

亡。因此推测这可能是小檗碱诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制之一。

参考文献:

- [1] 林 菁. 小檗碱对 K562 细胞生长的抑制作用 [J]. 福建医科大学学报, 1996, 30(4): 309-312.
- [2] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of *Coptidis Rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. *Cancer Letters*, 2000, 148(1): 19-25.
- [3] Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, et al. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 1999, 66 (2): 227-233.
- [4] 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 等. 小檗碱对人胃癌 MGC-803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 40-43.
- [5] Li Y, Bhuiyan M, Mohammad R M, et al. Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA [J]. *Oncogene*, 1998, 17(22): 2915-2920.

化州柚提取物止咳作用及其机制的研究

李沛波, 苏 畅, 毕福均, 王永刚, 彭 维, 苏薇薇*

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 目的 探讨化州柚提取物止咳作用及其机制的研究。方法 采用辣椒素致豚鼠咳嗽模型, 观察化州柚提取物对豚鼠咳嗽次数及气管内 C 纤维 P 物质释放的影响; 采用电刺激猫喉上神经引咳模型, 观察化州柚提取物对电刺激猫喉上神经引咳的电压阈值的影响; 采用机械刺激致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽模型, 观察化州柚提取物对机械刺激致豚鼠咳嗽的影响。结果 化州柚提取物能明显抑制辣椒素所致豚鼠咳嗽, 但对辣椒素诱导的气管内 C 纤维 P 物质的释放不产生明显影响; 对电刺激猫喉上神经引咳的电压阈值无显著影响; 对机械刺激致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽有显著抑制作用。结论 化州柚提取物具有明显止咳作用, 但不产生中枢性镇咳, 其止咳机制不是通过抑制气管内 C 纤维 P 物质释放, 但与快速适应性肺部牵张感受器 (RARs) 有关。

关键词: 化州柚; 止咳; 辣椒素

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0247-04

化州柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck var. *tormentosa* Hort 又称化州仙橘, 系芸香科柑桔属植物, 为柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的栽培变种, 主产于广东化州, 是广东的地道药材。化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮经加工即为中药化橘红, 习称“毛橘红”, 具有化痰、理气、健胃、消食之功效, 用于治疗胸中痰滞, 咳嗽气喘, 呕吐呃逆, 饮食积滞等症。本课题组已有研究报道: 化州柚提取物能明显抑制氨水所致小鼠咳嗽和枸橼酸所致豚鼠咳嗽, 具有明显止咳作用^[1]; 化州柚提取物还具有明显的抗炎作用^[2]。本研究在原研究基础上进一步探讨其止咳作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂: 化州柚提取物 (由中山大学广州现代中药质量研究开发中心提供, 黄酮类成分占 70% 以上); 磷酸可待因, 青海制药厂, 批号 20051212; 氯醛糖, A Johnson Matthey Company 生

产; 辣椒素, 湖北襄西化工厂生产; P 物质测定试剂盒, Adlitteram Diagnostic laboratories Inc; 硫酸阿托品注射液, 郑州羚锐制药有限公司, 规格 0.5 mg/mL, 批号 0506196; 氨茶碱注射液, 广州明兴制药有限公司, 规格 0.125 g/mL, 批号 050701; 莫吉司坦, 北京华奉联博科技有限公司, 质量分数 ≥ 99.0%, 批号 HF0501012; 乌拉糖, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 动物: 豚鼠, 体重 300~450 g, 由南方医科大学提供, 动物合格证号: 粤监证字 2007A 005; 家猫, 体重 2.0~3.0 kg, 购于从化动物养殖场。

1.3 仪器: BL—420E 泰盟生理记录仪, 成都泰盟仪器厂生产; CC2170A 超声雾化器, 中外合资成都维信电子科大新技术有限公司产品; Wellsan MK3 酶标仪, Labsystem S D ragon。

1.4 方法

1.4.1 对辣椒素所致豚鼠咳嗽的影响^[3]: 取豚鼠

收稿日期: 2007-06-29

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BA106A 02-02)

作者简介: 李沛波 (1973—), 男, 湖南涟源人, 药理学博士, 讲师, 研究方向为心血管药理学和新药研发。

Tel: (020) 84110808 E-mail: lipb73@yahoo.com.cn

* 通讯作者 苏薇薇 Tel: (020) 84110808 E-mail: lssww@126.com

100 只, 于实验前 1 天将其逐一置于 6 L 聚乙烯容器内, 用超声雾化器喷入浓度为 0.3 mol/L 的辣椒素溶液, 雾化速率为 0.7 mL/min, 雾化 2 min, 观察并记录 10 min 内豚鼠咳嗽次数, 挑选咳嗽次数多于 10 次的豚鼠为合格动物用于实验。取合格豚鼠 50 只, 随机分为 5 组: 对照组, 化州柚提取物低、中、高剂量 (12、24、48 mg/kg) 组, 阳性对照药物 (磷酸可待因 10 mg/kg) 组, 每组 10 只, 实验前禁食不禁水 12 h, 然后按 1 mL/100 g ig 给药, 对照组给予等体积蒸馏水, 给药后 1 h, 按前法用辣椒素引咳。观察并记录豚鼠的咳嗽潜伏期和 10 min 内咳嗽次数。

1.4.2 对电刺激猫喉上神经所致咳嗽的影响^[4]: 取健康猫, 随机分为对照组, 化州柚提取物低、中、高剂量 (11.5、23.0、46.0 mg/kg) 组, 阳性对照药物 (磷酸可待因 7.2 mg/kg) 组, 每组 6 只, 雌雄兼用。实验时以 1% 氯醛糖按 30 mg/kg ip 麻醉, 将猫背位固定于手术台上, 用玻璃分针分离出喉上神经, 安置铂丝电极, 连接于刺激器, 在电极和神经表面涂少许低熔点石蜡, 同时, 暴露部分腹直肌与生理记录仪的拉力换能器相连。用电刺激喉上神经 (刺激参数: 频率 32 Hz/s, 脉冲宽度 0.5 ms, 连续刺激 5 s, 两次刺激时间间隔 5 min, 刺激电压由 0.2 V 开始逐渐递增), 直至出现咳嗽, 记录每只猫的引咳电压阈值。然后, 各组动物 ig 给药, 对照组给予等体积蒸馏水, 于给药后 0.5、1、2、3、4、5 h 时分别以前述同样参数测定引咳电压阈值。

1.4.3 对机械刺激所致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽的影响^[4~6]: 取豚鼠 50 只, 分 4 天 sc 100 mg/kg 辣椒素进行脱敏, 具体脱敏方法如下: 第 1~4 天内分别按剂量 10、20、30、40 mg/kg sc 辣椒素, 注射剂量共 100 mg/kg。在注射辣椒素前 15 min, 先 sc 硫酸阿托品 (1 mg/kg) 和 ig 氨茶碱 (25 mg/kg) 预处理, 以预防辣椒素对豚鼠呼吸的损害。注射完最后 1 次辣椒素后, 将豚鼠随机分为模型组, 化州柚提取物低、中、高剂量 (12、24、48 mg/kg) 组, 阳性对照药物 (莫吉司坦 10 mg/kg) 组, 1 周后, 对豚鼠进行机械刺激引咳, 方法如下: 用 20% 乌拉糖 (1.0 g/kg) ip 进行麻醉, 切开颈部皮肤, 分离气管, 于第 5 和第 6 个气管环间开一小孔, 插入刺激用猪鬃毛, 找到刺激敏感部位后, 化州柚提取物组 ig 给药, 阳性组 sc 给药。于给药后 30、60、90 min 对气管壁作反复机械刺激, 频率为 1 次/s, 时间为 10 s, 观察动物 10 min 内的咳嗽次数。

1.4.4 对辣椒素所致咳嗽豚鼠气管 C 纤维 P 物质

释放的影响^[7]: 按 1.4.1 项方法筛选出对辣椒素致咳敏感的合格豚鼠 50 只, 按体重随机分为正常组, 模型组, 化州柚提取物低、中、高剂量 (12、24、48 mg/kg) 组, 每组 10 只。然后按 1 mL/100 g ig 给药, 正常组和模型组给予等体积蒸馏水。给药 1 h 后, 除正常组外, 其余豚鼠按 1.4.1 项方法造成辣椒素致豚鼠咳嗽模型。然后立即深度麻醉豚鼠 (戊巴比妥钠, 50 mg/kg, ip), 用气管套管注射 5 mL 冰冷的生理盐水于气管, 共灌洗 2 次。收集支气管肺泡灌洗液 (BALF), 在 4 °C 环境下 3 000 r/min 离心 10 min, 分离出上清液, 冻干, 转移入 0.5 mL 用于定量测定的缓冲液中, 进行 P 物质酶联免疫吸附剂测定。根据实验前所建立的标准曲线算出 BALF 中 P 物质的量。

1.4.5 统计学处理: 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对辣椒素所致豚鼠咳嗽的影响: 由表 1 可见, 化州柚提取物的中、高剂量组的咳嗽次数与对照组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 说明化州柚提取物能抑制辣椒素所致豚鼠咳嗽, 提示化州柚提取物具有明显止咳作用。

表 1 化州柚提取物对辣椒素所致豚鼠咳嗽的影响 ($n = 10$)

Table 1 Effect of extract from *C. grandis var. tomentosa* on capsaicin-induced coughing in guinea pig ($n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	咳嗽次数	镇咳率/%
对照	-	16.2 ± 3.6	-
磷酸可待因	10	5.6 ± 2.8**	65.4
化州柚提取物	12	11.9 ± 4.3	26.5
	24	6.8 ± 3.5**	58.0
	48	5.9 ± 3.2**	63.6

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

2.2 对电刺激猫喉上神经引咳电压阈值的影响: 由表 2 可见, 给药后磷酸可待因组各个时间点的电压阈值与对照组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 而化州柚提取物低、中、高剂量组各个时间点的电压阈值与对照组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 说明化州柚提取物对电刺激猫喉上神经所致咳嗽无明显抑制作用, 提示化州柚提取物不是通过中枢性镇咳方式而产生镇咳作用。

2.3 对机械刺激所致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽的影响: 由表 3 可见, 给药后莫吉司坦组各时间点的咳嗽次数与模型组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 而化州柚提取物低、中、高剂量组在给药后的咳嗽次数与模

表 2 化州柚提取物对电刺激猫喉上神经所致咳嗽的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 2 Effect of extract from *C. grandis* var. *tomentosa* on coughing induced by electrical stimulation of laryngeal nerve in cat ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	电刺激猫喉上神经引咳的电压阈值/V						
		给药前	给药后 0.5 h	给药后 1 h	给药后 2 h	给药后 3 h	给药后 4 h	给药后 5 h
对照	-	0.80 ± 0.31	1.05 ± 0.20	1.12 ± 0.28	1.15 ± 0.24	1.25 ± 0.40	1.34 ± 0.36	1.53 ± 0.56
磷酸可待因	7.2	0.69 ± 0.11	1.80 ± 0.25**	2.98 ± 0.38**	3.82 ± 0.42**	4.87 ± 0.23**	5.83 ± 0.37**	7.23 ± 0.44**
化州柚提取物	11.5	0.70 ± 0.16	0.79 ± 0.13	0.82 ± 0.24	0.96 ± 0.21	1.15 ± 0.35	1.36 ± 0.25	1.44 ± 0.47
	23.0	0.91 ± 0.32	0.97 ± 0.31	1.08 ± 0.37	1.24 ± 0.48	1.35 ± 0.41	1.41 ± 0.54	1.67 ± 0.63
	46.0	0.75 ± 0.25	0.87 ± 0.32	0.98 ± 0.36	1.08 ± 0.33	1.21 ± 0.47	1.32 ± 0.46	1.65 ± 0.51

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 3 化州柚提取物对机械刺激所致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of extract from *C. grandis* var. *tomentosa* on coughing induced by mechanical stimulation of trachea in capsaicin-desensitized guinea pig ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	咳嗽次数			
		给药前	给药后 30 min	给药后 60 min	给药后 90 min
模型	-	8.13 ± 2.76	8.05 ± 1.83	7.70 ± 1.77	7.23 ± 2.08
莫吉司坦	10	7.76 ± 1.94	4.20 ± 0.92*	4.21 ± 1.03**	3.92 ± 1.29**
化州柚提取物	12	7.88 ± 2.11	5.27 ± 1.81*	5.32 ± 1.27*	5.05 ± 0.95*
	24	8.09 ± 2.25	4.90 ± 1.10*	5.01 ± 1.25**	4.39 ± 1.07**
	48	7.97 ± 1.45	4.87 ± 1.45**	4.30 ± 1.83**	4.11 ± 1.10**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

型组比较, 差异显著 ($P < 0.01, 0.05$), 说明化州柚提取物对机械刺激所致辣椒素脱敏豚鼠咳嗽有抑制作用, 提示化州柚提取物的镇咳作用可能与快速适应性肺部牵张感受器 (RARs) 有关。

2.4 对辣椒素所致咳嗽豚鼠气管 C 纤维 P 物质释放的影响: 由表 4 可见, 辣椒素可以明显促进豚鼠气管 C 纤维 P 物质的释放, 模型组 P 物质的量与正常组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。而化州柚提取物低、中、高剂量组 P 物质的量与模型组比较, 差异不显著 ($P > 0.05$), 提示化州柚提取物抑制辣椒素所

表 4 化州柚提取物对辣椒素所致咳嗽豚鼠 BALF 中 P 物质释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of extract from *C. grandis* var. *tomentosa* on capsaicin-induced release of substance P in BALF ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	P 物质量/(nmol · L ⁻¹)
正常	-	0.22 ± 0.05
模型	-	0.64 ± 0.15**
化州柚提取物	12	0.62 ± 0.11**
	24	0.67 ± 0.18**
	48	0.65 ± 0.17**

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

致豚鼠咳嗽与抑制气管 C 纤维 P 物质释放无关。

3 讨论

咳嗽是上呼吸道一种重要的保护性反射, 是呼吸系统疾病中的常见症状。有研究^[8,9]表明: 咳嗽的产生主要与 RARs 受体和 C-纤维受体接受刺激有关, RARs 受体主要对机械刺激敏感, 而 C-纤维受体则主要对化学刺激敏感, 如辣椒素、枸橼酸等。小剂量的辣椒素可以使豚鼠气管内 C-纤维 P 物质释放而引起咳嗽, 而大剂量的辣椒素 (100 mg/kg) 能导致豚鼠对辣椒素致咳脱敏, 但对机械刺激仍然敏感, 因此, 对辣椒素脱敏豚鼠进行机械刺激, 可以通过 RARs 而产生咳嗽^[10]。临床常用止咳药物莫吉司坦对化学刺激和机械刺激均有止咳作用, 研究表明其主要是通过 RARs 而起止咳作用^[11,12]。

本研究在原研究基础上进一步研究化州柚提取物止咳作用及作用机制。结果表明: 化州柚提取物明显抑制辣椒素所致豚鼠咳嗽, 但对电刺激猫喉上神经所致咳嗽无明显影响, 提示化州柚提取物具有显著止咳作用, 且其镇咳方式不是中枢性镇咳; 同时化州柚提取物对辣椒素致咳豚鼠气管内 C-纤维 P 物质释放无明显影响, 但对机械刺激所致的辣椒素脱敏豚鼠咳嗽具有明显抑制作用, 提示化州柚提取物可以通过 RARs 而起止咳作用。

参考文献:

[1] 李沛波, 马 燕, 王永刚, 等. 化州柚提取物止咳化痰平喘作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1350-1352.
[2] 李沛波, 马 燕, 杨宏亮, 等. 化州柚提取物的抗炎作用 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 251-253.
[3] 徐叔云, 卞如瀛, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
[4] 陈 奇. 中药药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
[5] 刘国生, 孙 备, 杨士友. 左羟丙哌嗪镇咳作用的实验研究 [J]. 安徽医药, 2005, 9(1): 13-14.
[6] Takahama K, Wakuda I, Fukushima H, et al. Differential effect of codeine on cough caused by mechanical stimulation of two different sites in the airway of guinea pigs [J]. Eur J

- Pharmacol, 1997, 329(1): 93-97.
- [7] Kamei J, Matsunawa Y, Saitoh A. Antitussive effect of NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in guinea pigs [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 497(2): 233-239.
- [8] Canning B J, Mazonne S B, Meeker S N, et al. Identification of the tracheal and laryngeal afferent neurones mediating cough in anaesthetized guinea-pigs [J]. *J Physiol*, 2004, 557(2): 543-558.
- [9] Michael J C. Plasticity of vagal afferent fibres mediating cough [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2004, 17(6): 447-451.
- [10] Widdicombe J G. Afferent receptors in the airway and cough [J]. *Respir Physiol*, 1998, 114(1): 5-15.
- [11] Morikawa T, Gallico L, Widdicombe J. Actions of moguisteine on cough and pulmonary rapidly adapting receptor activity in the guinea pig [J]. *Pharmacol Res*, 1997, 35(2): 113-118.
- [12] Sant Ambrogio G, Sant Ambrogio F B. Action of moguisteine on the activity of tracheobronchial rapidly adapting receptors in the dog [J]. *Eur Respir J*, 1998, 11(2): 339-344.

卷柏有效部位对辐射损伤小鼠的保护作用

郑晓珂¹, 翟品芳¹, 冯卫生¹, 王继峰², 牛建昭²

(1. 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 目的 观察卷柏有效部位对⁶⁰Co- γ 射线所致小鼠辐射损伤的防护作用。方法 设正常组、模型组、雌激素组和卷柏组; 除正常组外, 其他各组小鼠均接受 6.0 Gy ⁶⁰Co- γ 射线全身照射 1 次; 各组小鼠分别于照射前 72、48、24 h 和照射后即刻 ig 药物或蒸馏水; 照射后 6、12、24 h 立即分批断头处死小鼠, 观察卷柏有效部位对辐照小鼠胸腺、脾脏指数及胸腺、脾脏和骨髓细胞凋亡率的影响。结果 辐射损伤后, 受照射小鼠的胸腺、脾脏指数明显下降, 胸腺、脾脏和骨髓细胞凋亡率明显升高; 卷柏有效部位可促进受照射小鼠胸腺脾脏指数的恢复, 并明显降低其胸腺、脾脏和骨髓的细胞凋亡率。结论 卷柏有效部位对⁶⁰Co- γ 射线所致小鼠辐射损伤有一定的防护作用。

关键词: 卷柏有效部位; 抗辐射; 细胞凋亡

中图分类号: R 286.96

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)02-0250-03

卷柏为蕨类卷柏科卷柏属植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的全草, 多年生草本, 又名长生不死草、九死还魂草、石莲花等, 是传统中药材。笔者在前期对其进行系统的化学成分研究过程中, 在其正丁醇部位得到了黄酮^[1]、木脂素^[2]类成分; 后经细胞活性筛选实验证明, 其水部位和正丁醇部位确有较好的雌激素样作用^[3]。另外, 现代药理及临床研究也表明, 卷柏具有防癌治癌、抗炎、抗病毒和增强机体免疫功能等作用^[4]。本实验将卷柏水部位作为其有效部位, 利用碘化丙啶 (PI) 单染的方法, 通过观察其对辐照小鼠胸腺、脾脏和骨髓细胞凋亡率的影响, 并结合辐照小鼠的胸腺、脾脏指数, 来探讨其辐射防护作用。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠 72 只, 雌雄各半, 体重 (20±2) g, 购自河南省动物实验中心。

1.2 药物与试剂: 尼尔雌醇片, 上海华联制药有限公司生产。RNase A、碘化丙啶 (PI) 购自 Sigma 公

司; 乙醇为国产分析纯。

1.3 主要仪器: FACS 流式细胞仪 (BD, 美国), KDC—160HR 高速冷冻离心机, OLYMPUS 倒置显微镜 (CKX41), Theratron 780-C ⁶⁰Co- γ 射线照射仪 (河南省肿瘤医院提供), WH—2 微型涡旋混合仪, HZS—H 水浴振荡器。

1.4 卷柏水部位的制备: 称取 2 kg 新鲜卷柏 (采自河南省西峡县, 由河南中医学院生药学科董诚明副教授鉴定), 自来水冲洗干净, 用 10 倍量水煎煮 1.5 h, 滤过, 滤渣用 8 倍量水煎煮 1 h, 滤过, 合并两次滤液, 低温减压浓缩得浸膏。再将浸膏用适量水溶解, 依次用乙醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取, 将所剩水部位低温减压浓缩、真空干燥, 得水部位干燥物 300 g (其中含多糖 24.08%), 备用。

2 方法

2.1 分组、照射及给药: 将 72 只昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、雌激素 (阳性对照) 组和卷柏组, 每组 18 只, 雌雄各半; 卷柏组和雌激素组分别

收稿日期: 2007-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371775, 30510403202); 河南省新世纪优秀人才支持计划 (2006HANCET-08)

作者简介: 郑晓珂 (1961—), 女, 河南省郑州市人, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药活性成分及作用机制研究。

E-mail: zhengxk 2006@yahoo.com.cn

* 通讯作者 冯卫生 Tel: (0371) 65575963 Fax: (0371) 65680011 E-mail: fwsh@hactm.edu.cn