

董琳琳, 闫慧敏, 丰晨然, 等. 痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 50-58.

Dong LL, Yan HM, Feng CR, et al. Anti-asthmatic, antitussive and expectorant effects of the Tanchuaning mixture [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 50-58.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.008

痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用研究

董琳琳^{1#}, 闫慧敏^{2#}, 丰晨然¹, 石璐¹, 苗丰¹, 赵一颖¹, 陈芳²,
孙文燕^{1*}, 郝静^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院中药药理系, 北京 102488;

2. 国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院中医科, 北京 100045)

【摘要】 目的 研究痰喘宁合剂平喘、镇咳、祛痰作用。**方法** 采用卵蛋白所致大鼠哮喘模型, 观察大鼠气道阻力(R_L)的变化, 运用 ELISA 法检测分析各组大鼠血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平, 并在镜下进行实验大鼠肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) WBC 及 EOS 计数, HE 染色观察肺组织病理变化并对其进行评分。采用氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠, 观察痰喘宁合剂的平喘作用。采用氨水引咳小鼠、枸橼酸引咳豚鼠, 观察痰喘宁合剂的镇咳作用。采用小鼠气管段酚红排泌量实验, 观察痰喘宁合剂的祛痰作用。**结果** 痰喘宁合剂可降低哮喘大鼠气道阻力, 降低血清 IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平, 减少 BALF 中 WBC 及 EOS 数量, 改善肺组织损伤情况, 延长豚鼠引喘潜伏期 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 延长豚鼠及小鼠咳嗽潜伏期, 减少咳嗽次数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 增加酚红排泌量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 痰喘宁合剂具有平喘、镇咳、祛痰作用。

【关键词】 痰喘宁合剂; 平喘; 镇咳; 祛痰

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 01-0050-09

Anti-asthmatic, antitussive and expectorant effects of the Tanchuaning mixture

DONG Linlin^{1#}, YAN Huimin^{2#}, FENG Chenran¹, SHI Lu¹, MIAO feng¹, ZHAO Yi ying¹,
CHEN Fang², SUN Wenyan^{1*}, HAO Jing^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. National Center for Children's Health, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100045)

【Abstract】 Objective To investigate the anti-asthmatic, anti-tussive, and expectorant effects of Tanchuaning mixture. **Methods** An Asthma model in rats was established by sensitization and challenge with ovalbumin (OVA) and then airway resistance (R_L) was observed. Serum levels of IgE, IL-4, IL-17, and TNF- α were analyzed by ELISAs. The numbers of WBCs and EOSs in BALF of rats were counted and HE staining of lung tissue was performed to observe

【基金项目】 闫慧敏全国名老中医药专家传承工作室 (国中医药人教发[2016]42 号)。

【作者简介】 董琳琳 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药抗炎与免疫药理研究。E-mail: 1726376728@qq.com

闫慧敏 (1954—), 女, 本科, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 小儿疾病的中西医结合诊治。

E-mail: huiminyan@sina.com

[#]共同第一作者

【通信作者】 孙文燕 (1970—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药防治免疫性疾病的药理学研究及中药毒理学研究。

E-mail: sunwy@bucm.edu.cn

郝静 (1972—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 小儿疾病的中西医结合诊治。E-mail: haojing115@sina.com

^{*} 共同通信作者

pathological changes. Methacholine chloride and histamine phosphate were used to induce asthma in guinea pigs to observe the anti-asthmatic effect of Tanchuanning mixture. The anti-tussive effect of Tanchuanning mixture was observed in a cough mouse model induced by ammonia and guinea pig model induced by citric acid. A phenol red excretion test in the tracheas of mice was used to observe the expectorant effect of Tanchuanning mixture. **Results** Tanchuanning mixture reduced airway resistance, decreased IgE, IL-4, IL-17, TNF- α levels in serum and the number of WBCs and EOSs in BALF, and alleviated lung tissue damage in asthmatic rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Tanchuanning mixture prolonged asthma and cough latencies in guinea pigs and mice, respectively, reduced the cough times in mice, and increased phenol red excretion in mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** Tanchuanning mixture has obvious anti-asthmatic, anti-tussive, and expectorant effects.

【Keywords】 Tanchuanning mixture; anti-asthmatic effect; anti-tussive effect; expectorant effect

咳嗽是儿童常见多发病,多伴有咳痰、喘息等表现,往往反复发作,难以根治。该病病理表现多以慢性气道炎症、气道高阻力为主,易受吸烟及环境中的过敏原或生活污染物影响^[1]。痰湿蕴肺型咳嗽在临床中较为常见,中医理论认为其主要病因是阴虚肺热,脾肾亏虚^[2]。痰喘宁合剂为北京儿童医院的院内制剂,用于痰湿蕴肺型患儿有确切临床疗效^[3],而对其药效尚缺乏系统研究。本研究分别采用卵蛋白所致过敏性哮喘大鼠模型、氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠模型、氨水引咳小鼠模型、枸橼酸引咳豚鼠模型、小鼠气管段酚红排泄量实验,观察痰喘宁合剂的平喘、镇咳、祛痰作用,以期为其临床合理应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 5 周龄(体重 130~150 g) 84 只,SPF 级 ICR 小鼠 4 周龄(体重 14~16 g) 144 只,均雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。SPF 级豚鼠 4 周龄 132 只,体重 200~230 g,雌雄各半,购自于北京科宇动物养殖中心[SCXK(京)2018-0010]。实验前适应性饲养 7 d,实验期间,保持动物房室温在 $(21 \pm 5)^\circ\text{C}$,相对湿度为 40%~70%,光照条件设置为 12 h/12 h 明暗交替。实验大鼠自由进食,自由饮水。所有涉及动物的相关实验程序均已经过北京中医药大学学术委员会实验动物伦理小组委员会批准(bucm-4-20190611-2045),大鼠、小鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级动物实验室[SYXK(京)2016-0038],豚鼠饲养于中国中医科学院中药安全评价实验室[SYXK(京)2016-0013],并经过中国中医科学院中药研究所动物实验福利伦理审查通过(20193004)。实验过程中所有操作均符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

痰喘宁合剂(北京儿童医院);卵蛋白(Sigma,批号:SLBV7493);注射用氢氧化铝凝胶(Pierce,批号:SH255260);磷酸组胺,氯化乙酰甲胆碱(Bioruler,批号分别为:3410,r621712);醋酸地塞米松(天津力生制药股份有限公司,批号:20170401);氨溴特罗(北京韩美药品有限公司,批号:H20040317);小青龙合剂(西安天一秦昆制药有限公司,批号:180306);10%中性缓冲福尔马林固定液,Harris 苏木素,0.5%伊红,中性树胶封片剂(北京益利精细化学品有限公司);Rat IgE、IL-4、IL-17、TNF- α ELISA 试剂盒(瑞格博,批号分别为:20200129.60139R、20200129.60021R、20200129.60032R、20200129.60080R);瑞氏吉姆萨染色液(南京建成);枸橼酸,酚红(Salarbio,批号分别为:126E041,1211C031);氨水(北京化工厂,批号:20141008)。

402A、B 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司);Buxco 实验动物气道阻力和肺顺应性有创检测仪器(美国 Buxco 公司);移液器(美国 Eppendorf 公司);台式离心机,低温水平高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司);Tissue-TEK VIP6 生物组织脱水仪、Tissue-TEK TEC 生物组织包埋仪(日本樱花公司);Leica RM2235 组织切片仪、Leica HI1210 捞片机、Leica HI1220 烤片机、Leica ST5020 自动染色仪、Leica CV5030 自动封片机(德国莱卡公司);Olympus BX53 显微镜(美国奥林帕斯公司);Path QC 病理质控和资料管理系统(中国朗珈公司);酶标仪(美国 Epoch, BioTek 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 痰喘宁合剂平喘作用研究

(1) 卵蛋白(OVA)所致哮喘大鼠实验

将 SD 大鼠随机分为 7 组^[4]:正常组、模型组、痰喘宁合剂低剂量组(7.5 mL/kg)、痰喘宁合剂中

剂量组(15 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(30 mL/kg)、醋酸地塞米松组(0.55 mg/kg)、小青龙合剂组(4 mL/kg)。每组 12 只,雌雄各半。除正常组外,其余动物建立哮喘大鼠模型:于实验第 1 日、第 8 日在大鼠的腹腔、两腹股沟注射每 mL 含 10 mg OVA、100 mg AL(OH)₃ 的混悬液,注射剂量为(腹腔 0.5 mL,两腹股沟各 0.25 mL),正常组注射相同体积的生理盐水。实验第 15 天,各组按剂量灌胃,正常组及模型组给予生理盐水。模型组和各给药组在给生理盐水或相应药物 1 h 后用 1% OVA 雾化激发 30 min,正常组则用生理盐水代替,连续 7 d。于末次激发 24 h 后,大鼠麻醉,仰面固定,气管插管,置于密闭体描箱内,肺功能仪系统辅助呼吸。等待大鼠气道阻力基线稳定,滴加不同浓度的氯化乙酰甲胆碱 20 μ L(0、6.25、12.5 和 50 mg/mL),雾化 30 s,记录 3 min,检测气道阻力(R_L)。将大鼠从密闭体描箱取出,腹主动脉取血,室温静置 2 h 后,4℃,3000 r/min 离心 10 min,ELISA 法检测血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 的含量。分别将 2 mL、2 mL、1 mL 生理盐水于气管插管处缓慢注入,停留约 10 s 后,缓慢抽回,收集灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),4℃,1500 r/min 离心 10 min,取沉淀用 0.2 mL PBS 混悬,瑞氏染色,用于 WBC 及 EOS 计数。取出大鼠右肺下叶组织,将其置于 10% 福尔马林固定液中,进行常规石蜡包埋并切片,HE 染色,光学显微镜下观察右肺下叶组织病理变化,并进行支气管及周围炎症评分。根据其病变的严重程度半定量为:无病变,记 0 级,为 0 分;轻度,记 I 级,为 1 分;中度,记 II 级,为 2 分。

HE 染色步骤如下:二甲苯溶液 I、II 浸泡各 15 min 脱蜡;100% 乙醇溶液 I、II 浸泡 5 min;95%、85%、75% 梯度乙醇溶液浸泡,各 5 min;苏木素染液染色 5 min,水洗;盐酸乙醇溶液分化 2~3 s,水洗;氨水溶液浸泡返蓝 1 min,水洗;伊红染液染色 5 min;75%、85%、95% 梯度乙醇溶液浸泡,各 5 min;100% 乙醇溶液 I、II 浸泡,各 5 min;二甲苯溶液 I、II 浸泡,各 5 min;中性树胶封片。

(2) 氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠实验

将豚鼠置于雾化器内^[5],以 2% 氯化乙酰甲胆碱与 0.1% 磷酸组胺等体积混合液定量恒压喷雾 10 s,记录 2 min 内豚鼠从接受喷雾开始到出现喘息性抽搐,直至跌倒的潜伏期。引喘潜伏期超过 120 s 者舍弃不用。将筛选出的豚鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(8.4 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(16.8 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(33.6

mL/kg)、氨溴特罗组(4.5 mL/kg)、小青龙合剂组(4.5 mL/kg),每组 10 只,雌雄各半。各组按剂量灌胃,模型组灌胃等量生理盐水,连续 7 d。末次给药 1 h 后,用上述方法测定各组豚鼠引喘潜伏期。

1.3.2 痰喘宁合剂镇咳作用研究

(1) 枸橼酸引咳豚鼠实验

将豚鼠置于雾化器内^[6],以 17.5% 的枸橼酸雾化 1 min,并持续刺激 4 min,测定 5 min 内豚鼠的咳嗽次数,小于 10 次者舍去。将筛选合格的豚鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(8.4 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(16.8 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(33.6 mL/kg)、氨溴特罗组(4.5 mL/kg)、小青龙合剂组(4.5 mL/kg),每组 10 只,雌雄各半。各组按剂量灌胃,模型组灌胃等量生理盐水,连续 3 d。末次给药 1 h 后,用上述方法测定各组豚鼠咳嗽潜伏期及咳嗽次数。

(2) 氨水引咳小鼠实验

将小鼠随机分为模型组、痰喘宁合剂低剂量组(5.72 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(11.43 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(22.85 mL/kg)、氨溴特罗组(5.70 mL/kg)、小青龙合剂组(6.50 mL/kg),每组 12 只,雌雄各半。各组小鼠按剂量灌胃,模型组灌胃等量的生理盐水,连续 3 d。末次给药 1 h 后,将小鼠置于倒置的 500 mL 烧杯中,放入注有 0.2 mL 氨水的棉球。1 min 后将棉球取出,观察 2 min。小鼠第一次咳嗽(小鼠张大嘴,同时腹部收缩,偶有咳嗽声)时间即为咳嗽潜伏期,并记录 3 min 内咳嗽次数。

1.3.3 痰喘宁合剂祛痰作用研究

将小鼠随机分为模型组^[6]、痰喘宁合剂低剂量组(5.72 mL/kg)、痰喘宁合剂中剂量组(11.43 mL/kg)、痰喘宁合剂高剂量组(22.85 mL/kg)、氨溴特罗组(5.70 mL/kg)、小青龙合剂组(6.50 mL/kg),每组 12 只,雌雄各半。各组小鼠按剂量灌胃,模型组灌胃等量的生理盐水,连续 3 d。末次给药 30 min 后,腹腔注射 2.5% 的酚红溶液(0.2 mL/10 g)。30 min 后处死,剪开颈部,暴露气管,剪下自甲状软骨至气管分叉处的一段气管,放入 2 mL 碳酸氢钠与生理盐水的混合液中(比例为 1:15),酶标仪检测 546 nm 处的吸光度(OD)值,利用标准曲线计算酚红排泄量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS 9.2 统计软件处理。气道阻力检测结果进行多因素重复测量方差分析,病理炎症评分用

Ridit 评级方法进行分析。其余指标,若各组数据服从正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,两组比较采用 q 检验;若各组数据不服从正态分布或方差不齐,则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰喘宁合剂平喘作用研究

2.1.1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠气道阻力的影响

相较于正常组,模型组大鼠 R_L 在乙酰甲胆碱浓度为 0、12.5、50 mg/mL 时均升高 ($P < 0.05$)。相较于模型组,痰喘宁合剂低剂量组与小青龙合剂组在乙酰甲胆碱浓度为 0、12.5、50 mg/mL 时 R_L 降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);痰喘宁合剂中剂量组在乙酰甲胆碱浓度为 6.25 mg/mL 时,相对于模型组, R_L 有所升高 ($P < 0.05$);醋酸地塞米松组在乙酰甲胆碱浓度为 50 mg/mL 时, R_L 降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.1.2 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠血清 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平的影响

相较于正常组,模型组大鼠血清中 IgE、IL-4、IL-17 和 TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$);相较于模型组,醋酸地塞米松组 IgE 水平降低,痰喘宁合剂各剂量组 IgE 水平均有降低趋势 ($P > 0.05$);相较于模型组,痰喘宁合剂中剂量组及醋酸地塞米松组 IL-4、IL-17 及 TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);小

青龙合剂组 IL-17 水平降低 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

2.1.3 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺泡灌洗液 WBC 及 EOS 的影响

相较于正常组,模型组大鼠 BALF 中 WBC 数量和 EOS 百分比升高 ($P < 0.01$)。相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、醋酸地塞米松组及小青龙合剂组均可降低 BALF 中 WBC 数量和 EOS 百分比 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

2.1.4 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺组织病理影响

正常组大鼠支气管管腔未见扩张,管腔内无分泌物,皱襞如常,上皮细胞未见变性、坏死及脱落,平滑肌层未见增生,管壁未见增厚;周围血管未见增生及扩张,间质及肺泡腔未见明显炎症。模型组大鼠支气管管腔局部见代偿性扩张,管腔内见分泌物,皱襞或增生或平坦,上皮细胞变性,局部可见脱落,管壁增厚,平滑肌层增生明显;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分升高(与正常组相比, $P < 0.01$)。痰喘宁合剂低剂量组支气管管腔轻度扩张,管腔内罕见分泌物,皱襞较为平坦,上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生较少量;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分有降低趋势(与模型组相比, $P > 0.05$)。痰喘宁合剂中剂量组支气管管腔轻度扩张,支气管管腔内未见分泌物,皱襞较为明显,上皮细胞变性不明显,

表 1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠 R_L 的影响 ($\bar{x} \pm s$, cmH₂O/(mL/s), $n = 12$)

Table 1 Effects of Tanchuaning Mixture on airway resistance in asthmatic rats induced by OVA

Mch (mg/mL)	剂量 (mL/kg) Dose	0	6.25	12.5	50
正常组 Normal group	—	0.34±0.09	0.46±0.11	0.51±0.07	0.60±0.13
模型组 Model group	—	0.45±0.12 ^a	0.50±0.21	0.72±0.30 ^a	1.01±0.47 ^a
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	0.44±0.30	0.59±0.29	0.66±0.21	0.71±0.23 ^c
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	0.32±0.08 ^c	0.38±0.09	0.50±0.15 ^c	0.49±0.16 ^d
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	0.31±0.11 ^d	0.46±0.12	0.46±0.14 ^d	0.61±0.26 ^c
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	0.37±0.10	0.58±0.13 ^c	0.66±0.10	0.77±0.25
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	0.39±0.08	0.52±0.16	0.64±0.31	0.74±0.31

注:与正常组相比, ^a $P < 0.05$;与模型组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$.

未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围少量血管增生、扩张,间质及肺泡腔见少量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.05$)。痰喘宁合剂高剂量组支气管管壁轻度扩张,管腔内未见分泌物,皱襞较为明显,上皮细胞变性不明显,未见坏死及脱落,管壁增厚及平滑肌层增生均不明显;周围极少量血管增生、扩张,间质及肺泡腔见少量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.01$)。醋酸地塞米松组支气管管腔扩张不明显,管腔内可见分泌物,皱襞代偿性增生,上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,支气管管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围血管增生、扩

张,间质及肺泡腔见中等量炎症,肺组织炎症评分降低(与模型组相比, $P<0.05$)。小青龙合剂组支气管管腔扩张不明显,支气管管腔内偶见分泌物,皱襞代偿性增生,管腔上皮细胞轻度变性,未见坏死及脱落,管壁轻度增厚,平滑肌层增生不明显;周围血管增生、扩张,间质及肺泡腔见中等量炎症(与模型组相比, $P>0.05$)。结果见表 4 及图 1。

2.1.5 痰喘宁合剂对氯化乙酰甲胆碱及磷酸组胺引喘豚鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组引喘潜伏期均延长($P<0.01$)。结果见表 5。

表 2 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠血清 IgE、IL-4、IL-17 及 TNF- α 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 2 Effect of Tanchuaning Mixture on the levels of serum IgE, IL-4, IL-17 and TNF- α in asthmatic rats induced by OVA

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	IgE (U/mL)	IL-4 (ng/L)	IL-17 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
正常组 Normal group	—	6.40 $\pm$ 1.38	34.25 $\pm$ 4.25	45.65 $\pm$ 10.94	60.19 $\pm$ 16.62
模型组 Model group	—	11.44 $\pm$ 5.36 ^b	47.27 $\pm$ 16.07 ^b	86.35 $\pm$ 41.51 ^b	110.73 $\pm$ 65.31 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	6.14 $\pm$ 3.47 ^d	28.55 $\pm$ 10.60 ^d	41.73 $\pm$ 24.33 ^d	46.81 $\pm$ 30.94 ^d
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	8.59 $\pm$ 1.19	38.43 $\pm$ 5.28	56.90 $\pm$ 9.51 ^d	75.30 $\pm$ 19.49
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	9.06 $\pm$ 4.12	40.20 $\pm$ 8.95	64.31 $\pm$ 24.01	81.17 $\pm$ 32.63
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	7.98 $\pm$ 2.79	35.1 $\pm$ 9.67 ^c	53.26 $\pm$ 16.17 ^d	64.56 $\pm$ 35.10 ^c
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	10.20 $\pm$ 3.97	43.92 $\pm$ 12.94	69.01 $\pm$ 32.59	97.46 $\pm$ 51.16

注:与正常组相比,^b $P<0.01$;与模型组相比,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$.

表 3 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠 BALF 中 WBC 及 EOS 的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Tanchuaning Mixture on WBC and EOS in BALF of OVA-induced asthma rats

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	WBC ($10^7/L$)	EOS (%)
正常组 Normal group	—	15.08 $\pm$ 2.91	1.67 $\pm$ 1.15
模型组 Model group	—	46.08 $\pm$ 8.35 ^b	5.92 $\pm$ 1.88 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	31.17 $\pm$ 6.51 ^d	3.50 $\pm$ 1.31 ^d
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	33.25 $\pm$ 6.84 ^d	3.58 $\pm$ 1.44 ^d
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	35.58 $\pm$ 6.89 ^d	3.75 $\pm$ 1.36 ^d
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	33.42 $\pm$ 6.64 ^d	3.42 $\pm$ 1.24 ^d
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	33.67 $\pm$ 5.53 ^d	3.25 $\pm$ 1.54 ^d

注:与正常组相比,^b $P<0.01$;与模型组相比,^d $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P<0.01$. Compared with the model group, ^d $P<0.01$.

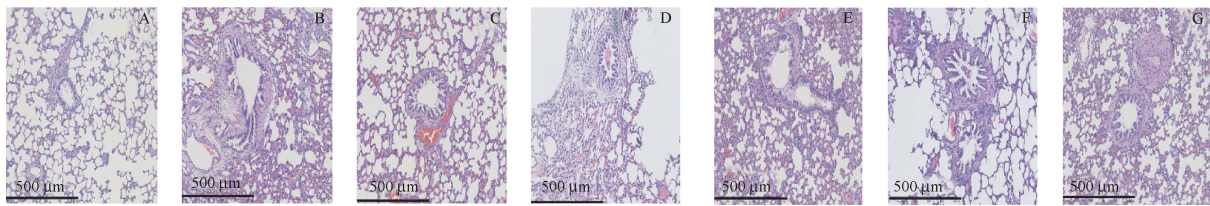
表 4 痰喘宁合剂对 OVA 所致支气管哮喘大鼠肺组织病变程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Tanchuaning Mixture on the degree of lung tissue lesion in bronchial asthma rats induced by OVA

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	病变程度 Grade of pathological changes			评分 Score
		0 级 Grade 0	I 级 Grade I	II 级 Grade II	
正常组 Normal group	—	8	4	0	0.33±0.49
模型组 Model group	—	0	6	6	1.50±0.52 ^b
醋酸地塞米松组 Dexamethasone acetate group	0.55 (mg/kg)	2	8	2	1.00±0.60 ^c
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.00	0	3	9	1.75±0.45
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	7.50	1	8	3	1.16±0.57
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	15.00	2	8	2	1.00±0.60 ^c
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	30.00	3	9	0	0.75±0.45 ^d

注:与正常组相比, ^b $P < 0.01$;与模型组相比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^b $P < 0.01$. Compared with the model group, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$.



注:A:正常组;B:模型组;C:醋酸地塞米松组;D:小青龙合剂组;E:低剂量组;F:中剂量组;G:高剂量组。

图 1 痰喘宁合剂对 OVA 所致哮喘大鼠肺组织病理的影响 (HE 染色)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Dexamethasone acetate group. D, Xiaoqinglong Mixture group. E, Low dosage group. F, Moderate dosage group. G, High dosage group.

Figure 1 Effect of Tanchuaning Mixture on the pathology of lung tissue in asthma rats induced by OVA (HE staining)

2.2 痰喘宁合剂镇咳作用研究

2.2.1 痰喘宁合剂对枸橼酸引咳豚鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂中、高剂量组,氨溴特罗组,小青龙合剂组咳嗽潜伏期均延长 ($P < 0.01$),低剂量组咳嗽潜伏期有延长趋势 ($P > 0.05$)。相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组咳嗽次数减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表 6。

2.2.2 痰喘宁合剂对氨水引咳小鼠的影响

相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组,氨溴特

罗组,小青龙合剂组咳嗽潜伏期均延长 ($P < 0.01$);相较于模型组,痰喘宁合剂各剂量组、氨溴特罗组、小青龙合剂组咳嗽次数均减少 ($P < 0.01$)。结果见表 7。

2.3 痰喘宁合剂祛痰作用研究

相较于模型组,痰喘宁合剂低、高剂量组,氨溴特罗组,小青龙合剂组气管段酚红排泄量均升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见表 8。酚红标准曲线见图 2。

表 5 痰喘宁合剂对豚鼠引喘作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 5 Effect of Tanchuanning Mixture on guinea pig's induced asthma

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	引喘潜伏期 (s) Induced asthma incubation period
模型组 Model group	—	34.1 ± 6.66
氨溴特罗组 Ambroxol Group	4.5	94.3 ± 28.99 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.5	59.7 ± 13.37 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	8.4	62.9 ± 19.46 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	16.8	67.4 ± 14.57 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	33.6	69.8 ± 8.33 ^b

注:与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, ^b $P < 0.01$.

表 6 痰喘宁合剂对枸橼酸引咳豚鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 6 Effect of Tanchuanning Mixture on citrate guinea pig

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	咳嗽潜伏期 (s) Cough latency	咳嗽次数 (次) Number of coughs (times)
模型组 Model group	—	108.7 ± 44.07	24.1 ± 9.49
氨溴特罗组 Ambroxol Group	4.5	170.9 ± 38.95 ^b	6.3 ± 4.08 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	4.5	211.1 ± 62.64 ^b	4.8 ± 2.09 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	8.4	115.2 ± 63.97	14.9 ± 6.47 ^a
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	16.8	168.9 ± 38.22 ^b	5.8 ± 3.55 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	33.6	197.9 ± 57.02 ^b	4.1 ± 2.28 ^b

注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

表 7 痰喘宁合剂对氨水引咳小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 7 Effect of Tanchuanning Mixture on mice induced by cough with ammonia

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	咳嗽潜伏期 (s) Cough latency	咳嗽次数 (次) Number of coughs (times)
模型组 Model group	—	51.92 ± 13.91	45.42 ± 9.37
氨溴特罗组 Ambroxol Group	5.70	108.25 ± 31.83 ^b	11.33 ± 4.50 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	6.50	115.92 ± 20.87 ^b	11.42 ± 4.19 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuanning Mixture low dosage group	5.72	69.08 ± 26.42 ^b	30.33 ± 11.83 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuanning Mixture moderate dosage group	11.43	87.75 ± 23.13 ^b	24.08 ± 14.52 ^b
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuanning Mixture high dosage group	22.85	92.67 ± 19.80 ^b	22.25 ± 12.06 ^b

注:与模型组相比, ^b $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the model group, ^b $P < 0.01$.

表 8 痰喘宁合剂对小鼠气管段酚红排泌量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 8 Effect of Tanchuaning Mixture on the excretion of phenol red in tracheal segment of mice

组别 Groups	剂量 (mL/kg) Dose	酚红浓度 ($\mu\text{g/mL}$) Phenol red concentration
模型组 Model group	—	0.075 $\pm$ 0.0048
氨溴特罗组 Ambroxol Group	5.70	0.088 $\pm$ 0.013 ^b
小青龙合剂组 Xiaoqinglong Mixture group	6.50	0.094 $\pm$ 0.018 ^b
痰喘宁合剂低剂量组 Tanchuaning Mixture low dosage group	5.72	0.090 $\pm$ 0.013 ^b
痰喘宁合剂中剂量组 Tanchuaning Mixture moderate dosage group	11.43	0.082 $\pm$ 0.012
痰喘宁合剂高剂量组 Tanchuaning Mixture high dosage group	22.85	0.087 $\pm$ 0.018 ^a

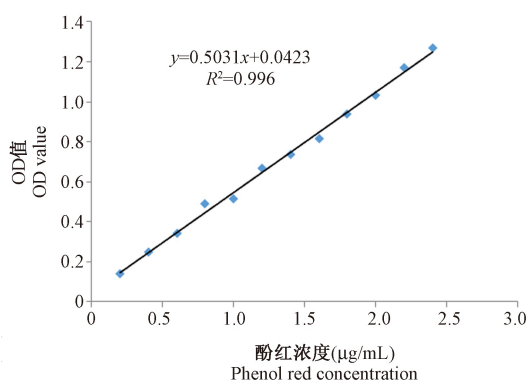
注:与模型组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。Note. Compared with the model group, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

图 2 酚红的标准曲线

Figure 2 Standard curve of phenol red

3 讨论

儿童咳嗽、哮喘易反复发作,最终可引发哮喘。痰喘宁合剂组方是闫慧敏教授在老专家刘韵远先生治疗哮喘经验方的基础上,根据当代儿童哮喘特点进行加减化裁而成^[3],全方由炙麻黄、白果、醋五味子、干姜、炒紫苏子、白前、蜜百部、川芎、青黛等 12 味中药组成,有宣肺化痰、止咳平喘功效,作为北京儿童医院的协定处方及院内制剂在临床用于儿童哮喘的治疗已有二十余年,尤其在治疗痰湿蕴肺型患儿方面,疗效确切。本实验对痰喘宁合剂平喘、镇咳和祛痰作用进行了研究。

哮喘患者因炎症导致气道狭窄造成气道阻力增大,最终表现出咳嗽、呼吸急促等表现^[7]。气道高反应性是评判哮喘模型是否成功的重要客观性指标之一。动物实验中多采用有创或无创方法进行气道阻力测定来反映气道顺应性情况^[8]。本实

验结果显示,相比于正常组,模型组气道阻力随乙酰甲胆碱浓度升高而显著升高,提示本研究大鼠哮喘模型复制成功;相比于模型组,痰喘宁合剂低剂量组气道阻力显著降低,中、高剂量组有一定降低趋势,提示痰喘宁合剂对气道高反应性具有一定的降低作用。

哮喘是 IgE 介导的以炎性细胞浸润,炎性因子分泌增多为主要特征的呼吸系统疾病。IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞的 IgE 受体结合并激活细胞,释放组胺及炎症介质,引发炎症反应^[9]。Th1/Th2 细胞失衡学说是哮喘发病机制之一^[10]。Th2 细胞介导嗜酸性细胞炎症反应。炎性因子 IL-4 由 Th2 细胞分泌,而 IL-4 分泌增多可导致嗜酸性粒细胞的蓄积,加重炎症反应。IL-4 还可促进 IgE 的合成,从而加重气道炎症^[11]。本研究中,模型组血清 IgE、IL-4 水平显著升高,痰喘宁合剂中剂量组 IL-4 水平明显降低,痰喘宁合剂各剂量组 IgE 均呈下降趋势。研究表明,Th2 细胞优势在揭示哮喘发作机制方面稍显不足,Th17 细胞也参与了哮喘的发生发展^[12]。IL-17 由 Th17 细胞分泌,不仅参与 Th17 细胞介导的嗜中性细胞气道炎症,还可加重 Th2 细胞诱导的嗜酸性细胞炎症^[13]。TNF- α 是常见的内源性炎性因子,通过募集炎性细胞,促进其他炎性因子的释放使炎症加重,还可引起气道高反应性^[14],增加氧化应激参与哮喘的发生发展^[15]。临床研究表明,在哮喘患者的肺组织及痰液中检测到高水平的 TNF- α 。本研究显示,痰喘宁合剂可降低 IL-17、TNF- α 水平,减少 BALF 中 WBC 及 EOS 数量,减轻大鼠肺组织病理损害和气道炎症。

乙酰胆碱作为一种神经递质,可促进肺泡巨噬细胞释放趋化因子,使大量炎性细胞及炎性因子聚集在气道平滑肌,增强其收缩能力,加重哮喘病情^[16]。组胺由肥大细胞释放,当机体受到过敏原刺激时,组胺释放增多,造成气道狭窄,呼吸困难。在豚鼠实验中,磷酸组胺可通过其受体,使气道平滑肌收缩增强,加重气道炎症。因此,本研究采用二者结合的方式,研究痰喘宁合剂的平喘作用。结果显示,豚鼠出现明显的呼吸困难,喘息甚至跌倒症状,而痰喘宁合剂各剂量组可明显延长豚鼠的引喘潜伏期,提示痰喘宁合剂可显著改善气道平滑肌痉挛等症状,具有一定的平喘作用。

咳嗽是咳嗽中枢受到外界刺激的一种生理反应,咳嗽反复发作极大地影响了患者的生活质量^[17]。咳嗽反射弧包括感受器、传入神经、神经中枢、效应器、传出神经,对反射弧中的感受器和传出神经进行刺激最易引发咳嗽反应。本研究采用氨水及枸橼酸引咳小鼠及豚鼠,结果表明痰喘宁合剂各剂量组均能明显延长咳嗽潜伏期及减少咳嗽次数,镇咳作用明显。

痰液由气管及支气管黏膜分泌。正常状态下,痰液分泌较少,可湿润呼吸道。疾病状态下,痰液过于黏稠,不易排出,可引起气道狭窄,从而加重病情^[18]。祛痰药物多为降低痰液黏稠度,促进痰液排出。祛痰作用实验中,酚红作为指示剂,可通过其排泄量的多少间接评价药物的祛痰效果。结果表明,痰喘宁合剂可增加小鼠气管段的酚红排泄量,提示痰喘宁合剂对痰液的排出有一定的促进作用。

以上研究结果表明,痰喘宁合剂具有一定的平喘、镇咳、祛痰作用,但其作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Eigenmann P. Asthma from infancy to childhood, and allergy perception in adolescents [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, 31(2): 115-116.
- [2] 李岚, 陈华, 俞景茂. 俞景茂教授运用止嗽方治疗小儿咳嗽经验 [J]. *中国中西医结合儿科学*, 2019, 11(4): 279-281.
- [3] 吕莉. 痰喘宁合剂治疗痰湿蕴肺型小儿慢性咳嗽临床疗效观察 [D]. 北京: 首都医科大学, 2016.
- [4] 高琴琴. 桂芍子喘颗粒对支气管哮喘大鼠的干预作用及 MUC5AC/EGFR 通路的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [5] 周艳丽, 阮研硕, 劳文艳, 等. 哮喘动物模型的建立方法研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2017, 34(10): 931-936.
- [6] 王翰华, 杨晓春, 陈云. 宁海白枇杷花醇提物不同极性部位的止咳化痰抗炎活性 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(6): 1431-1434.
- [7] Anderson SD. Challenge tests to assess airway hyperresponsiveness and efficacy of drugs used in the treatment of asthma [J]. *J Aerosol Med*, 1996, 9(1): 95-109.
- [8] Hoymann HG. Invasive and noninvasive lung function measurements in rodents [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007, 55(1): 16-26.
- [9] Lommatzsch M, Geißler K, Bergmann KC, et al. IgE and anti-IgE in asthma: A chequered history [J]. *Pneumologie*, 2017, 71(6): 398-405.
- [10] Ji NF, Xie YC, Zhang MS, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1): 76-81.
- [11] Bui TT, Piao CH, Song CH, et al. Bupleurum chinense, extract ameliorates an OVA-induced murine allergic asthma through the reduction of the Th2 and Th17 cytokines production by inactivation of NF-κB pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1085-1095.
- [12] Ramakrishnan RK, Al Heialy S, Hamid Q. Role of IL-17 in asthma pathogenesis and its implications for the clinic [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2019, 13(11): 1057-1068.
- [13] Despotovic M, Stoimenov TJ, Stankovic I, et al. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor α and antioxidant enzymes in bronchial asthma [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24(2): 251-256.
- [14] Wang Q, Doerschuk CM. Neutrophil-induced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6487-6494.
- [15] Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma --present in most, absent in many [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1): 57-65.
- [16] Koarai A, Ichinose M. Possible involvement of acetylcholine-mediated inflammation in airway diseases [J]. *Allergol Int*, 2018, 67(4): 460-466.
- [17] 付书婕, 黄兴振, 巫玲玲, 等. 剑花提取物的止咳祛痰平喘作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(1): 18-21.
- [18] 卢靖, 熊万娜, 邓裕彦, 等. 天黄猴枣散的解热、祛痰平喘及抗惊厥作用研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(1): 188-191.

[收稿日期] 2020-05-23