

卷烟烟气中木犀草素和黄芩苷混合物对呼吸系统作用的研究

魏敏¹, 王君², 宋旭艳¹, 罗诚浩¹, 胡霞敏², 熊宏春^{1*} (1.湖北中烟工业有限责任公司技术中心, 武汉 430051; 2.武汉科技大学医学院药理学系, 武汉 430065)

摘要: 目的 研究卷烟烟气中木犀草素和黄芩苷对呼吸系统的作用。方法 将木犀草素和黄芩苷混合物加入卷烟制成特制卷烟, 以动物吸烟机使混合物通过烟气接触动物呼吸系统。采用小鼠氨水引咳法制作咳嗽模型; 以小鼠酚红排泄法评价气道分泌液量; 以豚鼠整体动物药物引喘法评价对支气管痉挛的作用; 并进行木犀草素和黄芩苷混合物经消化道给药和特制卷烟的急性毒性试验。结果 与对照卷烟比较, 特制卷烟可明显减少咳嗽, 增加气道分泌液量, 减轻动物呼吸道刺激。结论 特制卷烟中木犀草素和黄芩苷能降低卷烟的呼吸系统危害性。

关键词: 特制卷烟; 卷烟烟气; 黄芩苷; 木犀草素; 呼吸系统

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)03-0197-05

Experimental Study of Luteolin and Baicalin Mixture in Cigarette Smoke on Respiratory System

WEI Min¹, WANG Jun², SONG Xuyan¹, LUO Chenghao¹, HU Xiamin², XIONG Hongchun^{1*} (1. Technology Center of China Tobacco Hubei Industrial Corporation, Wuhan 430051, China; 2. Department of Pharmacy, Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of luteolin and baicalin mixture in purpose-made cigarette smoke on respiratory system. **METHODS** Purpose-made cigarette was made by adding luteolin and baicalin mixture into cigarette. Mixture in smoke contacted with respiratory system by smoking machine. The cough model induced by ammonia in mice was used. The effect of mixture on tracheal excretion was evaluated by phenol red excretion test in mice. The action of luteolin and baicalin mixture on asthma was investigated in histamine and acetylcholine induced-asthma guinea pig. Acute toxicity tests of oral luteolin and baicalin mixture and purpose-made cigarette were conducted. **RESULTS** Luteolin and baicalin mixture in smoke reduced the frequency of cough ammonia-induced in mouse, increased the tracheal excretion compared with control cigarette, and eased the incitement to respiratory system. **CONCLUSION** Luteolin and baicalin mixture in purpose-made cigarette smoke can diminish perniciousness of cigarette and improve the quality of cigarette in sensory evaluation to some extent.

KEY WORDS: purpose-made cigarette; cigarette smoke; baicalin; luteolin; respiratory system

黄酮类化合物木犀草素(luteolin)是一种天然的多酚化合物^[1]。中药白毛夏枯草的有效成分是木犀草素, 临床上主要用于治疗慢性支气管炎和其

他呼吸道疾病的痰多咳嗽等, 既能清肺热, 又能祛痰止咳。现代研究也证实, 木犀草素可减轻哮喘小鼠气道的高反应性和气道炎症^[2], 抑制气道壁

作者简介: 魏敏, 女, 硕士, 工程师 Tel: (027)83370967
Tel: (027)83371029 E-mail: xionghch@hbtobacco.cn

E-mail: weimin@hbtobacco.cn *通信作者: 熊宏春, 男, 博士, 工程

的增厚和平滑肌增殖,减轻气道重塑^[3]。黄芩苷(baicalin)具有抗病原微生物、增强机体免疫力、抗氧化等多种作用,是黄芩的主要功效成分。有报道指出黄芩苷有治疗哮喘的作用^[4-5]。从中医角度,黄芩具有清热解毒、燥湿泻火之功效,可用于肺热咳嗽^[6]。在中药古方中就常以白毛夏枯草与黄芩配伍,以增强清肺、祛痰止咳的功效^[7]。

将木犀草素与黄芩苷按一定比例与浓度混合加入卷烟(以下简称特制卷烟)中,评价特制卷烟烟气中有效中药成分对呼吸系统的作用。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

特制卷烟(湖北中烟工业有限责任公司);氨水(洛阳市化学试剂厂,批号:080418);苯酚红(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号:080701);乙酰胆碱(上海三爱思试剂有限公司,批号:20061130);枸橼酸(上海试剂一厂,批号:020912);磷酸组胺(上海丽珠东风生物技术有限公司,批号:090927)。

1.2 动物

用于呼吸系统作用功效评价的昆明种小鼠:体重18~22 g,♀♂兼用,购自湖北省实验动物中心,实验动物合格证号:00005894;用于安全性评价的昆明种小鼠:♀♂兼用,体重20~25 g,购自武汉大学动物饲养中心,实验动物合格证号:SCXK(鄂)2008-0004。豚鼠:清洁级,体重300~350 g,♂,购自武汉生物制品研究所,实验动物合格证号:00006845。

1.3 方 法

1.3.1 卷烟吸烟方法 本研究所用动物吸烟机是自主开发的一种专用于动物实验的主动吸烟装置,它能使动物处于模拟抽烟的状态,进而观察动物在该状态下的情况,得到真实的试验数据。用于动物实验的主动吸烟装置由染毒箱和模拟抽烟系统组成,染毒箱是由透明的有机玻璃制成的箱体,箱体内腔为可容纳一至数只小型或中型实验动物的空腔,箱体上设置有动物进出的门,在箱体的一侧邻近底部处设置有一至多个卷烟插口,箱体对面另一侧邻近底部处设置有一至多个抽吸口,抽吸口与模拟抽烟系统相连通。模拟抽烟系统由电源、脉冲电流时间控制器、泵、过滤

器串接而成,过滤器通过软管与染毒箱上的抽吸口相连通。所述的泵的流体速度在 $1\sim 3\text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ 之间可调。所述的脉冲电流时间控制器的时间间隔的控制范围是 $0.1\text{ s}\sim 9\text{ min}$,可根据实验要求进行调整。卷烟插口和抽吸口设置在距箱体底部 $2\sim 5\text{ cm}$ 的地方。门与箱体之间设置有密封结构。本实验证实,此装置设计合理,结构简单,使用方便。

1.3.2 对呼吸系统功效的评价

1.3.2.1 动物分组及处理 以小鼠为实验对象的模型使用小型动物箱体按每5只小鼠每日吸烟支数随机分为吸烟1支组、2支组、4支组和6支组,每组均设对照卷烟组和特制卷烟组,共8组,每组15只。以豚鼠为实验对象的模型使用中型动物箱体,按每5只豚鼠每日吸烟支数随机分为吸烟1支组、2支组和3支组,每组也均设对照卷烟组和特制卷烟组,共6组,每组10只。

吸烟时将动物放入有机玻璃仓中吸烟。空气与烟气流入比 $2:1$,调节流量计,控制每只香烟燃烧速度为 3 min 。每日按组别依次吸取相应类型和支数的香烟一次。最后一支香烟燃烧完后动物仍在有机玻璃仓中继续观察 10 min ,直至烟气散尽。连续 7 d 。

1.3.2.2 对咳嗽的影响 小鼠氨水引咳法^[8]:各组最后一次吸烟后 1 h ,将小鼠置于广口瓶中,喷入浓氨水,立即记录放入时间,观察并记录咳嗽潜伏期及 2 min 内咳嗽次数。

1.3.2.3 对气管分泌液量的影响 小鼠酚红排泄法^[8]:各组最后一次吸烟后 1 h ,腹腔注射 2.5% 酚红溶液 $0.1\text{ mL}\cdot(10\text{g})^{-1}$, 30 min 后用脱颈椎处死,仰位固定于蛙板上手术分离气管。用 1 mL 注射器吸取 1 mL NaHCO_3 ,推注入气管内,反复连续推抽3次灌洗呼吸道,洗出液收集在试管中,按上述方法重复3次。洗出液沉淀或离心,测定 OD_{546} 值。与酚红标准曲线比较,求出其酚红量。

1.3.2.4 对乙酰胆碱和组胺诱发支气管平滑肌痉挛的影响 豚鼠药物引喘法^[8]:用 2% 氯化乙酰胆碱与 0.1% 磷酸组胺等体积混合,在 4 L 的密闭容器中进行喷雾,每鼠恒压恒速喷雾 15 s (共 0.75 mL),诱发支气管平滑肌痉挛,导致哮喘,测定其引喘潜伏期。豚鼠需初筛后用于正式实验,若引喘潜伏期大于 120 s 者弃去。

1.3.3 安全性评价

1.3.3.1 黄芩苷和木犀草素混合物经消化道给药的急性毒性试验 将小鼠随机分为黄芩苷和木犀草素混合物组以及生理盐水对照组, 每组 20 只, ♀ ♂ 各半。将混合物溶于蒸馏水, 稀释的浓度以可成液态灌胃的最大溶解度为限, 记录终浓度为黄芩苷和木犀草素混合物: 蒸馏水为 2:1。小鼠试验前先禁食 4 h 左右, 每只小鼠称重, 以小鼠的最大灌胃量[0.2 mL·(10 g)⁻¹], 计算每只小鼠的灌胃剂量; 对照组用同样剂量的蒸馏水灌胃。记录每只小鼠死亡时间以及观察小鼠中毒症状。评价黄芩苷和木犀草素混合物对动物的急性毒性。

1.3.3.2 特制卷烟的急性毒性试验 将小鼠随机分为特制卷烟组和对照卷烟组, 每组 20 只, ♀ ♂ 各半。吸烟方法同“1.3.2.1”项下内容。记录每只小鼠的死亡时间以及总吸烟量, 观察小鼠中毒症状。由于吸烟机吸烟速度恒定, 小鼠死亡时间与吸烟的量成正比。通过与对照卷烟组小鼠的平均存活时间比较, 评价特制卷烟的急性毒性。

1.3.4 统计学方法 两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果与讨论

2.1 特制卷烟烟气对刺激性物质气雾所致咳嗽的作用

通过氨等刺激性物质气雾吸入呼吸道内, 刺激呼吸道上皮下的感受器, 模拟吸烟引起的呼吸道刺激, 引起咳嗽。与同剂量的对照卷烟组比较, 特制卷烟组在低剂量(1 支组)下能显著减少氨水刺激所致咳嗽次数($P<0.05$), 结果见表 1。提示特制卷烟能

表 1 特制卷烟烟气对小鼠咳嗽及气管分泌液量的影响 ($n=15, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of purpose-made cigarette smoke on cough and trachea secretions in mice ($n=15, \bar{x} \pm s$)

吸烟剂量	卷烟类型	咳嗽潜伏期/s	2 min 内咳嗽次数/次	酚红排出量/ μg
1 支	对照卷烟	51.4±23.9	9.5±5.4	1.033±0.350
	特制卷烟	43.8±24.9	6.1±3.9 ¹⁾	1.533±0.642 ¹⁾
2 支	对照卷烟	46.0±25.4	11.6±8.6	1.492±0.833
	特制卷烟	42.5±27.9	14.1±8.9	1.525±0.850
4 支	对照卷烟	46.7±30.1	12.0±7.9	1.083±0.892
	特制卷烟	42.9±26.3	11.4±8.6	1.225±0.642
6 支	对照卷烟	35.9±16.0	14.2±8.4	1.567±0.367
	特制卷烟	34.7±20.7	15.2±8.2	1.833±0.775

注: 与同剂量对照卷烟比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with control cigarette group, ¹⁾ $P<0.05$

够减少刺激性物质气雾所致咳嗽次数。高剂量特制卷烟未显示出显著的保护效应, 可能是由于高浓度烟气对呼吸道损伤过于严重, 以致木犀草素与黄芩苷混合物的作用不足以表现出来。

2.2 特制卷烟烟气对气管分泌液量的影响

吸入烟雾的刺激和直接毒害作用, 会导致呼吸道黏膜纤毛系统结构和功能的异常, 使痰液排出不畅, 尤其是对老年人或合并有慢性呼吸道疾病的患者, 会使痰液变稠难以咳出, 经常性痰液淤积, 会导致原有病情加重^[9]。

小鼠酚红排泄法是反映支气管分泌液量的经典实验方法。分别与同剂量的对照卷烟组比较, 特制卷烟 1 支组能显著增加小鼠呼吸道酚红排出量($P<0.05$), 结果见表 1。提示特制卷烟能够促进痰液分泌和稀释, 使痰液量多而且稀薄, 使痰液排出增加, 降低烟气对呼吸道的刺激。

2.3 特制卷烟对支气管平滑肌张力的影响

卷烟烟气可激惹支气管平滑肌诱发哮喘的发作, 烟气中的主要成分烟碱可激动 N_N 受体, 为神经节兴奋剂, 可刺激迷走神经而引起支气管痉挛。焦油可引起支气管黏膜上皮的增生和变异。氰氢酸损害支气管黏膜上皮细胞及其纤毛, 使支气管黏膜分泌黏液增多, 气道阻力增加, 所以吸烟可直接或间接地引起支气管痉挛。此外, 卷烟烟气亦能改变机体免疫和炎症过程, 从而诱发哮喘发病^[10]。结果显示, 与同剂量对照卷烟组比较, 特制卷烟各剂量组对引喘潜伏期的作用无显著性差异, 结果见表 2。

表 2 特制卷烟对乙酰胆碱和组胺诱发豚鼠支气管哮喘的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of purpose-made cigarette smoke on asthma induced by histamine and acetylcholine in guine pig ($n=10, \bar{x} \pm s$)

吸烟剂量	卷烟类型	引喘潜伏期/s
1 支	对照卷烟	87.0±21.5
	特制卷烟	89.7±14.3
2 支	对照卷烟	77.5±10.4
	特制卷烟	88.2±27.3
3 支	对照卷烟	75.3±34.3
	特制卷烟	83.2±11.6

木犀草素属弱酸性四羟基黄酮化合物, 有可能为一个哮喘研究中有效的干预药物^[11]。Das 等^[12]

研究发现木犀草素能显著减轻哮喘的症状。黄芩苷具有抗支气管哮喘变应性炎症的作用^[10], 在体内能显著抑制白介素-4、白介素-5的蛋白表达及GATA-3、STAT-6的基因表达; 并能提高白介素-10的蛋白表达, 调节哮喘的免疫和炎症反应^[5]。木犀草素与黄芩苷的平喘作用主要是通过调节免疫和炎症反应发挥的。本实验采用烟气吸入的方式, 使两药与呼吸道局部产生作用, 调节免疫和炎症反应的作用难以充分发挥。

2.4 混合物及特制卷烟烟气的毒理学评价

2.4.1 混合物急性毒性评价 对黄芩苷和木犀草素混合物经消化道给药的急性毒性试验发现, 其致死剂量大于最大灌胃量, 且小鼠无任何不适的表现。14 d总剂量为500和2 000 mg·kg⁻¹的存活率均为100%。同时, 一般情况、摄食、饮水情况、神经反应和活动情况、体重变化等与对照组相比均无差异, 且♀♂无差别。

2.4.2 特制卷烟烟气的急性毒性评价 通过对特制卷烟烟气进行小鼠急性毒性试验, 发现特制卷烟组小鼠的平均存活时间较对照卷烟组长且♀♂的表现一致, 具有显著性差异($P<0.01$), 结果见表3。

表3 特制卷烟烟气的急性毒性实验结果

Tab 3 Results of acute toxicity test of purpose-made cigarette

组别	♂	♀
	平均存活时间/min	平均存活时间/min
对照卷烟组	80.2±19.663	84.030±31.605
特制卷烟组	140.3±31.605 ¹⁾	97.8±19.054

注: 与对照卷烟组比较, ¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control cigarettes group, ¹⁾ $P<0.01$

3 结论

中医药理论体系, 是具有比较突出的协同作用的系统论的生物机体修复与平衡体系, 对解决卷烟吸食过程中的不良反应具有明显的优势^[13]。如何减轻吸烟对人体健康, 特别是对呼吸系统的损害具有重要意义^[9]。将具有呼吸系统保护作用的中草药作为添加物加入香烟中, 为中式卷烟的减害开发提供了可行的途径^[14-15]。远在唐代就有用洋金花、款冬花等烟剂治疗哮喘的记载^[16], 烟气中不同粒径的药物粒子沉积于呼吸道, 可在局部发挥作用, 从而减轻吸烟所引起的咳嗽、多痰、哮喘等呼吸道损害。

添加木犀草素和黄芩苷一定比例混合物的特制卷烟, 与同剂量的对照卷烟组比较, 可明显减少咳嗽, 增加气道分泌液量, 减轻动物呼吸道刺激, 降低卷烟危害性, 且特制卷烟组小鼠平均存活时间延长。其机制可能是特制卷烟在燃吸时, 所添加的木犀草素和黄芩苷混合物, 经受卷烟中不同梯度的温度加热, 可被蒸馏、气化、挥发和升华, 形成微粒相和气相成分, 该类物质可能捕获烟气中的自由基、降低有害物质的生成, 同时也作用于呼吸系统。不同粒径的烟气粒子或沉积于呼吸道, 或被肺泡吸收进入血液, 从而起到局部或全身的作用, 减低因吸烟而引起的不适和危害。

REFERENCES

- [1] ANGELIKI X, ANDREAS P, ANTONIS M, et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296(1): 181-187.
- [2] DAS M, RAM A, GHOSH B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice [J]. *Inflamm Res*, 2003, 52(3): 101-106.
- [3] FAN W H, HUANG M. Effects of luteolin on airway remodeling in asthmatic mice [J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2006, 10(9): 647-649.
- [4] NI J, DONG J C. Experimental study of the effect of components of three traditional Chinese medicines on airway allergic inflammation in guinea pigs with Bronchial Asthma [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2004, 10(4): 49-51.
- [5] HUANG F, TONG X Y, DENG H M, et al. Primary study on mechanism of baicalin on the Th1/Th2 response in murine model of asthma [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2009, 32(9): 1407-1410.
- [6] LI Y R, PAN H F, WEI H, et al. Recent research on Chinese herbal medicine Scutellaria [J]. *J Chengde Med Coll(承德医学院学报)*, 2009, 26(4): 418-420.
- [7] WANG B, GENG L Y, GUAN F E. Professor Zhaoqing Xi department of pediatric pulmonary clinical experience paste [J]. *J Emerg Syndromes Tradit Chin Med(中国中医急症)*, 2009, 18(10): 1641-1642.
- [8] XU S Y. *Pharmacological Experimental Method(药理实验方法学)* [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1359-1380.
- [9] LI N, ZHANG Z Z, WU M. Cigarette smoke-induced DNA damage and repair in two kinds of human lung interstitial cells [J]. *J Environ Health(环境与健康杂志)*, 2006, 23(2): 142-145.
- [10] NOURI-SHIRAZI M, GUINET E. A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma [J]. *Immunol Lett*, 2006, 103(2): 167-176.
- [11] LI X, YAO G M, DU R J, et al. Study of Chinese herbal medicine extraction in reducing harmful components of

- cigarette smoke [J]. J Henan Agri Sci(河南农业科学), 2008, (10): 51-55.
- [12] DAS M, RAM A, GHOSH B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice [J]. Inflamm Res, 2003, (52): 101-106.
- [13] XING W, YANG J R, DING B P, et al. Observation on expectorant action of traditional Chinese herb compound in the active smoking animal model [J]. J Wannan Med Coll(皖南医学院学报), 2005, 24(3): 176-178.
- [14] ZHANG Y P, CHEN D J, ZHANG G Q, et al. The application of Chinese herbal medicine in making less harmful Chinese cigarette [J]. Sci Technol Inf(科技信息), 2008, (11): 33-35.
- [15] XU Y, XIANG N J, MIAO M M, et al. Application of Chinese herbal additives in cigarette [J]. Yunnan Chem Technol(云南化工), 2007, 34(4): 67-75.
- [16] LI X L, TANG J F. Application overview of herbal in cigarette [J]. Tradit Chin Med Res(中医研究), 2008, (1): 2-3.

收稿日期: 2010-07-23