附件2

**辛夷鼻通颗粒（膏）的主要药效学和毒理学研究方案**

**一、辛夷鼻通颗粒的研究方案**

**（一）辛夷鼻通颗粒的主要药效学研究方案**

# 1.**辛夷鼻通颗粒对变应性鼻炎（AR）大鼠的作用**

AR模型的制备：模型对照组每只大鼠腹腔注射卵清蛋白(OVA)+铝佐剂，隔日1次注射致敏，连续7次。第15～17天以0.25%的OVA溶液双侧滴鼻局部激发，每次100μL/鼻孔，每日1次。第18～20天每日以2%的OVA溶液双侧滴鼻，每次100μL/鼻孔，每日1次。21～28日每日以5%的OVA溶液双侧滴鼻，每次100μL/鼻孔，每日1次。

模型成功判定标准：通过激发实验，模型大鼠会出现打喷嚏、挠鼻、抓脸和鼻溢等症状。鼻痒：轻度为1分,轻擦鼻几次；重度为2分,抓挠鼻面不止,到处摩擦。喷嚏：1～3 个为1分 ，4～10个为2分，11 个以上为 3 分。清涕 ：流到鼻前孔为 1 分,过鼻前孔为2分，流涕满面为3分。以叠加法记录总分,总分超过5分即为造模成功 。

动物连续灌胃给予辛夷鼻通颗粒，末次给药1h后检测以下指标：（1）行为学评价：观察大鼠精神、皮毛、饮食情况、鼻部症状等，根据挠鼻次数、喷嚏个数、流涕程度评分；（2）采用 ELISA法检测大鼠血清中免疫球蛋白A（IgA）、免疫球蛋白E（IgE）、白介素-4（IL-4)、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、组胺、白三烯含量；（3）病理学观察：剥取鼻部, 暴露鼻中隔及双侧鼻腔,常规制片,HE 染色,光镜观察鼻黏膜的病理组织学变化。

**2.对小鼠腹部毛细血管通透性的影响**

炎症小鼠模型的制备：动物连续灌胃给予辛夷鼻通颗粒，末次给药1h后，于小鼠腹部去毛区SC 0.1%磷酸组织胺0.03ml。同时各组小鼠均尾静脉注射0.5％伊文思蓝10ml.kg-l。检测方法：20min后，取带有蓝染皮肤肌肉块，投入7：3丙酮混合液3ml中浸泡48h，48h后取浸泡液，用酶标仪于590nm处测定吸光度，计算抑制率。抑制率%＝（空白对照组OD值-给药组OD值）×100% /空白对照组OD值。

3.**辛夷鼻通颗粒对棉球肉芽肿的影响**

棉球肉芽肿模型的制备：取雄性大鼠，在乙醚浅麻醉下作腹部切口, 分别将20mg灭菌的棉球植入大鼠两侧腹股沟皮下。检测方法：动物常规分组给药，末次给药后处死大鼠, 剥离并取出肉芽组织, 于烘箱(70℃)内干燥1h后称重, 减去原棉球重量, 即为肉芽肿重量。计算抑制率，抑制率%＝（空白对照组肉芽肿重量-给药组肉芽肿重量）×100% /空白对照组肉芽肿重量。

 **4.辛夷鼻通颗粒对醋酸致小鼠疼痛的影响**

疼痛模型的制备：动物连续灌胃给予辛夷鼻通颗粒，末次给药1h后，每只小鼠按10ml.kg-1体质量腹腔注射0.6％醋酸溶液。检测方法：立即观察、记录第一次扭体时间及15min内小鼠扭体反应次数，以第一次扭体时间、扭体次数作为痛反应指标，计算药物组扭体次数抑制率。抑制率%＝（空白对照组扭体次数-给药组扭体次数）×100% /空白对照组扭体次数

**（二）辛夷鼻通颗粒的毒理学研究方案**

1.单次给药毒性试验

经预实验后，再决定是用LD50或者MTD测定方法。如采用LD50测定方法则计算辛夷鼻通颗粒的LD50值及95%可信限；如采用MTD测定方法则连续观察所有动物给药后14天的一般情况如精神、活动、饮食、排泄、毛发等变化，计算MTD值及体重增长率。

2.重复给药毒性试验

实验方法:选取8周龄大鼠120只，体重90～110g，雌雄各半，随机分为4组，每组30只，雌雄各半。每组大鼠分笼饲养，每笼5只。设对照组，辛夷鼻通颗粒高、中、低剂量（成人临床日剂量的60、30、15倍）组，每组30只。各给药组大鼠灌胃给药，空白对照组给予等体积蒸馏水，每日1次，连续30天。记录及检测指标：（1）一般情况观察：每日观察记录大鼠摄食量、体重、外观体征和行为活动、粪便性状等。（2）体重及摄食量监测：每周称体重1次，及时调整用药剂量；每周测定摄食量2次。（3）检测血液学指标：末次给药16h后，每组取20只大鼠，雌雄各半，用戊巴比妥钠麻醉大鼠采集全血测定红细胞计数、白细胞计数及其分类、血红蛋白、红细胞容积、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度、网织红细胞计数、血小板计数等指标；（4）采集血浆检测凝血两项；（5）检测血液生化学指标：另取血样分离血清，于全自动生化分析仪上测定血清中的天门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶、钾离子浓度、钠离子浓度、氯离子浓度等生化指标；（6）计算主要脏器系数：解剖大鼠进行肉眼检查各器官情况，取脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺素、胸腺、子宫、卵巢、睾丸、附睾称重,并计算各脏器系数；（7）病理学检查：然后将脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺素、胸腺、子宫、卵巢、睾丸、附睾、胰腺、乳腺、膀胱、大小肠、胃、气管、主动脉、骨髓、垂体、前列腺等器官和组织用10%甲醛固定，HE染色，进行病理学检查。各组余下动物停药30天后同法测定上述指标。

**二、辛夷鼻通膏的研究方案**

**（一）辛夷鼻通膏的主要药效学研究方案**

# 1.**辛夷鼻通膏对变应性鼻炎（AR）大鼠的作用**

AR模型的制备：模型对照组每只大鼠腹腔注射卵清蛋白(OVA)+铝佐剂，隔日1次注射致敏，连续7次。第15～17天以0.25%的OVA溶液双侧滴鼻局部激发，每次100μL/鼻孔，每日1次。第18～20天每日以2%的OVA溶液双侧滴鼻，每次100μL/鼻孔，每日1次。21～28日每日以5%的OVA溶液双侧滴鼻，每次100μL/鼻孔，每日1次。

模型成功判定标准：通过激发实验，模型大鼠会出现打喷嚏、挠鼻、抓脸和鼻溢等症状。鼻痒：轻度为1分,轻擦鼻几次；重度为2分,抓挠鼻面不止,到处摩擦。喷嚏：1～3 个为1分 ，4～10个为2分，11 个以上为 3 分。清涕 ：流到鼻前孔为 1 分,过鼻前孔为2分，流涕满面为3分。以叠加法记录总分,总分超过5分即为造模成功 。

动物连续灌胃给予辛夷鼻通膏，末次给药1h后检测以下指标：（1）行为学评价：观察大鼠精神、皮毛、饮食情况、鼻部症状等，根据挠鼻次数、喷嚏个数、流涕程度评分；（2）采用 ELISA法检测大鼠血清中免疫球蛋白A（IgA）、免疫球蛋白E（IgE）、白介素-4（IL-4)、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、组胺、白三烯含量；（3）病理学观察：剥取鼻部, 暴露鼻中隔及双侧鼻腔,常规制片,HE 染色,光镜观察鼻黏膜的病理组织学变化。

**2.对小鼠腹部毛细血管通透性的影响**

炎症小鼠模型的制备：动物连续灌胃给予辛夷鼻通膏，末次给药1h后，于小鼠腹部去毛区SC 0.1%磷酸组织胺0.03ml。同时各组小鼠均尾静脉注射0.5％伊文思蓝10ml.kg-l。检测方法：20min后，取带有蓝染皮肤肌肉块，投入7：3丙酮混合液3ml中浸泡48h，48h后取浸泡液，用酶标仪于590nm处测定吸光度，计算抑制率。抑制率%＝（空白对照组OD值-给药组OD值）×100% /空白对照组OD值。

3.**辛夷鼻通膏对棉球肉芽肿的影响**

棉球肉芽肿模型的制备：取雄性大鼠，在乙醚浅麻醉下作腹部切口, 分别将20mg灭菌的棉球植入大鼠两侧腹股沟皮下。检测方法：动物常规分组给药，末次给药后处死大鼠, 剥离并取出肉芽组织, 于烘箱(70℃)内干燥1h后称重, 减去原棉球重量, 即为肉芽肿重量。计算抑制率，抑制率%＝（空白对照组肉芽肿重量-给药组肉芽肿重量）×100% /空白对照组肉芽肿重量。

 **4.辛夷鼻通膏对醋酸致小鼠疼痛的影响**

疼痛模型的制备：动物连续灌胃给予辛夷鼻通膏，末次给药1h后，每只小鼠按10ml.kg-1体质量腹腔注射0.6％醋酸溶液。检测方法：立即观察、记录第一次扭体时间及15min内小鼠扭体反应次数，以第一次扭体时间、扭体次数作为痛反应指标，计算药物组扭体次数抑制率。抑制率%＝（空白对照组扭体次数-给药组扭体次数）×100% /空白对照组扭体次数

**（二）辛夷鼻通膏的毒理学研究方案**

1.单次给药毒性试验

经预实验后，再决定是用LD50或者MTD测定方法。如采用LD50测定方法则计算辛夷鼻通膏的LD50值及95%可信限；如采用MTD测定方法则连续观察所有动物给药后14天的一般情况如精神、活动、饮食、排泄、毛发等变化，计算MTD值及体重增长率。

2.重复给药毒性试验

实验方法:选取8周龄大鼠120只，体重90～110g，雌雄各半，随机分为4组，每组30只，雌雄各半。每组大鼠分笼饲养，每笼5只。设对照组，辛夷鼻通膏高、中、低剂量（成人临床日剂量的60、30、15倍）组，每组30只。各给药组大鼠灌胃给药，空白对照组给予等体积蒸馏水，每日1次，连续30天。记录及检测指标：（1）一般情况观察：每日观察记录大鼠摄食量、体重、外观体征和行为活动、粪便性状等。（2）体重及摄食量监测：每周称体重1次，及时调整用药剂量；每周测定摄食量2次。（3）检测血液学指标：末次给药16h后，每组取20只大鼠，雌雄各半，用戊巴比妥钠麻醉大鼠采集全血测定红细胞计数、白细胞计数及其分类、血红蛋白、红细胞容积、平均红细胞容积、平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度、网织红细胞计数、血小板计数等指标；（4）采集血浆检测凝血两项；（5）检测血液生化学指标：另取血样分离血清，于全自动生化分析仪上测定血清中的天门冬氨酸转移酶、丙氨酸转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、肌酸激酶、钾离子浓度、钠离子浓度、氯离子浓度等生化指标；（6）计算主要脏器系数：解剖大鼠进行肉眼检查各器官情况，取脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺素、胸腺、子宫、卵巢、睾丸、附睾称重,并计算各脏器系数；（7）病理学检查：然后将脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺素、胸腺、子宫、卵巢、睾丸、附睾、胰腺、乳腺、膀胱、大小肠、胃、气管、主动脉、骨髓、垂体、前列腺等器官和组织用10%甲醛固定，HE染色，进行病理学检查。各组余下动物停药30天后同法测定上述指标。