

止咳平喘膜剂的药效学研究(I)

李运曼 刘建平¹ 孙 宇 凌向平

(中国药科大学生理学教研室, ¹药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 本文对止咳平喘膜剂的药效学进行了初步的研究, 结果表明, 该膜剂经皮给药能显著延长蛋清所致豚鼠哮喘和枸橼酸所致豚鼠咳嗽的潜伏期; 减少枸橼酸所致豚鼠的咳嗽次数; 对小鼠气管酚红排泌量有明显的促进作用; 加快小鼠碳粒廓清速率; 无论是抗原攻击前给药, 还是攻击后给药均可显著抑制 2,4-二硝基氯苯所致的接触性皮炎。

关键词 止咳平喘膜剂; 药效学研究; 碳粒廓清速率; 接触性皮炎

止咳平喘膜剂 (antitussive and antiasthmotic

film, AAF)是由亲水性高分子材料溶解黄芩、干姜、麻黄等6味中药的有效成分而制成的骨架控释型止咳平喘透皮膜剂。取黄芩、麻黄、干姜、肉桂、细辛等六味药适量, 置圆底烧瓶中加热回流提取有效成分, 经醇沉得中药提取液, 而后灭菌备用。取该提取液适量, 加入聚乙烯醇、促渗剂等混匀溶解制成骨架控释型透皮膜剂, 用超声波脱气后, 在纸型铺膜器上铺膜, 制成直径为1 cm的圆形膜器密封保存。自然凉干后剪成直径为1 cm的圆形膜密封保存。体外扩散实验表明, 膜剂中的黄芩甙以零级速率透过皮肤, 其渗透速率平均为0.1096 mg/cm²·h, 12 h 累积渗透百分率为44.6%, 该结果为经皮给药的可行性提供了依据。该膜剂中黄芩可清热燥湿、泻火解毒, 用于肺热咳嗽; 麻黄发汗散寒、宣肺平喘, 用于胸闷喘咳、支气管哮喘; 干姜温中散寒、回阳通脉、燥湿消痰, 用于痰饮喘咳^[1]等。推测该膜剂在止咳平喘祛痰方面会具有较好的疗效。故本文对其临床前药效学进行了初步的探讨。

1 材料

1.1 动物

豚鼠, 体重200~250 g(止咳试验), 150~190 g(平喘试验), 雌雄各半; 昆明种小鼠, 体重18~22 g, 雌雄各半, 由本校动物饲养中心提供, 合格证编号: 苏动质97004。

1.2 试药

止咳平喘膜剂 (AAF): 由本校药剂学教研室提供, 批号: 990408 桂龙咳喘宁胶囊 (Gulong Kechuanning Capsule, GKC): 山西桂龙医药有限公司制造, 批准文号: (89)卫药准字 Z-11号。

枸橼酸: 无锡市民丰试剂厂, 分析纯, 批号: 930212, 酚红: 上海化学试剂总厂; 印度墨汁 (indian ink): 上海向群中学化学试剂厂; 2,4-二硝基氯苯 (dinitrochlorobenzene, DNCB): 上海化学试剂公司产品。

1.3 仪器

7550紫外-可见分光光度计: 上海分析仪器厂。WM-Z型无油空气压缩机: 天津市医疗器械二厂。

2 方法和结果

2.1 止咳平喘膜剂对蛋清所致豚鼠哮喘的影响

取体重150~190 g幼年豚鼠, 将其放入玻璃钟罩(容积约为2 L)中, 以恒压匀速喷入4%蛋清1ml, 观察动物发生哮喘的潜伏期。

“哮喘”反应按程序可分为四级, I级呼吸加速; II级呼吸困难; III级抽搐; IV级跌倒。潜伏期超过150秒钟者认为不敏感, 不予选用。

取敏感动物50只, 按体重随机分为5组, 每组10只, 雌雄各半, 除阳性对照组灌胃给药(ig)外, 其余4组均经皮给药, 阴性对照组给予赋形剂。

(即不含药的膜剂),其余3组分别给予止咳平喘膜剂高、中、低3个剂量。这4组给药膜面积相同,每只豚鼠均为 2 cm^2 ,含浸膏量亦相同,0.1 ml/cm²,即每只豚鼠给浸膏量0.2 ml,只是止咳平喘膜剂高、中、低剂量组的浸膏中生药浓度不同,分别为6.3和1.5 g/ml,即高、中、低剂量组给药剂量分别为1.2 g/只,0.6 g/只和0.3 g/只。将药膜贴在背部最上方中点两侧(相当于人的肺俞穴),每侧各一片,每片直径1 cm,每片药膜含浸膏量0.1 ml。每日给药1次,连续给7 d,末次给药后1 h将动物放入喷雾装置中,进行喷雾,记录动物发生哮喘的潜伏期(自喷雾开始至动物发生抽搐、翻滚反应的时间),并以潜伏期延长一倍为有效^[2],计算药物的有效率,结果见表1。

由表1可见,给药前各组动物的哮喘潜伏期无明显差异($P > 0.05$),给药后各给药组动物哮喘潜伏期明显长于阴性对照组($P < 0.01$)。其中阳性对照组和膜剂高剂量组有效率100%,中低剂量组均为80%。

Tab 1 Effect of AAF on asthma induced by egg white in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

| Groups | Dose (g/animal) | Pregenesial incubation | postgenesial incubation |
|---------|--------------------|------------------------|-------------------------|
| | | period(s) | period(s) |
| Control | | 58.3±8.4 | 58.4±8.4 |
| GKC | 0.3(g/kg ig) | 62.3±7.0 | 195.3±24.4*** |
| AAF | 1.2 | 63.3±10.7 | 167.6±14.0*** |
| | 0.6 | 64.4±6.4 | 141.8±20.8*** |
| | 0.3 | 62.7±6.98 | 143.1±22.4*** |

*** $P < 0.01$, vs control

2.2 止咳平喘膜剂对枸橼酸所致豚鼠咳嗽的影响

实验前先对豚鼠进行筛选,各豚鼠依次给予喷雾17.5%枸橼酸10 s,观察5 min内的咳嗽次数,喷雾后2 min内不咳者和或5 min内咳嗽次数少于10次者不用^[3]。

将筛选合格的豚鼠按体重随机分为4组,分组及给药同“2.1”项下,末次给药后1 h将动物放入喷雾装置中,以恒压匀速喷入17.5%枸橼酸10 s,记录咳嗽潜伏期及5 min内的咳嗽次数,结果见表2。

Tab 2 Effect of AAF on cough induced by citric acid in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

| Groups | Dose (g/animal) | Before drug | | After drug | |
|---------|--------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
| | | Incubation | Cough times | Incubation | Cough times |
| Control | | 63.8±10.0 | 20.1±3.2 | 67.3±11.0 | 18.5±2.4 |
| GKC | 0.3(g/kg ig) | 66.6±9.8 | 19.1±4.0 | 274.2±23.0*** | 3.3±1.5*** |
| AAF | 1.2 | 67.4±11.1 | 20.5±3.6 | 215.7±26.5*** | 5.9±2.2*** |
| | 0.6 | 61.3±13.5 | 19.4±4.2 | 156.5±23.9*** | 10.6±2.9*** |
| | 0.3 | 66.5±8.6 | 20.5±3.9 | 128.1±13.2*** | 11.1±3.1*** |

*** $P < 0.01$, vs control

由表2可见,给药前各组间动物咳嗽潜伏期和咳嗽次数均无明显差异($P > 0.05$)。与阴性对照组相比给药后各给药组动物咳嗽潜伏期显著延长,咳嗽次数亦明显减少($P < 0.01$)。

2.3 止咳平喘膜剂对小白鼠气管酚红排泌量的影响

取合格小鼠50只,雌雄各半,按体重随机分为5组,每组10只,阴性对照组给予赋形剂膜剂;阳性对照组给予桂龙咳喘宁0.9 g/kg(ig);其余3组分别给予止咳平喘膜剂高(0.36 g/只),中(0.18 g/只)和低(0.09 g/只)3个剂量。每只小鼠背部贴一片药膜,直径1 cm,每片药膜浸膏量相等,均为0.1 ml。高、中、低剂量组浸膏中生药浓度分别为3.6,1.8,0.9 g/ml。阴性对照组给药面积同止咳平喘膜剂三个组。每天给药1次,连续给7 d,末次给药后1 h,腹腔注射25%酚红溶液0.5 ml,0.5 h后将动物脱臼

处死,分离气管,用5%NaHCO₃溶液0.7 ml冲洗气管3次,每次来回抽洗3次,精密吸取洗出液1 ml,加入无水乙醇2 ml,摇匀,离心,取上清液用7550紫外可见分光光度计在588 nm波长处测定其光密度,代入标准曲线方程(酚红标准曲线回归方程为 $y=0.1260x+0.009$, $r=0.99$),计算酚红浓度^[4],并将给药组数据与阴性对照组进行t检验比较,结果见表3。

Tab 3 Effect of AAF on secretion of bronchial phenol red in mice ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

| Groups | Dose (g/animal) | Concentration of phenol red (mg/ml) |
|---------|--------------------|--|
| Control | | 0.09±0.03 |
| GKC | 0.9(g/kg ig) | 0.16±0.24*** |
| AAF | 0.36 | 0.14±0.22*** |
| | 0.18 | 0.14±0.12*** |
| | 0.09 | 0.1±0.02 |

*** $P < 0.01$, vs control

由表3可见,AAF高、中剂量组和桂龙咳喘宁组对小鼠气管酚红的分泌具有显著的促进作用($P < 0.01$),低剂量效果不明显。

2.4 止咳平喘膜剂对小鼠碳粒廓清速率的影响

取昆明种小鼠50只,雌雄各半,按体重随机分为5组,分组及给药同“2.3”项下。末次给药后1h每鼠尾静脉注射印度墨汁0.1ml/10g,分别在注射后2min和15min各采血20μl,溶于0.1%NaHCO₃溶液2ml中,1h后于650nm波长处测定光密度^[5]。末次采血后,处死小鼠剖取肝脾称湿重,计算廓清指数K和校正廓清指数 α 。

$$K = (\log OD_2 / OD_{15}) / (15-2); \alpha = \frac{3}{k} \times \frac{\text{体重}}{(\text{肝重} + \text{脾重})}$$

结果见表4

Tab 4. Effect of AAF on the carbon clearance rate in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| Groups | Dose (g/animal) | $K \times 10^{-2}$ | α |
|---------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | | 1.49±0.39 | 4.22±0.52 |
| GKC | 0.9 (g/kg ig) | 2.92±0.84 ^{**} | 5.59±0.69 ^{**} |
| AAF | 0.36 | 2.82±0.65 ^{**} | 5.51±0.60 ^{**} |
| | 0.18 | 2.96±0.72 ^{**} | 5.39±0.69 ^{**} |
| | 0.09 | 3.27±1.2 ^{**} | 5.7±1.1 ^{**} |

^{**} $P < 0.01$, vs control

Tab 5. Effect of AAF on contact dermatitis of pinnae with DNCB in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

| Groups | Dose (g/animal) | Before challenge | | After challenge | |
|---------|--------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | | Weight difference(mg) | Inhibitory rate (%) | Weight difference(mg) | Inhibitory rate (%) |
| Control | | 10.3±0.5 | | 12.5±1.0 | |
| GKC | 0.9 (g/kg ig) | 4.9±0.6 ^{**} | 47.7 | 4.7±0.7 ^{**} | 37.3 |
| AAF | 0.36 | 6.0±0.5 ^{**} | 58.1 | 6.9±0.7 ^{**} | 55.1 |
| | 0.18 | 5.8±0.4 ^{**} | 56.0 | 6.6±0.5 ^{**} | 53.0 |
| | 0.09 | 5.3±0.5 ^{**} | 51.4 | 5.9±0.4 ^{**} | 47.0 |

^{**} $P < 0.01$, vs control

由表5可见,AAF高、中、低剂量组及GKC组无论在抗原攻击前给药,还是在抗原攻击后给药均可显著抑制DNCB所致的接触性皮炎($P < 0.01$)。

3 讨 论

AAF高、中、低剂量经皮给药可使蛋清所致豚鼠哮喘和枸橼酸所致豚鼠咳嗽潜伏期明显延长,减少豚鼠5min内咳嗽次数,高、中剂量对小鼠气管酚红分泌具有明显的促进作用,说明该药具有平喘、止咳、祛痰作用。其平喘作用可能与本品所含的黄芩甙、麻黄碱有关,二者均可抑制支气管平滑肌收缩,前者还有抗胆碱、抗组胺作用。该方中黄芩用

由表4可见,AAF高、中、低剂量组及GKC组对小鼠碳粒廓清速率有明显促进作用,碳粒廓清指数及校正廓清指数明显高于阴性对照组($P < 0.01$)。

2.5 止咳平喘膜剂对DNCB所致接触性皮炎的影响

2.5.1 攻击前给药对接触性皮炎的影响 取小鼠50只,雌雄各半,随机分为5组,每鼠颈背部sc7%DNCB丙酮溶液20μl致敏,d4开始给药,给药剂量及方式同“2.3”项下。每日给药1次,连续给7天,末次给药后6h以7%DNCB丙酮溶液30μl涂于小鼠右耳进行攻击,左耳涂同样量的丙酮作为对照,16h后剪下两耳,用直径9mm打孔器打下两耳片,称重,以右耳片的增重表示接触性皮炎的程度^[6],结果见表5

2.5.2 攻击后给药对接触性皮炎的影响

取小鼠50只,雌雄各半,分组及实验方法同“2.5.1”项下,DNCB致敏后d10以7%DNCB丙酮30μl涂于小鼠右耳进行攻击,左耳涂30μl丙酮作对照,各组分别在攻击后立即和4h后给药,攻击后16h剪下两耳,称耳片重量,结果见表5

于肺热咳嗽,干姜可燥湿消痰用于痰饮喘咳,故该膜剂有较好止咳祛痰作用。

本品可加快小鼠碳粒廓清速率,使单核-巨噬细胞的廓清指数K及校正廓清指数 α 明显升高,揭示该药可增强单核-巨噬细胞的吞噬功能,有利于清除体内的致敏颗粒及细菌异物等。另外,无论是抗原攻击前给药还是攻击后给药该膜剂均可显著抑制DNCB所致小鼠的接触性皮炎,提示本品既可抑制IV型变态反应诱导期T淋巴细胞的激活、分化和增殖,又可减少效应期淋巴因子的释放。另外,文献^[7]报道,黄芩中的主要成分黄芩甙和黄芩甙元对豚鼠被动性皮肤过敏反应有抑制作用,并

能抑制过敏性浮肿及炎症,降低小鼠耳廓毛细血管的通透性,这种作用可能与本品抑制 D N C B 的接触性皮炎亦有关。

参 考 文 献

- 1 黄泰康主编. 常用中药成分与药理手册. 上下册. 北京: 中国医药科技出版社. 1999. 1: 178; 1569; 1624
- 2 陈 奇主编. 中药药理研究方法学. 第一版. 北京: 人民卫生出版社. 1993. 9: 649~ 650
- 3 徐叔云, 卞如濂, 陈 修主编. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社. 1991. 11: 1168
- 4 王万青, 杨明华, 蔡华芳. 参芦饮的药理作用. 中药材, 1996, 19(11): 570
- 5 戴 岳, 黄罗生, 冯国雄等. 地肤子对单核巨噬系统及迟发型超敏反应的抑制作用. 中国药科大学学报, 1994, 25(1): 44
- 6 戴 岳, 杭秉茜, 孟庆玉等. 齐墩果醇酸对变态反应的抑制作用. 中国药理学报, 1988, 9(6): 562
- 7 江苏新医学院. 中药大辞典, 下册. 上海: 上海科学技术出版社. 1986. 2019

Pharmacodynamic Study of Antitussive and Antiasthmatic Film (I)

LI Yun-Man, LIU Jian-Ping¹, SUN Yu, LIN G Xiang-Ping

Department of Physiology, Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The pharmacodynamic action of Antitussive and Antiasthmatic Film was studied. The results showed that AAF could significantly prolong the latent time of asthma induced by ovalbumin and that of cough induced by citric acid in guinea pig. It also decreased cough time in guinea pig and promoted secretion of bronchial phenol red in mice. These results suggest that AAF possesses obviously antitussive antiasthmatic and pectoral action. In addition, AAF could markedly increase the carbon clearance rate of macrophage (MΦ) in mice and inhibit the contact dermatitis caused by dinitrochlorobenzene(DN CB) both before and after antigen challenge.

Key words Antitussive and Antiasthmatic Film; Pharmacodynamic study; Carbon clearance rate; Contact dermatitis