

伊犁贝母总生物碱的药效学研究

王林辉¹, 季晖^{1*}, 王长礼¹, 何倩¹, 李萍²

(¹ 中国药科大学药理学教研室; ²生药学教研室, 南京 210009)

【摘要】 目的: 研究伊犁贝母总生物碱的镇咳、祛痰和平喘作用。方法: 以小鼠氯水引咳法、豚鼠枸橼酸引咳法和猫喉上神经刺激引咳法观察其镇咳作用; 以小鼠酚红排泌法、大鼠毛细管排痰法观察其祛痰作用; 以豚鼠乙酰胆碱-组胺引喘法观察其平喘作用。结果: 在 10 mg/kg 剂量下, 十二指肠给药对电刺激猫喉上神经引咳具有显著的镇咳作用。连续灌胃给药 5 d, 伊犁贝母总生物碱在 40, 20, 10 mg/kg 的剂量下对小鼠氯水引咳具有显著的镇咳作用; 在 20, 10 mg/kg 的剂量下对豚鼠枸橼酸引咳具有显著的镇咳作用, 能显著增加大鼠毛细管排痰量; 在 40, 20 mg/kg 的剂量下具有显著增加小鼠酚红排泌量的作用, 对乙酰胆碱-组胺所致的豚鼠哮喘具有显著的平喘作用。结论: 伊犁贝母总生物碱对实验动物具有显著的镇咳、祛痰及平喘作用。

【关键词】 伊犁贝母; 总生物碱; 镇咳; 祛痰; 平喘

【中图分类号】 R285.5; R965

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-5048(2003)02-0172-05

伊犁贝母 *Fritillaria pallidiflora* Schrenk 为百合科(*Liliaceae* L.)贝母属(*Fritillaria* L.)植物, 其鳞茎入药, 味苦、甘、微凉。归肺、心经。具有清热润肺、化痰止咳的功效^[1]。和其他贝母一样, 伊犁贝母被用于治疗咳嗽的单味或复方中药中, 由于伊犁贝母产量高、生物碱的含量在同类贝母中相对较高, 抗病力强和药材价格低廉, 特别是其祛痰、镇咳等生理活性较川贝母略强, 近年来倍受人们的关注^[2~4]。贝母属植物的化学成分主要是生物碱部分和非生物碱部分, 生物碱部分是其主要活性部位^[3], 因此, 本文对伊犁贝母总生物碱进行了镇咳、祛痰及平喘作用研究。

1 实验材料

1.1 动物

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g; SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 150~190 g; 豚鼠, 雌雄兼用, 体重 200~280 g, 由中国药科大学实验动物室提供; 家猫, 雌雄兼用, 体重 2~4 kg, 购于南京市郊区。

1.2 药物与试剂

伊贝总碱(FPA)含量: 总生物碱 71.6%, 其中西贝素(Imperialine)37.0%, 西贝素甙(Imperialine-3β-D-glucoside)26.7%, 由江苏省连云港恒瑞制药

有限公司提供, 批号 990129; 磷酸可待因, 青海制药厂, 批号 991106; 愈创木酚甘油醚, 天津新星制药厂, 批号 991209; 硫酸舒喘灵, 江苏省丹阳市药业有限公司, 批号 980506; 氯化乙酰胆碱, 上海试剂三厂, 批号 980401; 枸橼酸, 无锡民丰试剂厂, 批号 981006; 酚红, 上海试剂三厂, 批号 920220; 乌拉坦, 上海化学试剂厂, 批号 990206; 氯化乙酰胆碱, 上海试剂三厂, 批号 971205; 磷酸组织胺, 上海东风生化厂, 批号 990806。

1.3 仪器

722 光栅分光光度计, 上海第三分析仪器厂; JJC 电刺激仪, 上海国泰仪器厂。

2 方法与结果

2.1 镇咳作用

2.1.1 小鼠氯水引咳法^[5] 取小鼠 75 只, 随机分成 5 组, 每组 15 只(雌雄各 7 或 8 只)。受试药设高、中、低三个剂量组, 给药剂量分别为 40, 20, 10 mg/kg, 用磷酸可待因作为阳性对照药, 剂量为 25 mg/kg, 以上药物均用 0.5%CMC-Na 溶液混悬。阴性对照组给予等容量溶剂(20 ml/kg), 上述各组均灌胃给药 5 d, 每日 1 次。于末次给药后 1, 2, 3 和 4 h 分别将小鼠置于倒置的烧杯中, 下面用 1 ml 浓氯水(25.0%)~

* 【收稿日期】 2002-11-06 【*通讯作者】 Tel: 025-3271250

E-mail: huiji@cpu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号: 30070886)

?1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

28.0%)于沸水浴上蒸发,让氨水蒸汽刺激小鼠至预定时间后,迅速将小鼠取出移至一钟罩内,用听诊器在钟罩口察听小鼠1 min内的咳嗽次数。1 min内出现3次或3次以上典型咳嗽者,称为“有咳嗽”,少于3次者为“无咳嗽”。根据有无咳嗽情况,按序贯法的原理预定下一只小鼠接受氨水刺激的时间,即若前一只小鼠为“有咳嗽”,后一只就用低一级的时间进行刺激,相反若前一只小鼠为“无咳嗽”,后一只就用高一级的时间进行刺激,相邻两个时刻的对数之

差在本实验设计中采用0.1。测定完毕分别求出各给药组和对照组引起半数小鼠咳嗽所需刺激的时间 EDT_{50} ,公式为 $EDT_{50} = \lg^{-1} c/n$ (c为r和x的总和,r为各时间组的动物数,x为接受刺激时间的对数,n为各给药组的动物数)。

求出各组的 EDT_{50} 后,按下列公式算出R值: $R = (\text{给药组的 } EDT_{50} / \text{对照组的 } EDT_{50}) \times 100\%$,凡 $R > 130\%$ 判为有镇咳作用, $R > 150\%$ 则有明显镇咳作用。结果见表1。

Tab 1. Effect of FPA on cough induced by ammonia liquor in mice(n=15)

Groups	Dose (mg/kg)	1 h		2 h		3 h		4 h	
		EDT ₅₀	R(%)						
Control	—	9.7	—	3.5	—	8.9	—	11.2	—
Codeine	25	17.8	183.3	19.3	551.4	12.1	135.9	8.9	79.5
FPA	40	18.2	187.6	13.8	394.3	12.8	143.8	11.0	98.2
	20	19.1	196.9	17.4	497.1	15.1	169.7	11.9	106.3
	10	17.1	176.3	15.6	445.7	9.3	104.5	7.1	63.4

由表1可见,伊贝总碱在40,20,10 mg/kg剂量下对小鼠氨水引咳具有显著的镇咳作用,其中高、中剂量组持续至3 h,低剂量组持续至2 h。

2.1.2 豚鼠枸橼酸引咳法^[5] 动物筛选:取豚鼠若干只,将其逐一置于3 L钟罩内,喷雾23.5%枸橼酸溶液1.5 min,数记自喷雾起7.5 min内咳嗽次数,挑选咳嗽次数多于10次的豚鼠为合格动物进行试验。

将经上述筛选合格的豚鼠40只随机分为5

组,每组8只,受试药设高、中、低三个剂量组,给药量分别为20,10,5 mg/kg,用磷酸可待因作为阳性对照药,剂量为12.5 mg/kg,以上药物均用0.5%CMC-Na溶液混悬。阴性对照组给予等容量溶剂(5 ml/kg),上述各组均灌胃给药,连续5 d。于末次给药后1、2及4 h按上法再分别喷雾23.5%枸橼酸溶液,将各组豚鼠给药后7.5 min内咳嗽次数与阴性对照组进行组间显著性t检验。结果见表2。

Tab 2. Effect of FPA on cough induced by citric acid in guinea pigs($\bar{x} \pm s$, n=8)

Groups	Dose (mg/kg)	Cough times in 7.5 min			
		0 h	1 h	2 h	4 h
Control	-	17.0±4.6	24.1±11.9	20.5±7.2	13.8±4.7
Codeine	12.5	15.8±4.1	5.0±4.3 ***	8.8±6.1 **	8.8±4.5 *
FPA	20	19.0±5.8	9.6±6.1 **	8.3±3.8 ***	7.3±3.4 **
FPA	10	15.6±4.1	10.0±3.9 **	9.4±3.4 **	8.4±3.9 *
FPA	5	17.9±3.6	16.9±4.2	17.0±5.1	12.9±3.2

*P<0.05 * * P<0.01 * * * P<0.001 vs Control

由表2可见,伊贝总碱在20,10 mg/kg剂量下对豚鼠枸橼酸引咳具有显著的镇咳作用,给药后1 h即产生作用,药效持续至4 h。

2.1.3 猫喉上神经刺激法^[3] 将动物随机分为4组,每组6只(雌雄兼用)。受试药组给予伊贝总碱10,5 mg/kg,阳性对照组给予磷酸可待因6 mg/kg,以上药物均用0.5%CMC-Na溶液混悬,阴性对照组给予等容量溶剂(1 ml/kg)。均一次性十二指肠

给药。

实验时将猫用乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉,背位固定于手术台,在甲状软骨附近的颈中线切开皮肤,分离皮下组织,暴露出甲状软骨,找到一侧迷走神经,再沿迷走神经向头端找到结神经节,见到喉上神经由结神经节分出。分离出喉上神经,按上电极,给予轻微刺激,若有咳嗽反应,则证实该神经为喉上神经。

引咳阈值的确定方法: 波宽 0.5 ms、频率 32 Hz、每次刺激时间 10 s、相邻两次刺激的时间间隔不少于 2 min, 在此刺激条件下, 找到恰好使猫发生明显咳嗽(腹肌强烈收缩、喉肌收缩、吐气)的刺激电压值, 若以比其低 0.5V 的电压刺激时不能发生明显咳嗽, 则此电压值即为引咳阈值。观察给药前

(0 h)及给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 8 个时间点的引咳阈值。以给药前、后引咳阈值为观察指标, 进行组内 *t* 检验, 结果见表 3。以给药后各时间点的引咳阈值与给药前的引咳阈值的差值为指标, 进行组间 *t* 检验, 结果见表 4。

Tab 3. Effect of FPA on the stimulating threshold of cough(V) in cats($\bar{x} \pm s$, n=6)

Time(h)	Control	Codeine(6mg/kg)	FPA(10mg/kg)	FPA(5mg/kg)
0	0.88±0.31	1.54±0.75	1.08±0.34	0.67±0.26
0.5	0.96±0.40	4.79±2.46*	1.46±0.84	1.00±0.32
1	1.13±0.38	6.46±3.37*	2.46±1.01*	1.25±0.69
2	1.13±0.59	13.2±7.61**	3.63±1.91*	2.08±1.36
3	1.33±0.52*	14.1±6.52**	4.96±1.93**	5.00±4.16
4	1.75±0.69**	16.5±5.43***	7.46±2.81**	5.92±5.10
5	1.96±0.93*	16.7±5.16***	12.0±6.58**	8.75±6.75*
6	2.54±1.33*	20.0±0.00***	17.9±5.00***	7.08±4.74*

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs before administration

Tab 4. Effect of FPA on the stimulating threshold of cough(V) in cats($\bar{x} \pm s$, n=6)

Time(h)	Control	Codeine(6mg/kg)	FPA(10mg/kg)	FPA(5mg/kg)
0.5	0.08±0.38	3.42±2.84*	0.38±0.80	0.33±0.25
1	0.25±0.27	4.92±3.12*	1.38±1.00*	0.58±0.49
2	0.25±0.42	11.7±7.52*	2.54±1.96*	1.42±1.28
3	0.46±0.33	12.8±6.20**	3.88±1.97**	4.25±4.14
4	0.88±0.49	14.9±5.36**	6.38±2.76**	5.17±5.01
5	1.08±0.92	15.1±5.09***	10.9±6.52*	8.08±6.72
6	1.67±1.13	18.5±0.75***	16.9±5.09***	6.50±4.68

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs Control

结果显示, 伊贝总碱在 10 mg/kg 剂量下, 十二指肠给药对电刺激猫喉上神经引咳具有明显地镇咳作用。给药后 1 h 即产生作用, 药效持续至 6 h。

2.2祛痰作用

2.2.1 小鼠酚红排泌法^[5] 取小鼠 75 只, 随机分为 5 组, 每组 15 只(雌雄各 7 或 8 只)。受试药设高、中、低三个剂量组, 给药量分别为 40, 20, 10 mg/kg, 用愈创木酚甘油醚作为阳性对照药, 剂量为 150 mg/kg, 以上药物均用 0.5%CMC-Na 溶液混悬。阴性对照组给予等容量溶剂(20 ml/kg), 上述各组均连续灌胃给药 5 d, 每日 1 次。末次给药 30 min 后, 腹腔注射 5%酚红溶液, 再过 30 min 后将小鼠脱颈椎处死, 剪开颈部皮肤, 分离气管, 取自甲状软骨处至气管分叉处的气管段, 将其浸泡于 5%碳酸氢钠溶液中, 充分摇匀。于 722 分光光度计 558 nm 处比色测定吸光度。将 OD 值读数在酚红标准曲线

上查出酚红含量(回归方程: $y = 0.1516x + 0.0113$, $r = 0.9997$), 将各组结果与阴性对照组进行组间 *t* 检验, 结果见表 5。

Tab 5. Effect of FPA on the amount of phenol red secretion(PRS) in mice ($\bar{x} \pm s$, n=15)

Groups	Dose (mg/kg)	OD	Amount of PRS ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Control	-	0.132±0.029	0.79±0.19
Guaiphenesin	150	0.237±0.093	1.49±0.61***
FPA	40	0.216±0.068	1.35±0.45***
	20	0.211±0.085	1.32±0.56**
	10	0.156±0.040	0.95±0.26

*P<0.01, **P<0.001 vs Control.

结果可见, 伊贝总碱在 40, 20 mg/kg 的剂量下具有显著增加小鼠酚红排泌量的作用。

2.2.2 大鼠毛细管排痰法^[6] 取大鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。受试药设高、中、

低三个剂量组,给药量分别为20,10,5 mg/kg,用愈创木酚甘油醚作为阳性对照药,剂量为80 mg/kg,以上药物均用0.5%CMC-Na溶液混悬。阴性对照组给予等容量溶剂。上述各组均灌胃给药5 d,每日1次。末次给药后以20%乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉动物,仰位固定,暴露气管,使毛细管(内径0.5 mm)刚好接触气管底部表面,借以吸取气管后部的痰液。当毛细管内被痰液充满或较长时间(3~5 min)不上升时,立即另换一根。以毛细管吸取痰液高度作为评价药物排痰效果的指标,记录2 h的痰液分泌量,进行组间t检验。结果见表6。

Tab 6. Effect of FPA on the amount of phlegm secretion in rats

 $(\bar{x} \pm s, n=10)$

Groups	Dose(mg/kg)	Height of phlegm secretion (cm)
Control	-	33.40±19.97
Guaiphenesin	80	81.39±42.64 **
FPA	20	50.15±9.60 *
FPA	10	67.86±18.92 **
FPA	5	61.56±15.06 **

 $*P < 0.05, **P < 0.01$ vs Control.

结果可见,伊贝总碱在20 mg/kg和10 mg/kg剂量下能显著增加大鼠毛细管排痰量。

2.3 平喘作用^[3]

动物筛选:取豚鼠若干只,逐个放入玻璃钟罩内,用引喘喷雾装置喷入2%氯化乙酰胆碱和0.1%磷酸组织胺混合液15 s,观察豚鼠的引喘潜伏期(从喷雾到哮喘发作,呼吸极度困难,直至抽搐跌倒的时间,引喘潜伏期大于150 s的不选用),作为给药前引喘潜伏期。

正式试验:取经筛选合格的豚鼠48只,随机分成6组,每组8只,分别为伊贝总碱40,20,10,5 mg/kg剂量组,硫酸舒喘灵3 mg/kg组及阴性对照组(0.5%CMC-Na溶液)。各组动物均灌胃给药5 d,每天1次。在末次给药后1 h,同上法测定各组动物的给药后引喘潜伏期(观察时间为360 s,不跌倒者引喘潜伏期以360 s计算)。将各组给药后引喘潜伏期与给药前引喘潜伏期进行组内t检验,各用药组的差值与阴性对照组进行组间t检验。结果见表7。

结果可见:伊贝总碱在40,20,10 mg/kg剂量下对乙酰胆碱-组胺所致的豚鼠哮喘具有显著的平喘作用。

Tab 7. Effect of FPA on asthma induced by acetylcholine chloride and histamine phosphate in guinea pigs($\bar{x} \pm s, n=8$)

Groups	Dose (mg/kg)	Latent period of asthma(s)		
		Before administration	After administration	Difference
Control	-	87.9±30.3	97.0±48.7	9.1±42.1
Salbutamol	3	72.3±25.0	128.4±46.9 **	56.1±39.6
FPA	40	78.8±18.6	211.1±83.5 **	132.4±90.8
	20	79.8±24.9	141.3±47.8 *	61.5±30.1
	10	97.4±25.5	110.0±34.8 *	12.6±13.6
	5	85.1±15.6	88.8±17.0	3.6±9.9

$*P < 0.05, **P < 0.01$ vs before administration; $\# P < 0.05, \#\# P < 0.01$ vs Control.

3 讨论

1) 本文用猫喉上神经刺激引咳法观察到伊犁贝母总生物碱具有明显地镇咳作用,说明其镇咳作用的部位可能在中枢。关于观察指标的选择,汪丽燕等^[7]曾以固定的刺激参数(频率16 Hz、波宽0.5 ms、电压0.3~0.5 V、刺激时间15 s、间隔时间20 min)给予刺激,以咳嗽的次数和强度为观察指标。而本实验在波宽0.5 ms、频率32 Hz、刺激时间10 s的条件下,以引咳电压值(引咳阈值)为观察指标。我们在实验中发现以咳嗽次数与强度为观察指标有不妥之处,由于实验动物为家猫,其个体差异很大,固定的一个刺激条件不一定能使所有的猫都产生典型的连续的咳嗽,同时麻醉的深度难以掌握,较浅或较深的麻醉均使咳嗽阈值不一样。因此固定一个刺激条件不太可行;在15 s中,当刺激达到引咳阈值以上时,猫发生咳嗽的次数一般不超过6次,且强度不等。给镇咳药后,在同样刺激条件下,咳嗽的次数会减少,当药效较强时可不发生咳嗽。因此,咳嗽次数的变化幅度较小,以此作为观察指标不能精确反映药效,以咳嗽强度为指标较可靠,但结果计算较麻烦。以引咳电压值作为观察指标不受上述限制,更能准确方便地反映药效变化。

2) 实验结果表明伊犁贝母总生物碱具有平喘作用,其平喘机理可能与下列因素有关:西贝素是伊犁贝母总生物碱中的一种主要单体生物碱,研究表明西贝素具有松弛离体豚鼠气管和支气管平滑肌的作用^[8],Eglen RM等对西贝素的M受体功能测试和M受体的结合实验表明,西贝素是一个选择性的M₂受体拮抗剂^[9]。徐惠波等研究表明:伊犁贝母总生物碱对流感嗜血杆菌有明显的抑菌作用,其MIC为

6. 25 mg/ml, 对肺炎球菌和金黄色葡萄球菌亦有很好的抑菌作用, 其 MIC 为 12.5 mg/ml, 对甲乙丙型溶血性链球菌的 MIC 为 50 mg/ml。以 200, 400 mg/kg 灌胃给药对二甲苯所致的小鼠耳肿胀具有抑制作用^[4], 其抑菌和抗炎作用对哮喘的治疗也很有益。祛痰实验结果显示伊贝总碱具有增加呼吸道分泌量的作用, 说明其具有稀释性祛痰作用。

本实验表明, 伊犁贝母总生物碱具有镇咳、祛痰及平喘作用, 这与中医的清热润肺、化痰止咳的功效相吻合。呼吸系统的疾病往往咳、痰、喘伴随发生, 在治疗时应综合考虑, 而伊犁贝母总生物碱同时对这些症状都有治疗作用, 这是伊犁贝母被中医用于呼吸系统疾病的原因之一。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国药典[S]. 2000 年版一部. 109-110.
- [2] 徐东铭(Xu DM), 黄恩喜(Huang EX), 王淑琴(Wang SQ), 等. 伊贝母生物碱的研究[J]. 植物学报(Acta Bot Sin), 1990, 32

(10): 789-793

- [3] 李萍(Li P), 季晖(Ji H), 徐国钧(Xu GJ), 等. 贝母类中药的镇咳祛痰作用研究[J]. 中国药科大学学报(J Chin Pharm Univ), 1993, 24(6): 360-362.
- [4] 徐惠波(Xu HB), 孙晓波(Sun XB), 温富春(Wen FC), 等. 伊犁贝母和梭砂贝母生理活性的初步比较[J]. 中国中药杂志(China J China Mater Med), 2000, 7(25): 391-393.
- [5] 徐叔云, 等. 药理实验方法学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1167—1168, 1165, 1182.
- [6] 徐叔云, 等. 药理实验方法学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1360.
- [7] 汪丽燕(Wang LY), 韩传环(Han CH), 王萍(Wang P). 皖贝与川贝和浙贝止咳祛痰的药理作用比较[J]. 安徽医学(Anhui Med J), 1993, 14(3): 57-59.
- [8] 张耀德(Zhang YD), 张发初(Zhang FC), 刘绍光(Liu SG). 贝母之药理研究实验[J]. 中华医学杂志(Natl Med J China), 1935, 21(7): 740-753.
- [9] Eglen RM, Harris GG, Cox H, et al. Characterization of the interaction of the cevane alkaloid, imperialine, at muscarinic receptors *in vitro*. Naunyn-Schmieberg's Archives of Pharmacology, 1992, 346(2): 144-151.

Studies on the Pharmacodynamics of the Crude Alkaloids from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk

WANG Lin-Hui¹, JI Hui¹, WANG Chang-Li¹, HE Qian¹, LI Ping²

¹Department of Pharmacology and ²Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

【ABSTRACT】 AIM: The purpose is to study the pharmacodynamics of the crude alkaloids from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk (FPA). METHOD: The antitussive activities of the crude alkaloids were investigated through testing the cough times induced by ammonium hydroxide in mice, the counts of cough induced by citric acid in guinea pigs before and after administration and the stimulating threshold of cough in cats; The expectorant activities were studied by testing the amount of phlegm secreted in mice and rats. The Asthma suppression effect was also studied by the asthma time induced by acetylcholine chloride and histamine phosphate in guinea pigs. RESULT AND CONCLUSION: The results showed the antitussive, expectorant activities and asthma suppression effect of the crude alkaloids are very significant.

【KEY WORDS】 *Fritillaria pallidiflora* Schrenk; Crude alkaloids; Antitussive action; Expectorant effect; Asthma suppression effect

【FOUNDATION ITEM】 This project was supported by National Natural Science Foundation of China(No.30070886)