

良园枇杷膏对豚鼠气道收缩和炎症反应的作用

谢强敏 沈文会 陈季强 杨秋火 卞如濂(杭州 310031 浙江大学医学院国家药品监督管理局浙江呼吸药物研究实验室)

摘要 目的: 良园枇杷膏(下简称枇杷膏)是一个传统的镇咳祛痰复方中成药。本文旨在研究其对气道平滑肌的扩张和抗肺部过敏性炎症的作用。方法: 采用肺功能测定法、离体气管法观察枇杷膏的支气管扩张和抗过敏作用; 支气管肺泡灌流法观察抗炎作用。结果: 在整体试验中, 枇杷膏 7.5g/kg 和 15.0g/kg i.g 抑制致敏豚鼠抗原攻击后引起的肺阻力(R_L)增加和动态肺顺应性(C_{dyn})降低; 抑制支气管肺泡灌流中嗜酸性粒细胞增加, ID_{50} (95% 可信限)为 1.98(0.41~9.64)g/kg; 在离体试验中, 枇杷膏呈剂量依赖反应松弛豚鼠离体气管平滑肌, IC_{50} (95% 可信限)为 $1.23(0.97\sim 1.54)\times 10^{-4}g\cdot L^{-1}$; 抑制 Schultz-Dale 反应, ID_{50} (95% 可信限)为 $4.55(2.78\sim 7.42)\times 10^{-5}g\cdot L^{-1}$ 。结论: 枇杷膏具有支气管扩张和抗肺气道变态反应性炎症作用。
关键词 枇杷膏; 肺阻力; 动态肺顺应性; 嗜酸性粒细胞; 炎症; 气管平滑肌; 哮喘; 豚鼠

Effect of Liangyuan Pipagao on bronchoconstriction and inflammation in the sensitized guinea pig

Xie Qiangmin, Shen Wenhui, Chen Jiqiang, Yang Qiuho, Bian Rulian(*Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of State Drugs Administration of China, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310031, China*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** Liangyuan Pipagao (LYPPG) is a compound preparation of traditional Chinese medicine applied to antitussive and expectorant. The effect of the drug on bronchoconstriction and inflammation in the sensitized guinea pig were evaluated. **METHOD:** pulmonary mechanics changes in the ovalbumin-in-sensitized guinea pigs induced by ovalbumin in aerosol in vivo, Schultz-Dale reaction of the ovalbumin-in-sensitized trachea and isolated resting tracheal relaxing in guinea pigs in vitro were investigated. **RESULTS:** LYPPG 7.5 g/kg and 15.0 g/kg by ig remarkably prevented the alteration of lung resistance(R_L) and dynamic lung compliance (C_{dyn}) induced by antigen challenge, and 0.83g/kg, 2.5g/kg and 7.5g/kg by ig inhibited antigen-induced increase of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid of the sensitized guinea-pigs in vivo, ID_{50} value (95% confidence limits) = 1.98(0.41~9.64)g/kg. LYPPG relaxed the rest isolated tracheal smooth muscle in dose-dependent manner, IC_{50} (95% confidence limits) = $1.23(0.97\sim 1.54)\times 10^{-4}g\cdot L^{-1}$, and inhibited Schultz-Dale reaction in guinea pigs in vitro, ID_{50} (95% confidence limits) = $4.55(2.78\sim 7.42)\times 10^{-5}g\cdot L^{-1}$. **CONCLUSION:** These results indicated that LYPPG had a significant pharmacological effects on bronchodilatation and anti-allergy inflammation.

KEY WORDS Liangyuan Pipagao, lung resistance, dynamic lung compliance, eosinophil, inflammation, tracheal smooth muscle, asthma, guinea pig

枇杷膏是传统的镇咳祛痰中成药。我国市售的各种枇杷膏有数十种, 处方大同小异, 侧重于咳、痰方面为多, 如念慈庵蜜炼川贝枇杷膏有补肺、镇咳、祛痰之功效, 潘高寿蛇胆川贝枇杷膏、法半夏罗汉果川贝枇杷膏、强力枇杷露以润肺止咳为主^[1-3]。但至今为止大多数的枇杷膏没有进行过比较系统严格的药理学评价或评价使用的方法学不恰当, 难以肯定各种枇杷膏的药理作用及机制。本实验选择良园枇杷膏(下简称枇杷膏), 采用国际上公认的实验方法来评价其支气管扩张和抗炎作用。该方由麻黄、枇杷叶、甘草、芦根、桔梗、紫苑、陈皮、杏仁等中药组成, 具有清宣肺气, 化痰镇咳之功效。它与目前市售的枇杷膏处方有不同之处, 其他种类的枇杷膏组方中不含麻黄, 故该方以清宣肺气平喘为主, 因此本研究侧重于气道平滑肌的扩张和抗肺部变态反应性炎症方面。

1 材料

1.1 药物与试剂

良园枇杷膏(杭州正大青春宝药业有限公司, 批号: 990120), 盐酸沙丁胺醇(江苏盐城制药厂, 批号 980212), 卵白蛋白(Grade II; Sigma Chemical Company), 氢氧化铝凝胶、氨基甲酸乙酯(CR 级, 上海化学试剂公司, 批号 960122)。

1.2 动物

Hartley 品系豚鼠, 由浙江大学医学院实验动物中心提供, 合格证号: 浙实验动物实施条件准字 22-9601018。

1.3 仪器

计算机, PCLAB 生物信号采集处理系统 2.1.1 版(PCLAB 开发组), 402 型超声雾化器, 动物肺机械功能测定仪。

1.4 统计方法

用计算机和 Sigma Stat 软件包统计, 具体方法见结果中的表注或图注, ID_{50} , IC_{50} (95% 可信限)为权重直线回归法, 用 POMS 统计软件计算。

2 方法和结果

2.1 枇杷膏对致敏豚鼠抗原攻击后引起肺阻力(R_L)增高和动态肺顺应性(C_{dyn})降低的影响

2.1.1 致敏动物: 豚鼠体重(225.5 ± 35.0)g, ♀ ♂ 各半, 每鼠后腿部 im 卵白蛋白 10mg 和氢氧化铝凝胶 200mg, 3~4 周后实验。

2.1.2 分组和给药剂量: 将致敏豚鼠分为 4 组, 每组 8-10 只, ♀ ♂ 各半。即枇杷膏 7.5g/kg, 枇杷膏 15g/kg, 沙丁胺醇 4mg/kg, 生理盐水 4m l/kg 各 1 组, 于抗原攻击前 1 h 灌胃给药(ig)。

2.1.3 肺功能测定: 按我们以前报道的方法测定 R_L 和 C_{dyn} [4,5]。

2.1.4 抗原攻击: 1% (W/V) 卵白蛋白生理盐水溶液超声雾化吸入 1m in 后, 描记吸入后 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30m in 的 V_T , \dot{V} , 和 P_{ip} 以变化。

2.1.5 结果: 模型组 (0.9% NaCl 4m l/kg 于抗原攻击前 1h, ig) 在抗原攻击后 R_L 非常明显的增高, C_{dyn} 非常明显的降低, 1~10m in 变化最为明显, 10m in 后趋于逐渐恢复, 见图 1。枇杷膏 7.5g/kg 和 15g/kg 能明显抑制抗原攻击引起的 R_L 增高和 C_{dyn} 降低, 但其作用不及沙丁胺醇 4mg/kg (ig) 强。

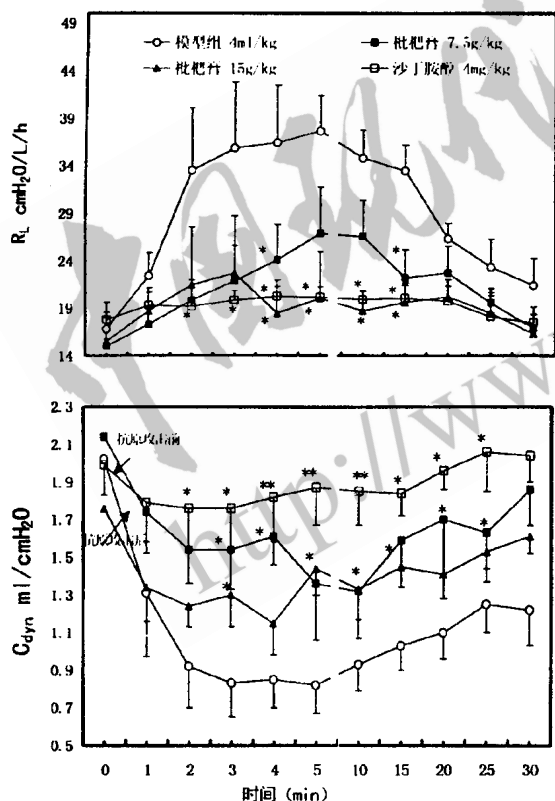


图 1 枇杷膏对致敏豚鼠抗原攻击后肺阻力(R_L)和肺顺应性(C_{dyn})变化的影响。

$n = 8 \sim 10$, $\bar{x} \pm s$; 统计方法: Dunnett's; 与生理盐水对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.2 枇杷膏对致敏豚鼠抗原攻击后引起呼吸道炎症的影响

2.2.1 致敏动物: 同前。

2.2.2 支气管肺泡灌流按文献 [6]: 将致敏豚鼠置于 -4L 玻璃

钟罩内, 用超声波雾化器气雾 1% 卵白蛋白 1m in, 豚鼠在此钟罩内继续吸入 1m in, 共 2m in。抗原攻击后的豚鼠经 24 h 后将产生支气管肺炎。24 h 后用氨基甲酸乙酯 1g/kg 给豚鼠 ip, 麻醉后切开颈部皮肤, 分离出气管, 切开气管, 插入气管插管, 用 1% 牛血清蛋白生理盐水溶液 12 m l, 分两次从气管插管注入气道, 每次来回冲洗 3 回, 冲洗液收集于试管内, 回收率约 70%~80% (8~10 m l)。

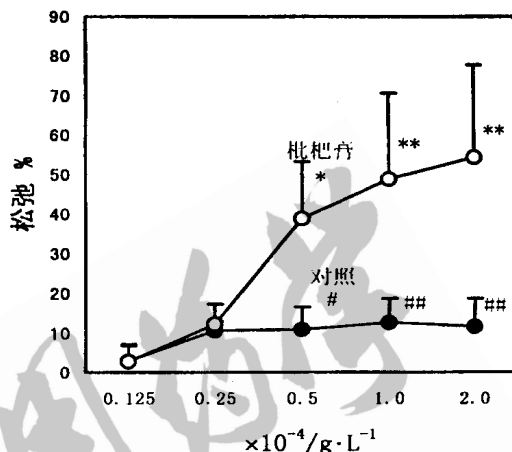


图 2 枇杷膏对豚鼠离体气管的松弛作用

以异丙肾上腺素 1×10^{-7} mol/L 松弛幅度为 100%, $n = 10$, $\bar{x} \pm s$; T-Test, 与枇杷膏浓度 0.25×10^{-4} g·L⁻¹ 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与枇杷膏组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

2.2.3 分组、给药剂量和时间: 将致敏豚鼠分为 4 组, 每组 6~7 只, ♀ ♂ 不拘。即枇杷膏 0.83, 7.5, 15 g/kg 和生理盐水 4 m l/kg 各 1 组, 于 1% 卵白蛋白气雾攻击前 1 h 预先给药 1 次(ig), 支气管肺泡灌流前 2 h 再给药 1 次。

2.2.4 白细胞计数和分类计数: 1% 冰醋酸 3: 1 稀释灌液, 用计数板在显微镜下计总数。将灌液涂于玻片上, 待干后用 Wright-Giemsa 染色液染色, 然后在油镜下分类计数。

2.2.5 结果: 模型组经 1% 卵白蛋白攻击后, 白细胞总数, 嗜酸性白细胞均有非常明显的增多(见表 1), 嗜酸性白细胞数目增多最为明显, 嗜中性粒细胞和淋巴单核细胞增加不明显。表明致敏豚鼠抗原攻击产生哮喘之后, 有一个非常明显的过敏性炎症反应过程。枇杷膏 2.5 g/kg 和 7.5 g/kg 能明显抑制致敏豚鼠抗原攻击后支气管肺泡灌流液中嗜酸性粒细胞增加和白细胞总数增加, 见表 1, 枇杷膏 3 个剂量的抑制% 分别为 36.5%, 59.5% 和 62.0%, ID_{50} (95% 可信限) 为 1.98 (0.41~9.64) g/kg。

2.3 枇杷膏对豚鼠离体气管平滑肌的影响

2.3.1 方法: 按报道的实验方法 [7], 取豚鼠, 350~450g, ♀ ♂ 不拘, 击毙后取出气管, 分 2 段, 每段切成 4 片, 串联后置 37℃ 含 KHPS 液水槽内, 通氧气, 气管静息张力为 1.0g, 张力反应通过换能器输入 PCLAB 生物信号采集处理系统。稳定 30~40m in 后, 以累积剂量加药法进行枇杷膏量效反应观察。反应停止后再加入异丙肾上腺素 1×10^{-7} mol/L, 使其达最大松弛反应。计算时以枇杷膏/异丙肾上腺素的最大松弛百分率作为指标。对照组加等量 KHPS 液进行反应观察。

表 1 枇杷膏对致敏豚鼠抗原攻击后支气管肺灌流液中炎症细胞的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

观察指标	模型组	枇杷膏	枇杷膏	枇杷膏
	(0.9% NaCl) 4ml/kg (n=7)	0.83g/kg (n=6)	2.5g/kg (n=6)	7.5g/kg (n=6)
白细胞总数($\times 10^8/L$)	5.197 \pm 1.607	4.452 \pm 0.994	3.538 \pm 0.951 *	3.458 \pm 1.226 *
嗜酸性粒细胞($\times 10^8/L$)	1.257 \pm 0.423	0.798 \pm 0.773	0.509 \pm 0.219 **	0.478 \pm 0.365 **
嗜中性粒细胞($\times 10^8/L$)	0.487 \pm 0.314	0.699 \pm 0.487	0.430 \pm 0.214	0.299 \pm 0.220
单核细胞($\times 10^8/L$)	3.472 \pm 1.378	2.966 \pm 0.500	2.644 \pm 0.874	2.602 \pm 1.024

注: 统计方法: Dunnett's, 与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 1% 卵白蛋白气雾攻击前预先给药 1 次(ig), 支气管肺灌流前 2h 再给药 1 次。

2.3.2 结果: 枇杷膏呈剂量反应松弛豚鼠离体气管平滑肌张力。IC₅₀(95% 可信限)为 1.23(0.97~1.54) $\times 10^{-4}$ g·L⁻¹, 结果见图 2。

2.4 枇杷膏对豚鼠离体气管 Schultz-Dale 反应的影响

2.4.1 方法: 致敏动物按文献^[7]。制备离体气管片同上。气管片置 37℃ 含 KHPS 液水浴槽内稳定 30~40min 后, 对照组加卵白蛋白 20 μ g/ml 进行抗原攻击, 反应停止后再加入 BaCl₂ 2 $\times 10^{-5}$ mol/L, 使其达最大收缩反应; 处理组先加入不同浓度枇杷膏与标本接触 5min, 再加入 20 μ g/ml 卵白蛋白, 反应停止后再加入 BaCl₂ 2 $\times 10^{-5}$ mol/L, 使其达最大收缩反应。计算时以卵白蛋白/BaCl₂ 的最大收缩百分率作为指标。观察枇杷膏对抗原攻击引起致敏豚鼠气管收缩反应的抑制作用。

2.4.2 结果: 枇杷膏呈剂量反应抑制抗原攻击引起致敏豚鼠气管收缩反应, ID₅₀(95% 可信限)为 4.55(2.78~7.42) $\times 10^{-5}$ g/L, 结果见表 2。

表 2 枇杷膏对豚鼠离体气管 Schultz-Dale 反应的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度/g·L ⁻¹	收缩幅度/g	抑制/%
对照	6		1.10 \pm 0.23	
枇杷膏	6	1 $\times 10^{-6}$	0.73 \pm 0.17	33.6
	6	1 $\times 10^{-5}$	0.51 \pm 0.13*	53.6
	7	2 $\times 10^{-5}$	0.31 \pm 0.09**	71.8

注: 统计方法: Dunnett's, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

目前市售的枇杷膏品种很多。虽然念慈庵蜜炼川贝枇杷膏、潘高寿蛇胆川贝枇杷膏、强力枇杷露经药理实验证明有平喘和抗炎作用^[1-3], 但实验设计、所用动物模型和试验方法比较简单, 如观察整体平喘试验用组胺诱发豚鼠哮喘时的跌倒反应(仅能代表该药有抗组胺作用), 如抗炎试验用二甲苯、角叉菜胶致炎(仅能代表抑制环氧酶作用), 而且也不是哮喘发病过程中的变态反应性炎症, 因此难以作出明确结论。本研究在整体试验中以抗原致敏豚鼠哮喘为模型, 采用肺功能测定 R_L 和 C_{dyn} 的变化, R_L 代表了大气道的功能变化, 反映大气道的收缩和阻塞情况, C_{dyn} 代表小气道(毛细支气管和肺泡)的功能变化, 反映小气道的收缩、阻塞和弹性情况。枇杷膏在抗原攻击前预先 ig 给药, 能明显预防抗原攻击后 R_L 和 C_{dyn} 的变化, 表明其对大小气道均有明显作用, 但对小气道的作用略强于对大气道的作用。另采用抗原攻击后致敏

豚鼠气管平滑肌收缩反应(Schultz-Dale)试验法, 观察到了枇杷膏在离体情况下对抗原攻击引起的收缩反应的拮抗作用。还用正常豚鼠的离体气管平滑肌作标本, 证明了良园枇杷膏对气管平滑肌的直接松弛作用。上述三个结果肯定了良园枇杷膏的支气管扩张作用和抗变态反应作用。此外, 在抗炎作用研究方面直接采用了抗原攻击致敏豚鼠引起的支气管肺炎细胞聚集模型, 通过支气管肺灌洗法证明了枇杷膏能显著抑制引起哮喘的主要炎症细胞—嗜酸性粒细胞在气道内聚集。嗜酸性粒细胞能分泌释放多种神经毒素和细胞毒性蛋白颗粒, 引起气道上皮和肺组织的广泛性损伤, 导致气道上皮剥离和支气管高反应性^[8,10]。气道嗜酸性粒细胞炎症模型已成为研究哮喘病理的最重要的动物模型。

上述结果表明, 良园枇杷膏具有支气管扩张、抗炎和抗变态反应作用。

参考文献

- 李泽琳, 戴宝强, 梁爱华, 等. 念慈庵蜜炼川贝枇杷膏药理作用研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(6): 362.
- 李锐, 廖雪珍, 廖惠芳, 等. 潘高寿蛇胆川贝枇杷膏与进口同类品药效学对比实验研究[J]. 中成药, 1992, 14(8): 30.
- 李方莲, 罗瑞祥. 法半夏罗汉果川贝枇杷膏与强力枇杷露药理作用的比较研究[J]. 中国药房, 1997, 8(1): 15.
- 杨秋火, 谢强敏, 卞如瀛. 药物对豚鼠 P_{1P}-V_T 及 P_{1P}-V_T 曲线的影响[J]. 浙江医科大学学报, 1981, 10(5): 224.
- XIE Qiang-M in, ZENG Ling-Hui, ZHENG Yi-Xiong, et al. Bronchodilating effects of bambuterol on bronchocontraction in guinea pigs[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1999, 20(7): 651.
- Devalia JL, Rusznak C, Abdelaziz AM, et al. Nedocromil sodium and airway inflammation in vivo and in vitro[J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98(5Pt2): S51.
- 谢强敏, 卞如瀛, 杨秋火, 等. 艾叶油的呼吸系统药理研究 I, 支气管扩张、镇咳和祛痰作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(4): 16.
- 谢强敏, 唐法锦, 王视, 等. 艾叶油的呼吸系统药理研究 II, 抗过敏作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 1999, 16(5): 18.
- Gleich GJ. Eosinophil granule protein and bronchial asthma[J]. Allergy International, 1996, 45(1): 35.
- Kay AB, Barata L, Meng Q, et al. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113(1-3): 196.

收稿日期: 2001-06-07