

清热润燥口服液止咳、平喘作用及急性毒性实验研究

魏丹霞¹⁾, 陈丽玲²⁾, 赵玉雪²⁾, 余晓玲¹⁾, 顾力华¹⁾, 陈斌¹⁾, 张荣平²⁾, 陆家龙¹⁾

(1) 昆明市中医医院, 云南 昆明 650011; 2) 昆明医科大学, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 评价清热润燥口服液的止咳、平喘作用及安全性. **方法** 采用小鼠“浓氨水法”及豚鼠“喷雾法”观察清热润燥口服液在止咳、平喘方面的作用; 以小鼠最大给药量、最大体积的药量一日1次或2~3次进行灌胃给药, 给药后立刻观察动物反应, 并连续观察14 d, 测小鼠的最大耐受量(MTD). **结果** 清热润燥口服液能延长小鼠咳嗽的潜伏期, 减少咳嗽次数 ($P < 0.05$); 明显能延长豚鼠哮喘的发作潜伏期 ($P < 0.05$). 急性毒性实验连续观察14 d后, 未发生动物死亡, 体重均有所增长, 观察未见异常反应, 小鼠口服给药的最大耐受量是生药量为117.6 g 原生药/(kg·d), 相当于临床人用量的187倍. **结论** 清热润燥口服液具有止咳和平喘作用. 拟用日剂量在临床应用上是安全的.

[关键词] 清热润燥口服液; 止咳作用; 平喘作用; 急性毒性试验

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)05-0061-04

Experimental Studies on Antitussive and Antiasthmatic Effects and Acute Toxicity of Qingre Runzao Oral Liquid

WEI Dan-xia¹⁾, CHEN Li-ling²⁾, ZHAO Yu-xue²⁾, YU Xiao-ling¹⁾, GU Li-hua¹⁾, CHEN Bin¹⁾,
ZHANG Rong-ping²⁾, LU Jia-long¹⁾

(1) Kunming Chinese Medicine Hospital, Kunming Yunnan 650011; 2) Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To observe the antitussive and antiasthmatic effects and the acute toxicity of Qingre Runzao oral liquid. **Methods** Mice "concentrated ammonia method" and guinea pig "spray method" were used to observe the antitussive and antiasthmatic effects of Qingre Runzao oral liquid. The acute toxicity was tested in mice by intragastric administration at the maximum dose and maximum volume, one time or two-three times per day. The animals were observed for 14 days after treatment, and then the maximum tolerated dose (MTD) in mice was determined. **Results** Qingre Runzao oral liquid could prolong the incubation period of the mice tussive and reduce the frequency of tussive ($P < 0.05$). It could obviously extend the incubation period of guinea pig asthma attack. There was no death and toxic reaction on mice after treatment for 14 days, and the weight of mice have increased with no abnormal reaction. The MTD in mice by intragastric administration was 117.6 g crude drug (kg·day), and it was the equivalent of 187 times of the human dose in clinical. **Conclusion** The Qingre Runzao oral liquid has significant antitussive and antiasthmatic effects. The contemplated daily dosage is safe in clinical applications.

[Key words] Qingre Runzao oral liquid; Antitussive; Antiasthmatic; Acute toxicity test

清热润燥口服液是由桑叶、芦根、麦冬、沙参、茯苓、陈皮等中药经过现代制剂工艺加工而成. 该处方经过了30余年的临床应用, 具有较好

的清热养阴、润燥止咳的作用, 临床疗效好、安全, 值得开发为制剂推广应用. 为确保该口服液的顺利研发, 本研究完成了其止咳、平喘作用的药效

[基金项目] 云南省财政厅、云南省卫生厅资助项目 (云卫发[2009]1134号)

[作者简介] 魏丹霞 (1970~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 中医学学士, 主任医师, 主要从事中西医结合内科工作.

[通讯作者] 张荣平. E-mail:zhrpkm@163.com; 陆家龙. E-mail:1216508769@qq.com

学实验及急性毒性试验, 具体报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 KM 小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, SPF 级, 动物许可证号: SCXK (滇) 2011-0004; 豚鼠, 雌雄各半, 体重 (200 ± 12) g, 普通级, 动物使用许可证号: SCXK (滇) 2011-0004. 实验动物及实验动物饲养观察均由昆明医科大学实验动物学部提供。

1.1.2 受试药物 清热润燥口服液 (桑叶、芦根、麦冬、沙参、茯苓、陈皮等中药组成) 由昆明市中医医院制剂室提供 (2.94 g 原生药 /mL). 药物保存于 $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用, 使用前复温至 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 使用。

1.1.3 主要试剂 磷酸可待因 (青海制药厂有限公司, 批号: 20100315)、氨水 (含量 25~28%, 西陇化工股份有限公司, 批号: 1105081)、2% 氯化乙酰胆碱 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 批号: 14K10140)、0.1% 磷酸组胺 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20100319)、氨茶碱片 (昆明制药集团股份有限公司, 批号: 110103-03)。

1.1.4 仪器 超声雾化器 (型号: CC2170A, 中外合资成都维信电子科大新技术有限公司)、紫外分光光度计 (型号: UV-1600, 北京瑞利分析仪器公司)、500ml 玻璃钟罩、YP 2001 电子天平 (上海精密仪器表有限公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 止咳、平喘药效学实验研究 (1) 给药剂量的确定^[1] 根据标准动物的等效剂量折算系数法 (Bios 氏原法), 来进行不同动物间的剂量换算, 进而得出治疗剂量。低剂量为治疗剂量的 2 倍, 中剂量为治疗剂量的 5 倍, 高剂量为治疗剂量的 10 倍。

1.2.2 对浓氨水致咳小鼠的影响^[2] 取健康 KM 小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 即正常对照 (生理盐水) 组、阳性对照 (0.03 g/kg 磷酸可待因) 组、清热润燥口服液高剂量组 (19.50 mL/kg, 即 57.3 g/kg)、清热润燥口服液中剂量组 (9.75 mL/kg, 即 28.7 g/kg) 和清热润燥口服液低剂量组 (3.90 mL/kg, 即 11.5 g/kg), 每组 10 只。实验前各组小鼠禁食不禁水 12 h, 然后各组小鼠按每次 0.1 mL/10 g 体重灌胃给药, 1 d 1 次或 2~3 次给足所要求的剂量, 连续 6 d。末次给药 1 h 后, 将小

鼠逐只放入 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) 均匀地喷入罩内, 喷入浓氨水气雾 5 s, 观察小鼠咳嗽潜伏期 (小鼠放入钟罩至发生咳嗽所经时间为咳嗽潜伏期) 及 2 min 内咳嗽次数。

1.2.3 对豚鼠平喘作用的影响^[2] 先用 80 只豚鼠做筛选, 单只放入 4L 玻璃钟罩中, 超声波雾化器喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.1% 磷酸组胺等容积混合液 15 s, 观察豚鼠的引喘潜伏期 (即从喷雾开始到哮喘发作、呼吸困难, 直至抽搐跌倒的时间), 一般不超过 120 s, 如超过者则作为不敏感, 不选用。选出 60 只豚鼠供实验用。将选用的豚鼠分对照组 11 只, 阳性对照组 11 只, 清热润燥口服液高剂量组 14 只、中剂量组 13 只、低剂量组 11 只, 即正常对照组 (生理盐水)、阳性对照组 (按 125 mg/kg 给予浓度为 12.5% 的氨茶碱)、清热润燥口服液高剂量组 (13.75 mL/kg, 即 40.4 g/kg)、清热润燥口服液中剂量组 (6.875 mL/kg, 即 20.2 g/kg) 和清热润燥口服液低剂量组 (2.73 mL/kg, 即 8 g/kg)。实验前各组豚鼠禁食不禁水 12 h, 然后各组豚鼠按 0.2 mL/10 g 体重灌胃给药, 1 d 内 1 次或 2~3 次给足所要求的剂量, 连续灌胃给药 7 d。末次给药 1 h 后, 将豚鼠放入玻璃钟罩内, 以 400 mmHg 的压力喷入 2% 氯化乙酰胆碱和 0.1% 磷酸组胺等容积混合液 15 s, 观察豚鼠的引喘潜伏期。

1.2.4 急性毒理试验^[2] (1) 预试验: 在进行正式实验之前, 首先进行预试验, 以便为正式试验提供依据。将 12 只 KM 小鼠随机分为 2 组, 雌雄各半, 灌胃前禁食不禁水 12 h。给药组: 以成人每日用量的 150 倍作为给药剂量, 对小鼠 1 d 1 次或 2~3 次进行灌胃给药。给药后常规饲养, 观察 3 d。空白组灌胃给予等量生理盐水, 方法同给药组。结果小鼠全部存活, 因此, 无法测出该制剂的 LD₅₀。提示该制剂的药物毒性很小, 是较安全的。故得出本实验可以采用最大浓度 (2.94 g 原生药 /mL) 及小鼠灌胃可承受的最大体积 (每 10g 体重 0.4 mL) 进行毒性试验; (2) 最大耐受量倍数: 取健康 KM 小鼠 40 只, 雌雄各半, 按随机数字表把小鼠随机分为 2 组, 即正常对照组, 共 20 只, 清热润燥口服液组, 共 20 只。给药前均禁食 12 h。实验时清热润燥口服液组每只小鼠按最大给药容积 40 mL/kg 的剂量下, 24 h 内 1 次或 1 d 分为 2~3 次灌胃 2.94 g/mL 浓度的清热润燥口服液。正常对照组灌胃给予等量生理盐水。给药后, 观察饲养 14 d, 并观察动物反应。最大耐受量倍数计算方法:

$$\text{小鼠最大耐受量倍数} = \frac{\text{每只小鼠的耐受量}}{\text{小鼠平均体重 20 g}} \times \frac{\text{成人平均体重 70 kg}}{\text{成人每日用量}}$$

(3) 观察指标: 小鼠一般情况和体重的变化: 记录小鼠的外观、行为、饮食、活动、分泌物、排泄物、死亡等情况; 实验前后各称每只小鼠体重1次. 小鼠主要脏器和组织的变化: 于14 d后颈椎脱臼法处死小鼠, 解剖并观察其心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等主要脏器和组织的变化.

1.3 统计学方法

数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计分析使用SPSS统计分析软件, 采用单因素方差分析进行分析统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 对浓氨水致咳小鼠的影响

清热润燥口服液高剂量组能延长小鼠咳嗽潜伏期, 减少咳嗽次数, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结果见表1.

2.2 对豚鼠平喘作用的影响

清热润燥口服液高剂量组豚鼠引喘出现潜伏期明显长于同期正常对照组($P < 0.05$), 中剂量组和低剂量组引喘出现潜伏期与正常对照组比较有一定延长趋势, 但差异无统计学意义($P >$

0.05). 与阳性对照组氨茶碱比较, 清热润燥口服液的平喘作用明显弱于氨茶碱, 结果见表2.

2.3 急性毒理试验

2.3.1 对小鼠一般情况和体重的影响 在整个观察期间, 正常对照组和清热润燥口服液组的小鼠皮毛光滑, 其外观、行为、饮食、活动、分泌物、排泄物等情况均未见异常, 无1只死亡; 给药前后2组小鼠体重增重差异有统计学意义($P < 0.01$), 给药后2组体重增重比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 结果见表3.

2.3.2 对小鼠主要脏器和组织的影响 14 d后处死的小鼠, 正常对照组和清热润燥口服液组解剖小鼠心、肝、脾、肺、肾、胃、肠等主要脏器和组织未见任何不良病变, 2组相比差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.3.3 小鼠口服给药的最大耐受量倍数 按小鼠灌胃可承受的最大体积(每10 g体重0.4 mL)对小鼠口服给药, 计算得清热润燥口服液最大耐受量是生药量为117.6 g原生药/(kg·d), 相当于临床人用量的187倍. 成人每日口服生药量为15 mL \times 2.94(g) = 44 g, 成人体重按70 kg计, 原生药0.63 g/kg.

表1 对浓氨水致咳小鼠的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Qingre Runzao oral liquid on tussis induced by concentrated ammonia in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	咳嗽潜伏期 (min)	2 min内咳嗽 (次)
正常对照组	10	22.6 \pm 17.58	10.80 \pm 5.16
阳性对照组	10	67.7 \pm 48.94*	4.6 \pm 3.56*
低剂量组	10	41.1 \pm 34.86	9.70 \pm 8.93#
中剂量组	10	50.46 \pm 42.54	6.15 \pm 5.78#
高剂量组	10	67.28 \pm 56.42*	1.28 \pm 1.13**

与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与高剂量组比较, # $P < 0.05$.

表2 对豚鼠平喘作用的观察($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Qingre Runzao oral liquid on asthma in guinea pig ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	引喘潜伏期 (min)	豚鼠灌胃呛死数量 (只)
正常对照组	10	45.70 \pm 16.63	1
阳性对照组	10	116.52 \pm 27.47**	1
高剂量组	10	76.49 \pm 19.76*	1
中剂量组	10	62.86 \pm 21.31	3
低剂量组	10	50.43 \pm 18.62	4

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表3 对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Effect of Qingre runzao oral liquid on weight in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	死亡 (n)	给药前体重 (g)	给药后体重 (g)
正常对照组	20	0	19.95 ± 1.23	26.70 ± 1.31*
清热润燥口服液组	20	0	19.84 ± 1.15	26.82 ± 1.39*

与给药前比较, * $P < 0.01$.

3 讨论

感冒后咳嗽症状持久不愈, 这与地域环境、治疗用药等多种因素有关^[3,4]。云南省名中医陆家龙主任医师根据昆明地区感冒后咳嗽多呈现气阴不足、燥邪难解的特点^[5], 结合30余年的临床辨证用药经验, 提炼出临床有较好疗效的“清热润燥方”, 并将其加工成制剂的清热润燥口服液^[6]经过本实验的研究证实了其具有止咳、平喘作用, 并且急性毒性试验亦证实了其拟用日剂量在临床应用上是安全的。这为其在临床上推广应用提供了依据。

[参考文献]

[1] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动

物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9):1 069 - 1 072.

[2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:107 - 642.

[3] 施兴黔, 江建锋, 蔡瑞锦, 等. 昆明地区地理气象因素与感染后咳嗽(风燥伤肺型)相关性机理探讨[J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(7):92 - 93.

[4] 施兴黔, 江建锋, 易小玲. 感染后咳嗽的中医药治疗综述[J]. 中国医药指南, 2011, 9(3):54 - 55.

[5] 魏丹霞, 施兴黔, 陆家龙. 陆家龙导师辨证治疗昆明地区感冒后咳嗽的特色 [J]. 云南中医中药杂志, 2010, 31(4):1 - 3.

[6] 余晓玲, 张韶湘, 邹昱蕾, 等. 清热润燥口服液澄清制备工艺研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(8):76 - 77.

(2013 - 02 - 14 收稿)

(上接第57页)

子影像杂志, 2012, 32(4):281 - 285.

[6] 石铮, 陈志山, 陈有挺, 等. 17-丙烯胺-17-去甲氧格尔德霉素对胆管癌细胞株QBC939生长周期及凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(10):1 237 - 1 239.

[7] PIMENTA G, HERBERT K M, REGAN L, et al. A compound that inhibits the HOP-Hsp90 complex formation and has unique killing effects in breast cancer cell lines[J]. Molecular pharmaceutics, 2011, 8(6):2252-2261

[8] 张涛, 锁涛, 王志军, 等. 17-烯丙胺-17-脱甲氧格尔德霉素对胆管癌细胞的体外化疗增敏作用[J]. 中国临床医学, 2009, 16(5):744 - 746.

[9] 王蕊, 刘忠, 王绍祥, 等. 热休克蛋白90抑制剂17-AAG对K562/ADR耐药细胞株生长和凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(10):1 316 - 1 320.

[10] MATSUMOTO Y, MACHIDA H, KUBOTA N. Preferential sensitization of tumor cells to radiation by heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin [J]. Journal of Radiation Research, 2005, 46(02):215-221

[11] WANG G, KRISHNAMURTHY K, TANGPISUTHIPONG-SA D, et al. Protection of murine neural progenitor cells by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in the low nanomolar concentration range [J]. Journal of Neurochemistry, 2011, 117(4):703 - 711.

[12] WANG X, JU W, RENOUEAU J, et al. 17-Allylamino - 17-demethoxygeldanamycin synergistically potentiates tumor necrosis factor-induced lung cancer cell death by blocking the Nuclear Factor- κ B pathway[J]. Cancer Res, 2006, 66(2):1 089 - 1 095.

(2013 - 03 - 17 收稿)