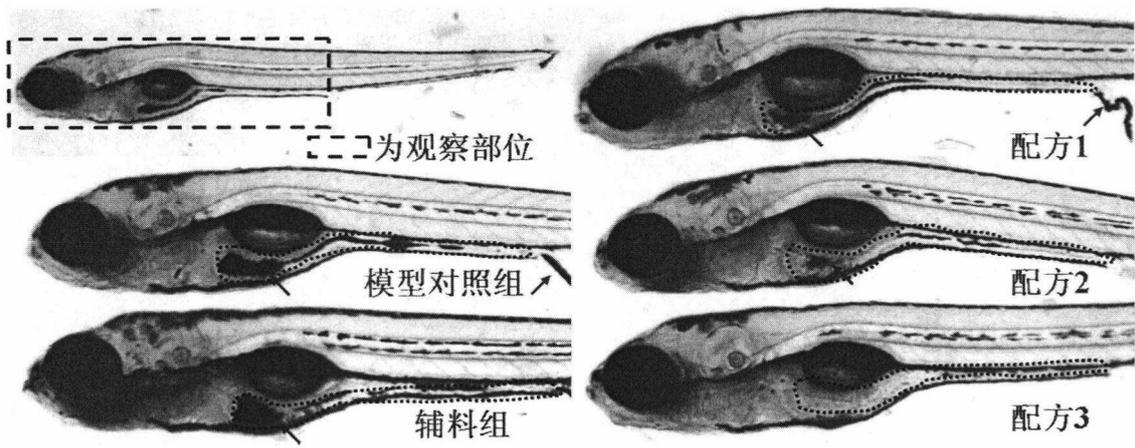


图4