

五、清咽润喉检验方法

1 动物实验

1.1 大鼠棉球植入实验

1.1.1 实验原理

采用棉球作为异物植入动物局部皮下，可引起与临床某些炎症后期病理变化相似的肉芽组织增生。比较给予受试样品后，实验组动物与对照组动物肉芽肿重量的差异，以确定受试样品是否具有干预慢性炎症（肉芽肿形成）的作用。

1.1.2 实验动物

推荐使用成年雄性大鼠，体重 150—220 克。每组 8—12 只。

1.1.3 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个空白对照组，三个剂量组中应包括一个人体推荐量 5 倍的剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.1.4 仪器和材料

手术器械、恒温干燥箱、分析天平、注射器、乙醚（或异氟烷）、碘伏、脱脂棉、脱毛器

1.1.5 实验步骤

1.1.5.1 棉球的处理 将脱脂棉制成约 20~25mg 紧致的小棉球，经高压灭菌后，置恒温干燥箱 60℃干燥 3h，取出无菌条件下称重，干燥保存，备用。

1.1.5.2 肉芽肿的形成和测定

实验结束前 8 天，用脱毛器脱去大鼠两侧腹股沟处的毛，乙醚（或异氟烷）浅麻醉大鼠，碘伏消毒，在无菌条件下切开大鼠两侧腹股沟皮肤，植入备用的棉球，缝合切口，继续给予受试物。实验结束当天，给受试物 1 小时后，断颈处死大鼠，在原缝合处剪开皮肤，剥离并取出棉球肉芽组织，置于已称重洁净平皿中，恒温干燥箱 60℃开盖干燥 1 小时后称重，计算肉芽肿净量。

$$\text{肉芽肿净量 (mg)} = \text{干燥后棉球肉芽肿重量} - \text{原棉球重量}$$

1.1.6 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，则计算 F 值。若 F 值 $< F_{0.05}$ ，结论为各组均数间差异无显著性；若 F 值 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），结论为各组均数间差异有显著性，需进一步使用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换，待满足正态分布或方差齐的要求后，用转换后的数据进行统计分析；若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的，则改用秩和检验进行统计分析。

结果判定：实验组与空白对照组比较，肉芽肿净量明显下降，经统计处理差异有显著性，可判定该受试样品大鼠棉球植入实验结果阳性。

1.1.7 注意事项

1.1.7.1 所用棉球重量及表面积对实验结果影响较大，故在实验中，应尽可能保证所用棉球重量和表面积近似。

1.1.7.2 尽量使手术切口的大小一致，以减少差异。

1.1.7.3 植入棉球后，将切口缝合牢固，以免在实验过程中棉球脱落，影响实验结果。

1.2 大鼠足趾肿胀实验

1.2.1 实验原理

一定量致炎剂注入大鼠后肢足趾皮下，可造成足趾肿胀。测定足趾容积，比较致炎剂作用前后实验组和对照组足趾容积的变化，以确定受试样品是否具有干预急性炎症（足趾肿胀）的作用。

1.2.2 实验动物

同 1.1.2。

1.2.3 剂量分组及受试样品给予时间

同 1.1.3

1.2.4 仪器和材料：

致炎剂（推荐使用葡聚糖 4 万）、足趾容积测量仪、无菌蒸馏水、0.25mL 注射器。

1.2.5 实验步骤

1.2.5.1 致炎剂的配制 用无菌蒸馏水配制浓度为 1%的葡聚糖 4 万，备用。

1.2.5.2 足趾肿胀及测定 实验结束当天再给受试样品一次，1 小时后，用足趾容积测量仪测量各组大鼠右后足趾的容积，作为 0 小时足趾容积。然后在大鼠右后足趾皮下注入 1%葡聚糖 4 万 0.1mL/只，分别于 1、2、4、6 小时测量大鼠足趾的容积，同一部位测量 3 次，取平均值。以不同时间所测足趾容积与致炎剂作用前的足趾容积之差为肿胀值，计算各个时间段的足趾肿胀率。

$$\text{肿胀率}(\%) = \text{肿胀值} / \text{致炎前足趾容积} \times 100\%$$

1.2.6 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，则计算 F 值。若 F 值 $< F_{0.05}$ ，结论为各组均数间差异无显著性；若 F 值 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），结论为各组均数间差异有显著性，需进一步使用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换，待满足正态分布或方差齐的要求后，用转换后的数据进行统计分析；若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的，则改用秩和检验进行统计分析。

结果判定：实验组与空白对照组比较，任一时间点刺激前后足趾容积肿胀率明显减少，差异有显著性，可判定该受试样品大鼠足趾肿胀实验结果阳性。

1.2.7 注意事项

1.2.7.1 致炎剂注入的质量对实验结果影响很大，注入致炎剂时，应将动物后肢拉直，从右后足掌心向踝关节方向皮下注射致炎剂，并应尽可能使动物不动。建议由专人负责致炎剂的注射，以保证实验结果的一致性。

1.2.7.2 测量足趾容积时，严格按仪器说明操作。注意应在鼠足某处用记号笔画线作为测量标线，将鼠足缓缓放入测量筒内，当水平面与鼠足上的测量标线重叠时，踏动脚踏开关，记录足趾容积，用吸水纸擦干鼠足上的水后，分别再进行第 2 次和第 3 次测定。为避免测量误差，测定人员应事先进行训练，掌握将鼠足放入测量筒内的最佳方式，每个样品的测量最好由专人进行。

1.2.7.3 每次测定的部位要固定。

1.3 小鼠耳肿胀实验

1.3.1 实验原理

二甲苯为无色澄清液体，涂抹于小鼠耳廓后，由于其刺激作用，可引起鼠耳局部毛细血管充血，通透性增加，导致急性炎症。比较实验组和对照组二甲苯作用后耳肿胀率的差异，以确定受试样品是否具有干预急性炎症（小鼠耳肿胀）的作用。

1.3.2 仪器和材料

直径 9mm 打孔器、致炎剂（二甲苯）、微量加样器、分析天平

1.3.3 实验动物

推荐使用近交系雄性小鼠，体重 18—22 克，每组 10—15 只。

1.3.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个空白对照组，三个剂量组中应包括一个人体推荐量 10 倍的剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.3.5 实验步骤

汲取二甲苯 20 μ L，滴加在小鼠右耳外侧面耳廓的中央，让其自由扩散，30 分钟后，将小鼠脱颈椎处死，剪下双耳，用 9mm 直径打孔器在两耳相同部位打下耳片并称重，以两耳重量之差为耳廓肿胀值，计算耳廓肿胀率。

$$\text{耳廓肿胀率 (\%)} = \text{耳廓肿胀值} / \text{对照耳片重量} \times 100\%$$

1.3.6 数据处理和结果判定

一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，则计算 F 值。若 F 值 $< F_{0.05}$ ，结论为各组均数间差异无显著性；若 F 值 $\geq F_{0.05}$ （即 $P \leq 0.05$ ），结论为各组均数间差异有显著性，需进一步使用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换，待满足正态分布或方差齐的要求后，用转换后的数据进行统计分析；若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的，则改用秩和检验进行统计分析。

结果判定：实验组与空白对照组比较，耳廓肿胀率明显减少，差异有显著性，可判定该受试样品小鼠耳肿胀实验结果阳性。

1.3.7 注意事项

1.3.7.1 二甲苯具有对眼及上呼吸道有刺激作用，操作时，操作者应注意自身的防护。

1.3.7.2 打下的耳片应及时称重，以避免水分失去而影响实验结果的准确性。

1.4 结果判定

大鼠棉球植入实验结果阳性，同时大鼠足趾肿胀实验或小鼠耳肿胀实验结果任意一项阳性，可判定该受试样品清咽润喉动物实验结果为阳性。

2 人体试食试验

2.1 受试者纳入标准

2.1.1 体征：慢性咽炎人群，主观症状有咽痛、咽痒、咽干、干咳、异物感、多言加重等。