

咳喘平颗粒镇咳、祛痰、平喘药效学研究

汪永忠^{*}, 夏伦祝

(安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的: 研究咳喘平颗粒的镇咳、祛痰、平喘作用, 并探讨其平喘机制。方法: 观察咳喘平颗粒对浓氨水致小鼠咳嗽、氯化乙酰胆碱致豚鼠哮喘和小鼠气道酚红排泄的影响, 同时采用大鼠毛细支气管法观察咳喘平颗粒的祛痰作用, 并观察咳喘平颗粒对卵白蛋白诱导哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液和肺组织白细胞三烯含量的影响。结果: 咳喘平颗粒可有效对抗浓氨水致小鼠咳嗽和氯化乙酰胆碱致豚鼠哮喘, 并明显促进小鼠气道酚红排泄和大鼠痰液分泌量。咳喘平颗粒明显抑制卵白蛋白致敏小鼠支气管肺泡灌洗液半胱氨酰白三烯(cysLTs)含量和肺组织白三烯B₄(LTB₄)含量。结论: 咳喘平颗粒具有良好的止咳平喘祛痰的效果, 其平喘机理可能与参与花生四烯酸代谢途径有关。

[关键词] 咳喘平颗粒; 镇咳; 祛痰; 平喘

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)06-0046-04

Antitussive, Expectorant and Antiasthmatic Effects of Kechuanping Granules

WANG Yong-zhong^{*}, XIA Lun-zhu

(The First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antitussive, expectorant and antiasthmatic effects and antiasthmatic mechanism of Kechuanping granules. **Methods:** Ammonia-induced cough in mouse and chloric acetylcholine-induced asthma in guinea pig were used. Effects of Kechuanping granules on phenol red displacement in mouse and phlegm secretion in rat were observed. The leukotrienes content in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin (OVA)-induced asthma mouse were determined. **Results:** Kechuanping granules could inhibit ammonia-induced cough in mouse and chloric acetylcholine-induced asthma in guinea pig. Kechuanping granules also increased phenol red displacement in mouse and phlegm secretion in rat. Furthermore, Kechuanping granules could inhibit the LTB₄ content in lung tissue and cysLTs content in BAL fluid of OVA-challenged mouse. **Conclusions:** Kechuanping granules have antitussive, expectorant and antiasthmatic effects. The mechanism by which Kechuanping granules inhibited the asthma in ovalbumin-induced mouse might partially be via arachidonic acid metabolic way.

[Key words] Kechuanping granules; antitussive effect; expectorant effect; antiasthmatic effect

咳喘是临床肺系疾患中最常见的证候之一, 一般包括现代医学的上呼吸道感染、支气管炎、支气管哮喘、支气管肺炎等各种疾病。咳喘平颗粒源于《伤

寒论》所载方, 在“小青龙汤”基础上加減, 由炙麻黄、苦杏仁、紫菀、甘草等多味中药组成, 具有宣肺平喘、止咳化痰的功效。多年临床治疗效果表明, 该方具有疗效确切, 作用迅速, 无明显毒副作用。对其进行药效学试验验证镇咳、祛痰、平喘等相关药理作用, 并与阳性对照药镇咳宁胶囊进行了比较, 明确其治疗特点, 为临床进一步应用和推广提供药理依据, 亦为新药开发奠定一定的试验基础。

[收稿日期] 2005-08-18

[通讯作者] 汪永忠, Tel: (0551) 2838557; E-mail: wyzhmail@163.com

1 材料

1.1 药品 咳喘平颗粒(麻黄 6g、苦杏仁 8g、紫菀 8g、陈皮 6g、款冬花 6g、法半夏 8g、甘草 5g、白前 6g), 各药味经水提醇沉, 浓缩, 加辅料制成颗粒, 每克含 2.25g 生药, 以君药麻黄的有效成分麻黄碱的含量作为质控指标。成品由安徽中医学院第一附属医院制剂中心提供, 批号: 040203; 桂龙咳喘宁胶囊, 山西桂龙医药有限公司生产, 批号: 040805。

1.2 试剂 卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、HEPES、苯甲基磺酰氯(PMSF)、aprotinin 和 leupeptin 等均购自 sigma 公司。浓氨水为中国宿州化学试剂厂产品。乌拉坦为上海化学试剂厂产品。氯化乙酰胆碱为上海试剂三厂产品。酚红为上海化学试剂总厂产品。乙二胺四乙酸(EDTA)、NaOH 和 KCl 均为分析纯, 上海试剂一厂和试剂四厂产品。白三烯 cysLTs 和 LTB₄ 酶联免疫分析试剂盒为 Amersham 公司产品。

1.3 动物 昆明种小鼠及 C57BL/6 小鼠, 体重 18~22g, 雌雄兼用; SD 大鼠, 体重 180~220g, 雌雄兼用; 幼年豚鼠, 体重 150~200g, 雌雄兼用。以上动物均购自上海 BK 实验动物有限公司, 合格证: 沪医 D-65。

1.4 仪器 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂), EL301 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), Y-1 型脏器灌流仪(北京真空仪表厂), Pair boy 037G6000 型超声雾化器(德国), 玻璃毛细管(内径 1.0mm, 长度 10cm, 华西医科大学仪器厂), LDZ5-2 型离心机(黑马仪器公司)。

2 方法

2.1 对小鼠的镇咳作用^[1] 昆明种小鼠, 体重 18~22g, 雌雄各半。设咳喘平颗粒高剂量组(10.0g·kg⁻¹)、中剂量组(5.0g·kg⁻¹)、低剂量组(2.5g·kg⁻¹); 阳性药咳喘宁组(2.5g·kg⁻¹); 另设蒸馏水溶媒对照组(简称对照组)。每组 10 只, 计 50 只。以上各组每日灌胃(ig)给药一次, 容量 20mL·kg⁻¹ 体重, 对照组给予等量溶媒蒸馏水, 连续给药 7d。小鼠末次给药前禁食 12h, ig 受试药物或蒸馏水 1h 后, 将小鼠置 4L 密闭玻璃容器内, 定量恒压喷雾浓氨水, 喷液量 3mL, 5s 后立即取出, 记录小鼠咳嗽潜伏期及 2min 内的咳嗽次数。

2.2 对大鼠的祛痰作用^[1] 成年 SD 大鼠 180~220g, 雌雄兼用, 设咳喘平颗粒高剂量组(5.0g·kg⁻¹)、中剂量组(2.5g·kg⁻¹)、低剂量组(1.25g·

kg⁻¹); 阳性药咳喘宁组(1.25g·kg⁻¹); 另设溶媒对照组。每组 10 只, 计 50 只。以上各组每日 ig 给药一次, 容量 10mL·kg⁻¹ 体重, 对照组给予等量溶媒蒸馏水, 连续给药 7d。末次给药前禁食 12h, ig 受试药物或蒸馏水 1h 后, 腹腔注射(ip)乌拉坦 1g·kg⁻¹, 大鼠麻醉后仰卧位固定, 剪开颈中皮肤, 分离气管, 插入毛细管, 吸取气管内痰液。以毛细管吸取痰液的长度作为评价药物的祛痰效果。记录 2h 大鼠痰液分泌量。

2.3 对小鼠气道酚红排泄的影响^[1] 昆明种小鼠, 体重 18~22g, 雌雄各半, 设组及给药方法同 2.1, 末次给药前禁食 12h, ig 受试药物和生理盐水 30min 后, ip 0.5% 酚红溶液 0.5mL/只, 30min 后脱白致死小鼠, 分离气管, 用套有尼龙管的 1mL 注射器插入气管, 结扎固定, 吸取 5% NaHCO₃ 0.3mL 冲洗气道 4 次, 每次不作停留, 灌洗液最后定容到 2mL 后, 2000r/min 离心 10min, 吸取上清液于 721 型分光光度计 540nm 测定光密度(OD 值)。

2.4 对豚鼠的平喘作用^[1] 豚鼠体重 150~200g, 雌雄兼用, 将豚鼠放入 4L 密闭玻璃容器内, 以 4% 氯化乙酰胆碱定量恒压喷雾, 每只豚鼠接受喷雾, 喷液量 6mL, 5s 后立即取出, 记录豚鼠从接受喷雾开始到出现喘息性抽搐跌倒的潜伏期。引喘潜伏期 > 120s 的舍弃。合格豚鼠分组及给药方法同 2.2。末次给药前禁食 12h, 给药后 1h, 将豚鼠放入喷雾装置内, 以 4% 氯化乙酰胆碱定量恒压喷雾 5s, 记录豚鼠的引喘潜伏期。

2.5 对 OVA 致敏小鼠支气管肺泡灌洗液 cysLTs 含量和肺组织 LTB₄ 含量的影响 C57BL/6 小鼠于 0d ip OVA 200mg, 10d 强化 ip OVA 20mg。21~23d 连续 3d 将小鼠放入 4L 密闭玻璃容器内, 以 1% OVA 水溶液定量恒压喷雾 30min, 喷液量 5mL。25d 将小鼠置 4L 密闭玻璃容器内, 以 10% OVA 水溶液定量恒压喷雾激发哮喘。正常组小鼠以上各步骤均以等量蒸馏水代替 OVA 溶液 ip 和喷雾^[2]。

OVA 致敏小鼠设组与剂量同 2.1。各组 ig 给药一次, 容量 20mL·kg⁻¹ 体重, 正常组和模型组给予等量溶媒蒸馏水, 于 20~26d 连续给药 7d, OVA 末次致敏之后 24h 末次给药。

OVA 末次致敏 48h 后脱白处死小鼠, 收集支气管肺泡(bronchoalveolar lavage, BAL)灌洗液, 测定 cysLTs(LTC₄, LTD₄, LTE₄)含量。同时每鼠取 0.5g 肺

组织以 10 倍体积含 10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, aprotinin (2mg·mL⁻¹), leupeptin (2mg·mL⁻¹) 的磷酸盐缓冲液匀浆后冰浴 30min 并 4 °C 3000 × g 离心, 取上清液测定 LTB₄ 含量^[3]。

cysLTs 和 LTB₄ 测定按照酶联免疫分析试剂盒说明书操作: 标本及不同浓度标准品溶液置预涂羊抗鼠 IgG 的 96 孔板中, 加入大鼠抗白三烯血清室温孵育 2h 后, 再与白三烯-过氧化物酶孵育 3h; 洗板后, 加入四甲基对二氨基联苯和过氧化氢中止反应, 酶标仪 450nm 处测定吸光值 (A), 在标准曲线上查出样品对应的浓度 (pg·mL⁻¹)。

2.6 对实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SSPS10.0 统计软件进行 *t* 检验分析, 比较组间显著性差异。

3 结果

3.1 咳喘平颗粒对浓氨水致小鼠咳嗽的影响 见表 1, 结果表明咳喘平颗粒 (10.0, 5.0g·kg⁻¹, ig, 7d) 可有效抑制浓氨水诱导的小鼠咳嗽, 使小鼠的咳嗽次数明显减少的同时 ($P < 0.001$) 使小鼠咳嗽的潜伏期明显的延长 ($P < 0.05$), 镇咳效果与阳性对照药咳喘宁 (2.5g·kg⁻¹) 类似。咳喘平 (2.5g·kg⁻¹, ig, 7d) 可明显减少小鼠咳嗽次数 ($P < 0.05$), 但是对小鼠咳嗽的潜伏期没有明显影响。

表 1 咳喘平颗粒对浓氨水致小鼠咳嗽的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	咳嗽潜伏期 (s)	咳嗽次数 (次·2min ⁻¹)
对照组	—	16.00 ± 5.77	21.00 ± 4.00
咳喘宁	2.5	25.90 ± 10.42 ¹⁾	10.20 ± 4.32 ³⁾
咳喘平	10.0	23.00 ± 6.94 ¹⁾	13.20 ± 2.82 ³⁾
	5.0	24.30 ± 10.19 ¹⁾	11.80 ± 4.37 ³⁾
	2.5	20.20 ± 4.87	16.10 ± 4.12 ¹⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与咳喘宁组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$ (下同)。

3.2 咳喘平颗粒对大鼠气管痰液分泌量的影响 见表 2, 结果表明咳喘平颗粒 (5.0, 1.25, 2.5g·kg⁻¹, ig, 7d) 均有明显的祛痰作用, 其作用类似于阳性对照药咳喘宁胶囊 (1.25g·kg⁻¹); 而咳喘平颗粒 (1.25g·kg⁻¹) 对排痰量增加作用明显较咳喘宁胶囊 (1.25g·kg⁻¹) 弱。

3.3 咳喘平颗粒对小鼠气道酚红排泄的影响 见表 3, 结果表明咳喘平颗粒 (10.0, 5.0g·kg⁻¹, ig, 7d)

可显著增加小鼠气道酚红排泄, 其作用类似于阳性对照药咳喘宁胶囊 (2.5g·kg⁻¹)。咳喘平颗粒 (2.5g·kg⁻¹, ig, 7d) 对小鼠气道酚红排泄没有明显影响。

表 2 咳喘平颗粒对大鼠气管痰液分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	痰量 (mm)
对照组	—	5.60 ± 2.12
咳喘宁	1.25	10.40 ± 2.50 ³⁾
咳喘平	5.0	8.50 ± 2.32 ²⁾
	2.5	9.20 ± 2.90 ²⁾
	1.25	7.70 ± 2.26 ^{1), 4)}

表 3 咳喘平颗粒对小鼠气道酚红排泄的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	OD 值
对照组	—	0.095 ± 0.026
咳喘宁	2.5	0.153 ± 0.026 ³⁾
咳喘平	10.0	0.132 ± 0.035 ¹⁾
	5.0	0.129 ± 0.034 ¹⁾
	2.5	0.102 ± 0.025 ⁴⁾

3.4 咳喘平颗粒对药物所致豚鼠哮喘的影响 见表 4, 结果表明咳喘平颗粒 (5.0, 2.5g·kg⁻¹, ig, 7d) 对 4% 氯化乙酰胆碱诱发豚鼠哮喘有显著抑制作用, 其平喘疗效均明显优于阳性对照药咳喘宁胶囊 (1.25g·kg⁻¹)。咳喘平颗粒 (1.25g·kg⁻¹, ig, 7d) 亦可抑制药物诱发豚鼠哮喘 ($P < 0.05$), 作用与咳喘宁 (1.25g·kg⁻¹) 相当。

表 4 咳喘平颗粒对豚鼠的平喘作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	引喘潜伏期 (s)
对照组	—	56.80 ± 20.76
咳喘宁	1.25	76.90 ± 13.25 ¹⁾
咳喘平	5.0	97.60 ± 14.02 ^{3), 5)}
	2.5	92.30 ± 17.13 ^{2), 4)}
	1.25	78.80 ± 17.57 ¹⁾

3.5 咳喘平颗粒对 OVA 致敏小鼠支气管肺泡灌洗液 cysLTs 含量和肺组织 LTB₄ 含量的影响 见表 5, 6。

结果表明 OVA 致敏小鼠支气管肺泡灌洗液 cysLTs 含量和肺组织 LTB₄ 含量均显著高于正常组, 咳喘平颗粒 (10, 5.0, 2.5g·kg⁻¹, ig, 7d) 均可显著抑制

OVA 致敏小鼠支气管肺泡灌洗液 cysLTs 含量和肺组织 LTB₄ 含量,且疗效明显优于阳性对照药咳喘宁胶囊(2.5g·kg⁻¹)。

表 5 咳喘平颗粒对 OVA 致敏小鼠支气管肺泡灌洗液 cysLTs 含量影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	cysLTs(pg·mL ⁻¹)
正常组	—	40.79 ± 7.77
模型组	—	115.12 ± 16.90
咳喘宁	2.5	97.18 ± 14.87 ¹⁾
咳喘平	10.0	73.82 ± 17.88 ^{3),5)}
	5.0	85.11 ± 14.48 ^{3),4)}
	2.5	91.38 ± 17.99 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001; 与咳喘宁组比较⁴⁾ P < 0.05, ⁵⁾ P < 0.01, ⁶⁾ P < 0.001(下同)。

表 6 咳喘平颗粒对 OVA 致敏小鼠肺组织 LTB₄ 含量影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	LTB ₄ (pg·mL ⁻¹)
正常组	—	6.49 ± 1.33
模型组	—	17.91 ± 1.52
咳喘宁	2.5	15.16 ± 3.28 ¹⁾
咳喘平	10.0	9.89 ± 1.92 ^{3),6)}
	5.0	10.52 ± 2.06 ^{3),4)}
	2.5	13.58 ± 3.34 ²⁾

4 讨论

咳喘平颗粒剂以麻黄为君药,具有发汗散寒、益肺平喘、利水消肿之功效,辅以苦杏仁,降气止咳平喘,二者配伍,麻黄可增加汤剂中苦杏仁苷的含量,相应苦杏仁亦增加麻黄碱的含量,合用可增强疗效⁴⁾。辅以紫菀润肺下气,且能平喘,以甘草调和,可降低苦杏仁苷的含量,但影响差异不显著,提示甘草可通过降低苦杏仁苷的含量而降低毒性,起到调和药性的作用,诸药相合,具有润肺止咳、平喘理气化痰的治疗效果。

咳喘平颗粒可有效抑制浓氨水所致小鼠咳嗽、促进大鼠气管痰液的分泌和小鼠气道酚红的排泄,其止咳化痰作用与阳性药咳喘宁胶囊类似。

哮喘是由肺部肥大细胞脱颗粒以及嗜曙红细胞或其他炎性细胞浸润引起的慢性呼吸道疾病。嗜曙红细胞可以释放细胞毒性因子如 ROS 等,并引起呼

吸道损伤¹⁵⁾。在变态反应源诱导的小鼠哮喘模型中,变态反应源引起的氧化反应和氧化还原失衡可激活核转录因子 NF-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)和活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1)等,并进一步引起胞浆磷脂酶 A₂(cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂)的活化,后者可以促进花生四烯酸和脂质炎性介质如前列腺素和白细胞三烯的释放³⁾。cysLTs 和 LTB₄ 是重要的白细胞三烯,均由花生四烯酸脂氧酶代谢途径产生,在体内发挥多种生物作用,包括促进化学趋化作用和平滑肌收缩,激活炎性细胞等。ROS 和 cPLA₂ 均可促进 cysLTs 和 LTB₄ 释放⁶⁾。本研究表明确咳喘平颗粒可有效抑制变态反应原所引起的小鼠支气管肺泡 cysLTs 含量和肺组织 LTB₄ 含量升高,提示其平喘机理可能与参与机体花生四烯酸代谢途径及调控白三烯合成有关。

综合本实验结果,咳喘平颗粒有良好的止咳平喘祛痰的效果,其平喘机理可能与参与机体花生四烯酸代谢途径有关,此为该药的临床应用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 徐叔云,陈修,卞如濂.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002.1359,1363,1370,1380.
- [2] Youn Wook Chung, Hae Yeun Oh, Ji Yeong Kim, et al. Allergen induced proteolytic cleavage of annexin-1 and activation of cytosolic phospholipase A2 in the lungs of a mouse model of asthma[J]. Proteomics, 2004, 4(11): 3328-3334.
- [3] Yang L, Cohn L, Zhang DH, et al. Essential Role of Nuclear Factor κB in the Induction of Eosinophilia in Allergic Airway Inflammation[J]. J Exp Med, 1998, 188(9): 1739-1750.
- [4] 陈飞龙,刘传明,罗佳波,等.麻黄汤中麻黄碱与伪麻黄碱的 GC-MS 法测定及配伍因素对汤剂中该成分含量的影响[J].中草药,2002,33(4): 307-309.
- [5] Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. Free Radical Biol Med, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [6] Woo CH, Eom YW, Yoo MH, et al. Tumor Necrosis Factor-α Generates Reactive Oxygen Species via a Cytosolic Phospholipase A2-linked Cascade[J]. J Biol Chem, 2000, 275(41): 32357-32362.