

($P < 0.01$),但未达到正常水平 ($P < 0.05$); $0.01 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 前荷叶碱能明显减少细胞凋亡的发生,与 Ang II 组相比差异有显著性 ($P < 0.05$),以 $1 \mu\text{mol/L}$ 作用最强 ($P < 0.01$),但与空白对照组相比均未能达到正常水平 ($P < 0.05$)。

4 讨论

Ang II 是肾素-血管紧张素-醛固酮(RAS)系统中主要的生物活性物质,是强有力的血管收缩剂,在血管内外平衡、内膜的形成及心肌梗死后的重塑中有重要的作用,可刺激活性氧(ROS)的产生,诱导血管内皮细胞发生凋亡^[3]。而血管内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化等多种心血管疾病发生的始动环节。Ang II 在体内能上调黏附分子表达,激活巨噬细胞趋化因子和纤溶酶原活化因子抑制剂-1 (PAI-1),促进平滑肌细胞的增殖和迁移,促使内皮功能失调。它通过促进 DNA 的氧化,使 Ser15 和 Ser20 磷酸化,从而激活 p53,同时激活 NADPH 氧化酶,产生大量自由基而触发凋亡^[4]。血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)卡托普利、依那普利等通过增强 eNOS 的活性,增加 NO 的生成,抑制 caspase 级联反应,以及恢复和稳定 eNOS 与热休克蛋白 90 (HSP90) 之间的关系,进而抑制 Ang II 诱导的内皮细胞凋亡^[5~7]。

本实验用培养的 HUVECs,观察前荷叶碱对 Ang II 诱导内皮细胞凋亡的影响,及其是否通过增加 NO 的生成而起作用。结果发现,Ang II 可明显降低 ECV304 细胞活性,显著诱导内皮细胞发生凋亡,这与 Lin 等^[5]的研究相似。同时还发现 Ang II 降低 tNOS 的活性,同时减少 HUVECs 分泌 NO,但与空白对照组相比差异无显著性,这与 Desideri

等^[8]研究发现 Ang II 可激活内皮细胞 NADPH 氧化酶,促使 ROS 产生,从而削弱 NOS 的活力,减少 NO 的分泌及生物利用度的结果相似。而前荷叶碱能显著增强 tNOS 的活性,而对 iNOS 的活性无明显影响,从而增加 HUVECs 分泌 NO;同时前荷叶碱能部分拮抗 Ang II 诱导内皮细胞凋亡,上述两种作用在前荷叶碱浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时最强。说明低浓度前荷叶碱通过增强 tNOS 的活性尤其是 eNOS 活性来增加 HUVECs 分泌 NO,抑制 Ang II 刺激 ROS 的产生,从而减少 Ang II 诱导 HUVECs 凋亡,发挥其保护内皮细胞的功能。

References:

- [1] Kunitomo J. Alkaloids of *Nelumbo nucifera* [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12: 699.
- [2] Xiao H, Chen A H, Ji A M, et al. Effects of pronuciferine on NO and NOS production in cultured human umbilical vein endothelium cells [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(6): 503-505.
- [3] Dimmeler S, Zeiher A M. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and proatherosclerotic factor [J]. *Regul Pept*, 2000, 90: 19-25.
- [4] Grishko V, Pastukh V, Solodushko V, et al. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(6): H2364-2372.
- [5] Lin L Y, Lin C Y, Su T C, et al. Angiotensin II-induced apoptosis in human endothelial cells is inhibited by adiponectin through restoration of the association between endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 90 [J]. *FEBS Lett*, 2004, 574(1-3): 106-110.
- [6] Fahry R D, Carretero O A, Ho K L, et al. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation [J]. *Circ Res*, 1993, 72: 1202-1210.
- [7] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, et al. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide [J]. *Circ Res*, 1997, 81(6): 970-976.
- [8] Desideri G, Bravi M C, Tucci M, et al. Angiotensin II inhibits endothelial cell motility through an AT1-dependent oxidant-sensitive decrement of nitric oxide availability [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(7): 1218-1223.

甘草黄酮对辣椒素诱导豚鼠咳嗽反射的抑制作用

朱一亮, 谢强敏*, 陈季强, 张水娟

(浙江大学医学院 国家食品药品监督管理局呼吸药物实验室, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 观察甘草黄酮的镇咳作用及机制。方法 用辣椒素气雾吸入诱导豚鼠咳嗽反射, MedLab 生物信号采集处理系统记录咳嗽次数。结果 甘草黄酮 30、100 和 300 mg/kg ig 给药剂量依赖地抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射, 与模型组比较咳嗽次数分别减少 32.7%、49.3% 和 59.6% ($P < 0.01, 0.001$); 甘草黄酮 100 mg/kg ig 给

收稿日期: 2005-11-22

基金项目: 浙江省科技厅重点攻关项目 (2006C23009)

作者简介: 朱一亮 (1979—), 男, 浙江省桐乡市人, 浙江大学医学院硕士, 研究方向为抗哮喘药物和镇咳药物的研发与理论研究。

Tel: (0571) 87230584 E-mail: ionejob@126.com

* 通讯作者 谢强敏 E-mail: xieqm@zju.edu.cn

药 1、4、6 h 可显著抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射次数 ($P < 0.01, 0.05$), 作用 8 和 12 h 对咳嗽反射无显著影响 ($P > 0.05$)。纳洛酮 0.3 mg/kg (ip) 可部分阻断甘草黄酮的作用, 马来酸麦角新碱 3 mg/kg (ip) 或格列本脲 20 mg/kg (ip) 不能阻断甘草黄酮的作用。结论 甘草黄酮呈剂量依赖方式抑制辣椒素引起的豚鼠咳嗽反射, 甘草黄酮 (100 mg/kg, ig) 作用持续时间为 6 h 以上。纳洛酮部分阻断甘草黄酮的作用, 表明甘草黄酮可能间接影响内源性的阿片系统。

关键词: 甘草黄酮; 镇咳; 辣椒素; 豚鼠

中图分类号: R286.42

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)07-1048-04

Inhibition of flavone from *Glycyrrhiza uralensis* on capsaicin-induced cough reflex in guinea pig

ZHU Yi-liang, XIE Qiang-min, CHEN Ji-qiang, ZHANG Shui-juan

(Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of State Food and Drug Administration of China,

College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: Objective To investigate the antitussive activity and action sites of flavone from *Glycyrrhiza uralensis* (FGU) in guinea pig. **Methods** Cough reflex was induced by capsaicin aerosol in guinea pigs. The cough number of times was recorded by MedLab data adoption system. **Results** FGU 30, 100, and 300 mg/kg (ig) inhibited capsaicin-induced cough reflex in a dose-dependent manner. Inhibitory rates of cough reflex were 32.7%, 49.3%, and 59.6%, respectively. There was a significantly different comparison with those of model group ($P < 0.01, 0.001$, respectively). FGU 100 mg/kg markedly decreased cough reflex number of times induced by capsaicin at 1, 4, and 6 h after ig administration ($P < 0.01, 0.05$), but had no effect at 8 and 12 h ($P > 0.05$). Pretreatment with Naloxone (0.3 mg/kg, ip) partly blocked the effects of FGU, but neither methysergide (3 mg/kg, ip) nor glibenclamide (20 mg/kg, ip) worked. **Conclusion** FGU inhibits capsaicin-induced cough reflex in guinea pig in a dose-dependent manner. FGU (100 mg/kg, ig) had a continuous antitussive effect more than 6 h. Partly block effect of Naloxone on FGU suggests that FGU might indirectly influence endogenous opium system.

Key words: flavone from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (FGU); antitussive; capsaicin; guinea pig

甘草系豆科多年生草本植物。甘草的镇咳作用被世人沿用千年, 至今仍为呼吸系统疾病常用药, 但多以复方配伍使用, 单独使用甘草或甘草黄酮的镇咳药理研究报道很少。Anderson 等^[1]报道甘草酸及其衍生物具有镇咳活性。俞腾飞等^[2]报道甘草黄酮、甘草浸膏及甘草次酸对氨水和二氧化硫诱导的小鼠咳嗽有抑制作用。吴勇杰^[3]报道甘草次酸钠抑制氨水诱导的小鼠咳嗽反应。咳停片是一个含有甘草流浸膏和甘草浸膏的多成分复方制剂, 被证明其对枸橼酸雾化吸入或电刺激喉上神经引起的豚鼠咳嗽反射具有明显抑制作用^[4]。痰咳宁也是一个含有甘草成分的复方制剂, 它对枸橼酸雾化吸入引起的豚鼠咳嗽反射以及辣椒素雾化吸入引起的小鼠咳嗽反射同样具有很强的抑制作用^[5]。本实验研究甘草黄酮(以甘草苷和甘草苷芹糖为主要成分)对辣椒素雾化吸入引起的豚鼠咳嗽反射的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 辣椒素, 批号 123H78341; 盐酸纳洛酮, 批号 446754/1; 马来酸麦角新碱, 批号 073k1279;

格列本脲, 批号 123k1062; 以上试剂均购于 Sigma 公司。可待因, 批号 220103, 青海制药厂。甘草药材购于杭州中药材公司, 经本校药学院生药教研室鉴定为甘草 *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch.。

1.2 甘草黄酮的制备: 甘草(乌拉尔甘草), 新疆产, 2 年以上生长期。取 10 kg 甘草, 粉碎, 水提两次, 定容为 60 L, 经 Diaion HP20 柱, 然后用 40 L 水提, 再用 50% 甲醇 40 L 提取, 干燥后得 250 g 提取物, 经 HPLC 测定主要成分为甘草黄酮, 含总黄酮 50% 以上, 不含甘草酸。

1.3 辣椒素溶液的配制: 称取辣椒素 7.5 mg, 放入 10% 乙醇 (1 mL) 和 10% 聚山梨酯 80 (1 mL) 的混合液中, 然后在研钵内研磨至完全溶解, 再用生理盐水稀释至 50 mL 备用。

1.4 动物: 豚鼠, 300~400 g, 雌雄不拘, 购于浙江大学医学院实验动物中心, 合格证号 220010014。

1.5 仪器: 体积描记盒、差压换能器 (Motorola)、计算机 (Pentium III, 128M/30G)、MedLab 生物信号采集处理系统 (MedLab V5.0.0, 南京美易公司)、动物肺机械功能测定仪、Parimaster 压缩吸入

机(德国)。

2 方法

2.1 引咳方法:将豚鼠置于 20 cm×10 cm×10 cm 描记盒中,稳定 1 min 后,用压缩吸入机气雾 0.015% 辣椒素溶液(对照组用生理盐水代替) 10 min,生物信号采集处理系统记录自气雾开始到结束的咳嗽次数。

2.2 实验设计

2.2.1 量效实验:豚鼠 81 只,随机分 6 组,每组动物数见表 1。除模型组和对照组 ig 生理盐水 1 mg/kg 外,其余组分别 ig 甘草黄酮 30、100 和 300 mg/kg,可待因 10 mg/kg,给药后 1 h 气雾辣椒素引咳。

2.2.2 时效实验:豚鼠 81 只,随机分为 7 组,每组动物数见表 2。除模型组和对照组 ig 生理盐水外,各给药组 ig 甘草黄酮 100 mg/kg,分别于给药后 1、4、6、8 和 12 h 气雾辣椒素引咳。

2.2.3 作用机制分析实验:豚鼠 81 只,随机分为 9 组,每组动物数见表 3。分别为对照组、模型组、甘草黄酮组、纳洛酮+甘草黄酮组、麦角新碱+甘草黄酮组、格列本脲+甘草黄酮组、可待因组、纳洛酮+可待因组和麦角新碱+可待因组。甘草黄酮各组在 ig 甘草黄酮 100 mg/kg 前 30 min (格列本脲+甘草黄酮为 5 min) 分别 ip 生理盐水、纳洛酮(0.3 mg/kg)、麦角新碱(3 mg/kg) 或格列本脲(20 mg/kg)。可待因各组 ig 可待因 10 mg/kg 前 30 min 分别 ip 生理盐水、纳洛酮(0.3 mg/kg) 或麦角新碱(3 mg/kg),对照组和模型组均用生理盐水代替。ig 给药后 1 h 气雾辣椒素引咳。

2.3 统计学处理:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *T* 检验或 *U* 检验。

3 结果

3.1 量效关系:对照组豚鼠气雾生理盐水 10 min,未见豚鼠有咳嗽反射;模型组气雾辣椒素 10 min,平均咳嗽次数达 22 次。甘草黄酮 30、100 和 300 mg/kg 呈剂量依赖方式抑制辣椒素引起的咳嗽反射,甘草黄酮 300 mg/kg 与可待因 10 mg/kg 镇咳作用相当,见表 1。

3.2 时效关系:与模型组比较,甘草黄酮 100 mg/kg 给药后 1、4 和 6 h 咳嗽次数明显减少,其中给药后 1 h 镇咳作用最强,差异显著 ($P < 0.01$),见表 2。

3.3 受体拮抗剂对甘草黄酮和可待因抑制辣椒素诱导豚鼠咳嗽反射作用的影响:纳洛酮+甘草黄酮组与甘草黄酮组比较,抑制率降低,但无统计学差异 ($P > 0.05$),提示纳洛酮可能部分阻断甘草黄酮的

镇咳作用。麦角新碱和格列本脲对甘草黄酮的抑制作用则无明显影响。纳洛酮明显降低可待因的抑制率,且差异非常显著 ($P < 0.001$),而麦角新碱则不能降低可待因的抑制率 ($P > 0.05$),见表 3。

表 1 不同剂量甘草黄酮对辣椒素诱导豚鼠咳嗽反射的作用

Table 1 Effect of FGU in different doses on capsaicin-induced cough reflex in guinea pig

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	咳嗽反射/(次·10 min ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	12	0.0±0.0	—
模型	—	18	22.3±5.5△△△	0
甘草黄酮	30	13	14.9±8.2**	32.7
	100	14	11.3±6.0***	49.3
	300	12	9.0±6.2***	59.6
可待因	10	12	5.3±5.2***	76.2

与对照组比较:△△△ $P < 0.001$

与模型组比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

△△△ $P < 0.001$ vs control group

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

表 2 甘草黄酮作用不同时间对辣椒素诱导豚鼠咳嗽反射作用的影响

Table 2 Time-dependent effect of FGU on capsaicin-induced cough reflex in guinea pig

组别	作用时间/h	动物/只	咳嗽反射/(次·10 min ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	12	0.0±0.0	—
模型	—	9	19.9±5.8△△△	0
甘草黄酮	1	14	11.3±6.0**	43.2
	4	12	13.3±6.4*	33.2
	6	10	13.4±1.3*	32.7
	8	12	18.7±8.0	6.0
	12	12	19.2±4.4	3.5

与对照组比较:△△△ $P < 0.001$

与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

△△△ $P < 0.001$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 3 受体拮抗剂对甘草黄酮抑制辣椒素诱导豚鼠咳嗽反射作用的影响

Table 3 Influence of several receptor antagonists FGU effect on capsaicin-induced cough reflex in guinea pig

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	咳嗽反射/(次·10 min ⁻¹)	抑制率/%
对照	—	10	0.0±0.0	—
模型	—	10	22.6±2.7△△△	0
甘草黄酮	100	14	11.3±6.0***	50.0
纳洛酮+甘草黄酮	0.3+100	10	14.2±4.7***	37.2
麦角新碱+甘草黄酮	3+100	6	10.7±4.9***	52.7
格列本脲+甘草黄酮	20+100	10	12.4±5.7***	45.1
可待因	10	10	8.1±5.5***	64.1
纳洛酮+可待因	0.3+100	5	20.4±6.1###	9.7
麦角新碱+可待因	3+10	6	6.8±1.9***	69.9

与对照组比较:△△△ $P < 0.001$; 与模型组比较:*** $P < 0.001$; 与可待因组比较:### $P < 0.001$

△△△ $P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group; ### $P < 0.001$ vs codeine group

4 讨论

甘草黄酮类物质具有较强的生物活性,近年发现甘草黄酮类化合物具有抗 HIV、抗肿瘤等药理作用^[6]。本实验研究的甘草黄酮提取物主要成分是黄酮(含总黄酮 50% 以上),并且已经明确甘草苷和甘草苷芹糖是其中最重要的镇咳成分。

辣椒素是一种 C 神经纤维的兴奋剂,它与其受体类香草受体-1 (vanilloid receptor 1, VR1) 结合兴奋气道黏膜和肺组织的 C 纤维导致咳嗽反射,并可促使 C 纤维末梢释放速激肽和神经肽进入肺组织,导致气道平滑肌收缩和黏膜水肿,这一作用也可间接地导致快适应受体激活而引起咳嗽反射^[7]。本实验结果表明分离获得的甘草黄酮呈剂量依赖性抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射,与模型组比较咳嗽次数明显减少,300 mg/kg 甘草黄酮与 10 mg/kg 可待因作用强度相当;甘草黄酮 100 mg/kg 一次 ig 给药,作用时间可维持 6 h 以上。本实验还采用受体阻断法,进一步观察甘草黄酮可能的作用机制,结果发现纳洛酮 0.3 mg/kg 可部分阻断甘草黄酮的镇咳作用,同样剂量纳洛酮可完全阻断可待因的镇咳作用,提示甘草黄酮可能不是通过阿片受体,至少不是完全通过阿片受体起镇咳作用的,而有可能是抑制了能引起内源性阿片释放的物质,如神经肽(P 物质、神经激肽-1、神经激肽-2 和神经激肽-3 等),因为内源性阿片释放和阿片受体敏感性受神经肽等递质的调节^[8],并已明确神经肽-1 和神经肽-2 选择性拮抗剂可抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射^[9]。另一种可能是甘草黄酮能直接促进内源性阿片的释放,内源性阿片的增加是否会引起成瘾性尚不清楚,但中医长期依赖应用甘草迄今尚无成瘾性的报道。

离子通道阻滞剂也是新的镇咳药物研究方向^[10]。周围镇咳药莫吉司坦(moguisteine)呈剂量依赖方式抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射,这一作用可被 ATP 敏感的钾离子通道阻滞剂格列本脲所阻断,表明莫吉司坦可能通过钾离子通道显示其镇咳作用^[11]。本实验中格列本脲不能阻断甘草黄酮,提示甘草黄酮的镇咳作用可能不通过 ATP 敏感的钾离子通道。

5-羟色胺(5-HT)在咳嗽反射中有调节作用。对人体,5-HT 缓慢静脉滴注可抑制辣椒素诱导的咳嗽反射^[12],也可抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射^[13],但 Van-wyk 等^[14]发现用 5-HT_{A1}激动药丁螺环酮不能抑制辣椒素诱导正常志愿者的咳嗽反射,5-HT₁受体拮抗药麦角苄酯和 5-HT₂受体拮抗药

pisotifen 对辣椒素诱导正常志愿者的咳嗽反射也无任何影响。本实验结果显示麦角新碱(5-HT 受体拮抗药)对甘草黄酮和可待因抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射无明显阻断作用,至少表明甘草黄酮的镇咳作用也不是通过 5-HT 受体调节,尽管 5-HT 受体在咳嗽反射中有调节作用尚有争议。

综上所述结果表明甘草黄酮能很强烈地抑制辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射,作用时间可持续 6 h 以上。推测其作用机制可能是通过直接阻断 VR1 受体或间接影响内源性阿片释放,但其具体作用机制仍有待研究。

References:

- [1] Anderson D M, Smith W G. The antitussive activity of glycyrrhetic acid and its derivatives [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1961, 13: 396-404.
- [2] Yu T F, Tian X D. Antitussive and expectorative effect of glycyrrhizic flavones, glycyrrhizic extract, and glycyrrhetic acid [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1993, 15(3): 32-33.
- [3] Wu Y J. A pharmacologic study of the antitussive, anti-expectorative and lowering airway resistance actions of sodium glycyrrhetinate [J]. *J Lanzhou Med Coll* (兰州医学院学报), 1996, 22(2): 23-26.
- [4] Li Z M, Xie Q M, Guo L, et al. The antitussive effect of Keting Tablets and analysis of the prescription [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2002, 19(2): 98-100.
- [5] Zheng X, Xie Q M, Shen W H, et al. Antitussive effect of Tankening Tablets and analysis of its prescription [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2002, 13(3): 281-283.
- [6] Xing G X, Li N, Wang T, et al. Advances in studies on flavonoids of licorice [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 593-597.
- [7] Udem B J, Carr M J, Kollarik M. Physiology and plasticity of putative cough fibres in the guinea pig [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2002, 15(3): 193-198.
- [8] von Zastrow M. Opioid receptor regulation [J]. *Neuromolecular Med*, 2004, 5(1): 51-58.
- [9] Bolser D C, DeGennaro F C, O'Reilly S, et al. Central antitussive activity of the NK1 and NK2 tachykinin receptor antagonists, CP-99, 994 and SR 48968, in the guinea pig and cat [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(2): 165-170.
- [10] Chung K F. Cough: potential pharmacological developments [J]. *Exp Opin Invest Drugs*, 2002, 11(7): 955-963.
- [11] Morita K, Kamei J. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the anti-tussive effect of moguisteine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 395(2): 161-164.
- [12] Stone R A, Worsdell Y M, Fuller R W, et al. Effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan infusion on the human cough reflex [J]. *J Appl Physiol*, 1993, 74(1): 396-401.
- [13] Stone R A, Fuller R W, Chung K F, et al. Effects of 5-HT_{A1}-agonist on cough responses and breathing in conscious, unrestrained guinea-pigs [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145 (Suppl): A616.
- [14] van-wyk M, Sommers D K, Snyman J R. Effects of metergoline or pisotifen on capsaicin-induced cough in normal volunteers treated with buspirone [J]. *Cur Therap Res*, 1997, 58(3): 176-179.