

固本宣肺化痰粗提物对阳虚小鼠止咳平喘抗炎作用研究

武鸿翔¹⁾, 吴文笛²⁾, 刘汝文³⁾, 游顶云¹⁾, 郭美华¹⁾, 沈志强⁴⁾

(1) 昆明医科大学科技处, 云南 昆明 650500; 2) 昆明市中医医院, 云南 昆明 650021; 3) 昆明医科大学动物学部, 云南 昆明 650500; 4) 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究固本宣肺化痰粗提物 (GBXF) 对阳虚模型小鼠的止咳、平喘和抗炎作用. **方法** 采用腹腔注射氢化可的松复制阳虚小鼠模型, 应用二甲苯致小鼠耳廓肿胀、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加、氨水引咳法、卵白蛋白致喘法, 观察固本宣肺化痰粗提物的止咳、平喘、抗炎作用. **结果** 与模型对照组相比, 中、高剂量的固本宣肺化痰粗提物可明显减轻二甲苯致小鼠耳廓肿胀度、降低腹腔液的吸光度、明显延长浓氨水所致小鼠咳嗽的潜伏期并减少咳嗽次数, 高剂量的固本宣肺化痰粗提物明显延长卵白蛋白诱发小鼠抽搐的潜伏期. **结论** 固本宣肺化痰粗提物对阳虚小鼠具有明显的抗炎、止咳和平喘作用.

[关键词] 固本宣肺化痰粗提物; 阳虚; 止咳平喘; 抗炎

[中图分类号] R961.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0020 - 05

The Efficacy of Gubengxuanfei Crude Extract on Relieving Cough, Asthma and Anti-inflammation in Yang Deficiency Model Mice

WU Hong-xiang¹⁾, WU Wen-di²⁾, LIU Ru-wen³⁾, YOU Ding-yun¹⁾, GUO Mei-hua¹⁾, SHEN Zhi-qiang⁴⁾

(1) Dept. of Science and Technology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Internal Medicine, Kunming Traditional Chinese Medicine Hospital, Kunming Yunnan 650021; 3) Dept. of Laboratory Animal, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 4) School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500)

[Abstract] **Objective** To study the effects of Gubengxuanfei (GBXF) crude extract on relieving cough and asthma and anti-inflammation in yang deficiency model mice (mice lack of vital energy). **Methods** Yang deficiency model mice were duplicated by intraperitoneal injection of hydrocortisone. The anti-inflammatory effects were investigated with the observation of dimethylxylene-caused mouse ear swelling and the permeability of abdominal capillary in mice respectively. The models of cough and asthma in mice were formed with the use of ammonia water and ovalbumin respectively. **Results** Compared with model group, the middle and high doses of GBXF significantly relieved the dimethylxylene-caused mouse ear swelling, decreased the permeability of capillary and prolonged the mice coughing latent period frequently induced by stronger ammonia water. High dose of GBXF significantly prolonged spasm latent period induced by ovalbumin. **Conclusion** Studies indicate that GBXF has a significant effect on relieving cough and asthma and anti-inflammation to yang deficiency model mice.

[Key words] Gubengxuanfei crude extract; Yang deficiency; Relieving cough and asthma; Anti-inflammation

[基金项目] 云南省教育厅科研基金重点资助项目 (07C I0019)

[作者简介] 武鸿翔 (1968~), 男, 云南昆明市人, 药理学硕士, 副教授, 主要从事中医临床及中药药理研究工作.

[通讯作者] 沈志强. E-mail:704896604@qq.com

固本宣肺化痰汤由川附片、麻黄、杏仁等 10 余味中药组成, 是云南名中医吴佩衡教授的经验方, 对中医辨证属寒证的急慢性气管炎、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等呼吸系统疾病有显著疗效. 呼吸系统感染在临床中多伴有咳嗽、气喘等症状, 对证属寒证的此类疾病, 患者往往表现有形寒肢冷、入秋冬诱发、气温降低症状加重的阳虚表现. 本研究参照固本宣肺化痰汤的临床煎煮方法, 按固定的工艺制备固本宣肺化痰粗提物 (gu beng xuan fei hua tan crude extract, GBXF), 复制阳虚小鼠模型, 设计抗炎止咳平喘实验, 从药效学角度验证复方中药治疗呼吸系统疾病的临床效果, 为进一步研究及应用提供药理学实验依据.

1 实验材料

1.1 试验药物

将固本宣肺化痰汤分 2 次按组成药物总重量的 10 倍、8 倍质量用自来水煮提, 每次 30 min, 煎液用多层纱布过滤, 合并滤液放置沉降过夜, 取上清液浓缩至每 1 mL 相当于原药物重量 1 g, 自然冷却后加入 95% 乙醇充分搅拌至含醇量达 70%, 放置过夜, 滤取上清, 回收乙醇并浓缩至无醇味, 加新鲜蒸馏水制得 1:8 棕色流浸膏 (8 kg 生药量/L), 冷藏备用, 由昆明市中医医院制剂室提供. 试验中的剂量均以生药计算. 阿司匹林结晶购自 Sigma 化学公司. 桂龙咳喘宁胶囊 [桂龙药业 (安徽) 有限公司, 规格: 0.3 g/粒, 批号: 101009]; 痰咳净散 (广州羊城药业股份有限公司, 规格: 6 g/盒, 批号: 100809).

1.2 实验动物

清洁级昆明小鼠, 4 月龄, 雌雄各半, 体重 32~38 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供 (合格证号: SCXK 滇 2005-0008).

1.3 药品与试剂

氢化可的松注射液 (批号: 10081609, 规格: 10 mg/2 × 10⁻³ L, 上海现代哈森 (商丘) 药业有限公司); 二甲苯购自武汉有机合成工厂, 规格: 500 mL/瓶, 分析纯; 伊文思蓝, 规格: 10 g/瓶, 批号: F20030714, 中国医药集团上海化学试剂公司 (进口分装); 浓氨水, 规格: 500 mL/瓶 (25-28%), 批号: 040716, 广东汕头市西陇化工厂产品. 卵白蛋白 (Sigma, 批号: A8040), Al(OH)₃ (西陇化工股份有限公司, 批号 100912), 吸附无细胞白百破联合疫苗 (长春生物制品研究所), 批

号: 20111001.

1.4 仪器

LIBROR AEG-220 型精密电子秤, 日本岛津公司产品; Centra?MP4R 型离心机, IEC 公司生产; “721”型分光光度计, 上海分析仪器厂生产.

1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计软件包进行统计分析. 所获得的数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用完全随机设计的单因素方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 阳虚证模型复制

参照文献方法^[1], 昆明小鼠, 雌雄各半, 体重 32~38 g, 每日腹腔注射氢化可的松, 25 mg/kg, 连续 12 d. 正常饲养, 并观察、记录小鼠的行为表现. 动物出现毛不光洁或脱毛、拱背蜷缩、消瘦、尾冷、局部皮肤破溃、肢凉、便秘、反应迟钝等表现, 类似人类“阳虚证”证候, 为造模成功. 对小鼠体征的影响一般状态观察 模型复制期间观察动物的一般状态, 小鼠从实验第 2 天起开始出现好动易怒、精神亢奋、喜追逐撕咬等现象; 第 6 天开始出现竖毛、身体蜷缩、扎堆、眯眼或闭眼、进食和饮水量减少, 大便稀等现象; 第 10 天阳虚证症状更加明显, 皮毛枯燥松弛, 身体瘦削, 喜蜷缩扎堆, 弓背少动, 反应迟钝, 行动迟缓, 叫声低而无力, 大便稀, 雄鼠阴茎脱出等, 与文献报道一致, 说明阳虚证模型复制成功.

2.2 分组

阳虚模型小鼠, 雌雄各半, 体重 30~35 g, 随机分成 5 组, 每组 12 只, 即等体积的 0.9% 氯化钠注射液组, 1.2、2.4、4.8 g/kg 的固本宣肺化痰粗提物组 (相当于成人临床用量的 1、2 和 4 倍) 和阳性对照组.

2.3 固本宣肺化痰粗提物的抗炎作用

2.3.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响^[2] 阳性对照药用 0.2 g/kg 阿司匹林. 试验各组按 0.1 mL/10 g 体重灌胃给药, bid, 连续 7 d. 末次给药后 45 min 用微量加样器吸取二甲苯 (0.05 mL/只) 滴于小鼠右耳, 15 min 后处死动物. 用直径 9 mm 的打孔器沿左右耳廓相同部位打孔取材. 分别称重, 以两耳片重差值作为肿胀程度指标. 结果表明, 与空白对照比较, 中、高剂量的 GBXF 可明显减轻二甲苯致小鼠耳廓肿胀度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见

表 1.

2.3.2 对腹腔毛细血管通透性的影响^[2] 阳性对照药用 0.2 g/kg 阿司匹林. 各组动物均以 0.1 mL/10 g 体重灌胃, bid, 连续 7d. 末次给药 45 min 后, 0.5%伊文思蓝以 0.2 mL/只尾静脉注射并及时腹腔注射 0.7%醋酸 0.2 mL/只, 15 min 后处死动物, 腹腔注射 0.9%氯化钠注射液 5 mL, 轻揉后抽取腹腔液, 室温下 3 000 r/min 离心 20 min, 上清液于 590 nm 处测定其 OD 值. 结果表明与 0.9%氯化钠注射液组比较, 中、高剂量的 GBXF 可明显降低腹腔液的吸光度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2.

2.4 对浓氨水引咳的影响^[3]

阳性对照药用 0.4 g/kg 痰咳净. 各组动物均以 0.1 mL/10 g 体重灌胃, 1 次/d, 连续 14 d. 参照文献方法于末次给药 60 min 后, 将小鼠逐个放入 500 mL 玻璃钟罩内, 通过空气压缩机连接玻璃喷雾头, 以 400 mmHg 恒压将氨水 (25% ~ 28% 氢氧化铵) 均匀地喷入钟罩内, 喷入浓氨水气雾 5 s, 观察和记录小鼠的咳嗽潜伏期 (小鼠咳嗽的判断以剧烈收

缩腹肌并张嘴为准, 时可听到轻微的咳嗽声) 和 2 min 内的咳嗽次数. 结果表明, 与 0.9%氯化钠注射液组比较, 中、高剂量的 GBXF 可明显延长咳嗽潜伏期并减少咳嗽次数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 3.

2.5 小鼠平喘试验^[4]

阳性对照药用 0.6 g/kg 桂龙咳喘宁胶囊组. 小鼠腹腔注射抗原液 1 mL (1 mL 生理盐水中含卵白蛋白 100 mg, 氢氧化铝干粉 100 mg, 灭活百日咳杆菌疫苗 5×10^9 cfu) 致敏. 各组动物从抗原注射后次日起, 以 0.1 mL/10 g 体重灌胃, 1 次/d, 连续 14 d. 实验第 15 g, 将模型小鼠置于半密闭钟罩内, 通入 1%卵白蛋白雾化吸入, 激发 20 min, 记录引喘潜伏期. 超过 20 min 未出现哮喘的以 20 min 计算. 喘息指标为呼吸急促、节律不齐、瘫痪、死亡. 结果显示, 与 0.9%氯化钠注射液组比较, 高剂量的 GBXF 明显延长小鼠抽搐潜伏期 ($P < 0.01$), 见表 4.

表 1 固本宣肺化痰粗提物对二甲苯致阳虚小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of GBXF on ear swelling induced by dimethylxylene in yang-deficiency mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	肿胀度 (mg)
0.9%氯化钠注射液	12	等体积	24.8 ± 6.62
固本宣肺化痰粗提物	12	1.2	23.2 ± 5.89
	12	2.4	13.2 ± 5.53*
	12	4.8	9.2 ± 3.20**
阿司匹林	12	0.2	8.4 ± 3.43**

与 0.9%氯化钠注射液组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 固本宣肺化痰粗提物对阳虚小鼠毛细血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of GBXF on the permeability of capillary in yang-deficiency mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	吸光度 (590 nm 处)
0.9%氯化钠注射液	12	等体积	0.461 ± 0.112
固本宣肺化痰粗提物	12	1.2	0.385 ± 0.050
	12	2.4	0.308 ± 0.092*
	12	4.8	0.245 ± 0.059**
阿司匹林	12	0.2	0.238 ± 0.045**

与 0.9%氯化钠注射液组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 固本宣肺化痰粗提物对浓氨水诱发阳虚小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Effects of GBXF on concentrated ammonia-induced cough in yang-deficiency mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	咳嗽潜伏期(s)	2 min 内咳嗽次数
0.9%氯化钠注射液	12	等体积	21.4 ± 7.76	54.8 ± 8.17
固本宣肺化痰粗提物	12	1.2	23.7 ± 6.87	60.3 ± 7.73
	12	2.4	45.1 ± 13.51	31.4 ± 7.53*
	12	4.8	60.1 ± 9.14*	31.0 ± 4.74*
痰咳净	12	0.4	59.3 ± 15.8*	30.7 ± 6.77*

与 0.9%氯化钠注射液组比较, * $P < 0.05$.

表 4 固本宣肺化痰粗提物对致敏的阳虚小鼠喘息潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 4 Effects of GBXF on ovalbumin - induced asthma in yang-deficiency mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	抽搐潜伏期 (s)
0.9%氯化钠注射液	12	等体积	60.0 ± 60.85
固本宣肺化痰粗提物	12	1.2	71.6 ± 47.75
	12	2.4	87.3 ± 38.21
	12	4.8	189.8 ± 88.00**
桂龙咳喘宁胶囊	12	0.6	174.3 ± 133.73**

与 0.9%氯化钠注射液组比较, ** $P < 0.01$.

3 讨论

COPD 主要临床表现为咳嗽、咯痰、呼吸困难, 在病程中常出现急性加重。除了吸烟、空气污染、职业性粉尘和化学物质等因素之外, 呼吸道感染是 COPD 发病和病情加剧的一个重要因素^[9], 因此针对呼吸道感染的治疗是着手预防治疗 COPD 尤其是急性加重的关键。目前常用的治疗药物有: 糖皮质激素、抗生素等^[6,7]。但是, 随着抗生素的广泛应用, 特别是临床上对多种广谱、高效抗生素的滥用, 导致 COPD 伴下呼吸道感染的致病菌耐药菌株不断增多^[8], 不但增加了治疗的难度也增加了治疗的成本, 而长期使用激素的不良反应更是众所周知。因此, 从祖国医学中探索治疗 COPD 方法和药物不失为一个明智的途径。

呼吸道感染多属中医咳嗽范畴, 常见咳嗽、咯痰、呼吸不畅等症状, 中医认为外邪侵肺或脏腑功能失调痰饮伏邪为患, 致肺失清肃, 气机升降失常是本病的病因病机。正如《医学三字经》所说: “肺为脏腑之华盖, 呼之则虚, 吸之则满, 只受得本脏之正气, 受不得外来之客气, 客气干之则呛而咳矣; 亦只受得脏腑之清气, 受不得脏腑之病气, 病气干之, 亦呛而咳矣。” 因此, 中医有外感内伤咳嗽之辨, 针对不同的病理阶段, 施以宣肺化痰、降气平喘、调节脏腑、固本培源等治法, 最终达到止咳的目的。

李建生等^[9]通过对 8 所医院 COPD 稳定期患者资料进行统计分析, 认为: COPD 稳定期常见病性证素为气虚、血瘀; 病位在肺脾肾。气虚主要表现为肺气虚、脾气虚、肾气虚, 且贯穿始终。唐氏认为抓住“痰”、“瘀”、“虚”的本质, 中西医结合治疗急性加重期可取得显著疗效^[10]。

《黄帝内经·五变》以木的坚脆衰荣来说明“一时遇风, 同时得病, 其病各异”的原因, 正是因为人体寒热阴阳体质的不同而出现了疾病表现的差异, 对于阳虚体质的患者, 在风寒外邪侵袭时往往寒化的居多, 内伤咳嗽也多见寒证, 因此治疗须重视温阳散寒。翁燕娜等^[11]认为采用温补肾阳法对 COPD 呼吸衰竭患者进行干预, 从而有助于呼吸机撤机的实现。麻黄附子细辛汤是《伤寒论》治疗少阴表证的名方, 云南名中医吴佩衡老先生在此基础上加味而成固本宣肺化痰汤, 是治疗阳虚阴寒内伏所致咳嗽的经验方。本方以附子温阳散寒为君药, 上助心阳、中温脾阳、下补肾阳, 通行十二经, 能追复散失之元阳^[12], 通过对人体心、脾、肾脏腑功能的调理, 达到标本同治的目的, 是治疗阳虚阴寒证的首选药物。再配伍麻黄、杏仁等宣肺降气化痰, 川芎、丹参等行气化瘀, 白术、茯苓等健脾祛湿, 达到温阳益气、活血祛瘀、宣肺化痰止咳平喘的疗效。

呼吸道感染多伴随着气道、肺实质和肺血管的炎症的发生, 炎症反应诱发肺实质的破坏, 损

伤正常的修复和防御机制。这些病理学改变导致气体陷闭和进行性气流受限,诱发呼吸困难和 COPD 的其他症状^[3],因此抗炎是对 COPD 呼吸道炎症必需的对症治疗。本课题设计氢化可的松复制阳虚模型以体现 GBXF 对虚寒证的辨证论治特点,以抗炎、止咳、平喘等试验评价 GBXF 的药理作用。结果表明:GBXF 能明显降低阳虚小鼠耳廓肿胀和毛细血管通透度,初步验证 GBXF 对急性炎症的抑制作用。在浓氨水引咳试验中,低剂量组咳嗽次数反较空白对照组为多,但这一现象与临床用药中,患者服用第一、二剂汤药时表现的咳嗽增加相似,虽然咳嗽增加,但伴随咯痰增多,患者逐渐感到呼吸通畅而最终达到止咳。在小鼠平喘试验中,高剂量的 GBXF 明显延长小鼠抽搐潜伏期而表现出平喘作用,中剂量有延长小鼠抽搐潜伏期的趋势,且该实验结果的标准差较大,其原因可能与采用小鼠作为实验动物,以抽搐潜伏期为指标有关,在今后的试验设计中,应以豚鼠或大鼠为佳,或者采用其它生化指标可更好地反映药物的平喘作用。

通过试验,证实宣肺化痰汤治疗 COPD 药理学基础与其抗炎、排痰、止咳平喘综合作用有关,其药理学机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 郝志红,张剑宇,赵思俊. 补肾方对肾阳虚模型小鼠影响的实验研究[J]. 山西中医,2008,24(3):42-44.
- [2] 王思农,裴文涛,张小元,等. 古墨膏抗炎作用及其机制的实验研究[J]. 上海中医药大学学报,2010,24(2):58-61.
- [3] 刘婷,秦彩玲,张毅,等. 5个不同产地半夏镇咳作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(9):35-37.
- [4] 傅炎,陈一强,温红侠,等. 支气管哮喘大鼠CD4+CD25+ T细胞的变化及地塞米松干预作用的研究[J]. 中华哮喘杂志(电子版),2010,4(3):186-190.
- [5] 钟南山. 慢性阻塞性肺疾病在中国[J]. 中国实用内科杂志,2011,31(5):321-322.
- [6] 罗勇. COPD早期药物干预和非常规药物治疗进展及热点扫描[J]. 临床误诊误治,2012,25(8):8-11.
- [7] 王海峰,李建生,余学庆,等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期治疗及结局指标的系统评价[J]. 中国老年学杂志,2012,32(14):2911-2915.
- [8] 樊春月,吴斌. COPD下呼吸道感染主要致病菌种耐药现状[J]. 临床肺科杂志,2008,13(1):59-61.
- [9] 李建生,王至婉,王明航,等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期肺功能与证素及基础证分布规律的相关性研究[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报),2011,26(7):1500-1503.
- [10] 唐彬,王志祥,叶勇,等. 从痰、瘀、虚论治慢性阻塞性肺疾病急性加重期[J]. 中国中医急症,2012,21(9):1451-1453.
- [11] 翁燕娜,韩云,赖芳. 温补肾阳法对COPD呼吸机械通气撤机的理论探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2012,18(8):905-906.
- [12] 黄兆胜. 中药学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2002:225-228.
- [13] 柳涛,蔡柏蔷. 慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略(2011年修订版)介绍[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2012,11(1):1-12.

(2013-04-13 收稿)