

抗癆复肝胶囊止咳祛痰、保肝复肝作用的实验研究

康 娅, 刘 聪, 岳永花, 康 永, 倪 艳, 郝旭亮*

山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

摘 要: **目的** 探讨抗癆复肝胶囊对实验动物的止咳祛痰、保肝复肝作用。**方法** 采用氨水引咳法、气管酚红排泄法观察抗癆复肝胶囊的止咳祛痰作用; 采用异烟肼和利福平制作肝损伤模型, 检测肝脏指数及 AST 和 ALT 的含量, 并观察各组小鼠肝组织的病理学改变。**结果** 抗癆复肝胶囊能够显著减少小鼠的咳嗽次数、增加小鼠气道酚红排泄量; 各给药组小鼠肝脏指数和血清中 ALT 和 AST 水平显著降低, 与模型组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 给药组小鼠肝组织损伤有明显的逆转。**结论** 抗癆复肝胶囊有显著的止咳祛痰作用, 对利福平和异烟肼所致的肝组织损伤也有显著的保护作用。

关键词: 抗癆复肝胶囊; 引咳试验; 气管排泄实验; AST; ALT; 肝脏指数

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)02-0126-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.02.007

Experimental study of antitussive, expectorant, protecting hepatic function of Kanglao Fugan Capsule

KANG Ya, LIU Cong, YUE Yong-hua, KANG Yong, NI Yan, HAO Xu-liang

Shanxi Institute of Traditional Chinese medicine, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To investigate the effect such as antitussive, expectorant, protecting hepatic function of Kanglao Fugan Capsule.

Methods The antitussive and expectorant effect on cough model of mice were investigated by ammonia liquor and phenol red excretion. As hepatic injury model by isoniazid and rifampicin, the liver indexes of mice, AST and ALT levels, were detected. At same time we observed the pathological changes in liver tissues of mice. **Results** Kanglao Fugan Capsule could significantly reduce the frequency of cough of mice and increase the airway phenol red excretion. Compared with the model group, the liver indexes of mice, ALT and AST content in serum of mice in drug group were significantly decreased, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The liver tissue injury of drug treated mice was significantly reversed. **Conclusion** Kanglao Fugan Capsule not only has the antitussive and expectorant effect, but also has the significant protection on liver injury induced by rifampin and isoniazid.

Key words: Kanglao Fugan Capsule; cough test; tracheal excretion experiment; AST; ALT; liver index

结核病是中国重大传染病之一, 严重危害民众健康, 不仅给千万患者及家庭带来痛苦, 也影响了社会经济发展与和谐稳定。中国每年约有 12 万新发结核病例, 患者一般需要 18 到 24 个月的治疗, 长期服用异烟肼、利福平、吡嗪酰胺等一线抗结核药, 会造成一定的肝损伤, 特别是给部分肝功能不全的患者造成了用药困难。经过对实验动物考察, 发现抗癆复肝胶囊不仅治疗癆症的祛痰止咳功效, 对肝还有一定的保护作用, 这将为治疗结核病提供一个新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 KM 种小鼠, SPF 级, 体质量 (22 ± 2) g, 雌雄各半, 共 170 只, 由山西省中医药研究院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK 晋 2010-0002。抗癆复肝胶囊 (山西省中医药研究院, 0.43 g/粒, 批号 120305); 醋酸地塞米松片 (天津太平洋制药有限公司, 批号 110801); 利福平胶囊 (山西太原药业有限公司, 生产批号 120601); 异烟肼 (沈阳红旗制药有限公司, 生产批号 1204042); 益肝灵胶囊

收稿日期: 2013-10-31

作者简介: 康 娅 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及作用机理研究。Tel: 1366352450 E-mail: 708825600@qq.com

*通信作者 郝旭亮 (1975—), 男, 副主任药师, 现任山西省中医药研究院副院长, 硕士研究生导师, 中药药效物质基础及作用机制研究。

E-mail: hxliang-01@163.com

(西安利君精华药业有限责任公司, 批号 201201013)。浓氨水(分析纯: 25%~28%, 太原化肥厂化学试剂厂, 批号 071218); 谷草转氨酶试剂盒(南京建成生物, 批号 20120912); 980—A 型超声雾化器(上海安泰分析仪器有限公司); TU—1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); KDC—2046 低速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

1.2 抗癆复肝胶囊止咳试验的研究

1.2.1 药物配制 小鼠给药体积为 20 mL/kg。用蒸馏水配制抗癆复肝胶囊低(0.8 g 生药/kg)、中(1.6 g 生药/kg)、高(3.2 g 生药/kg)剂量组, 质量浓度分别为 0.04、0.08、0.16 g/mL; 用蒸馏水配制醋酸地塞米松 0.012 5 mg/mL。

1.2.2 分组及给药 KM 小鼠 60 只, 随机分为 5 组, 即空白组, 阳性对照组(醋酸地塞米松片, 0.25 mg/kg), 抗癆复肝胶囊高、中、低剂量组, 每组 12 只小鼠。按上述剂量 ig 给药, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 空白组给予等体积生理盐水, 于末次给药后 30 min, 将每只小鼠置于玻璃罩内, 罩内预先放入 10% 氨水棉球, 观察并记录小鼠由放入瓶中至产生咳嗽所需的时间, 即为咳嗽潜伏期; 观察 3 min 内小鼠咳嗽的次数, 表现为小鼠腹肌收缩, 同时张大嘴, 有咳声。3 min 内咳嗽次数少于 10 次及多于 80 次者; 潜伏期小于 10 s 及大于 50 s 者; 动物死亡、状态不佳、反应异常剧烈者等; 符合三者其中任何一项者, 即为剔除对象^[2-4], 试验中共剔除 18 只。

1.3 抗癆复肝胶囊祛痰作用研究

1.3.1 药物配制 同 1.2.1。

1.3.2 酚红标准曲线的制定 精密称取酚红 10 mg 于 100 mL 棕色量瓶中, 加 5% NaHCO₃ 溶液至刻度, 摇匀, 即成 100 μg/mL 酚红溶液。然后依次用 5% NaHCO₃ 将其稀释成 10、8、6、4、2、1 μg/mL, 用酶标仪于 546 nm 波长处测其吸光度(A)值, 以酚红质量浓度(μg/mL)为横坐标, A 值为纵坐标, 求得标准曲线, 计算其回归方程及相关系数。

1.3.3 气管酚红排泄实验 给药同 2.2.1, 30 min 后按 10 mL/kg ip 酚红溶液。注射 5% 酚红 30 min 后颈椎脱臼处死小鼠, 剪开颈部皮肤, 钝性玻璃针分离气管及喉头, 用针尖已磨光滑的 6 号针头从喉头处插入气管内约 3 mm, 用丝线结扎固定后, 吸取 0.2 mL 5% NaHCO₃ 灌洗气管 5 次, 将洗液注入 1 mL 小试管内, 再吸 0.2 mL 5% NaHCO₃ 如上方法, 共 3

次, 合并洗液, 混匀, 吸取 200 μL 洗液加 2 滴 1 mol/L NaOH 溶液, 酶标仪检测其 A 值, 波长 546 nm。通过酚红标准曲线回归方程计算其酚红含量^[5]。

1.4 抗癆复肝胶囊对抗结核药致肝损伤的影响

1.4.1 药物配制 小鼠给药体积为 20 mL/kg, 分别用蒸馏水配制抗癆复肝胶囊低、中、高剂量组 0.04、0.08、0.16 g/mL, 醋酸地塞米松 0.012 5 mg/mL, 益肝灵胶囊用蒸馏水分别配制成 0.03 g/mL。利福平 0.01 g/mL, 异烟肼用蒸馏水分别配制成 5 mg/mL。

1.4.2 动物分组与给药 60 只小鼠, 随机分为 6 组: 空白对照组, 模型组, 阳性组(益肝灵胶囊), 抗癆复肝胶囊高、中、低剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余 5 组小鼠每日 ig 利福平胶囊联合异烟肼 0.4 mL, 连续 2 周, 同时各组给予相应的药物。

1.4.3 标本采集及制备 实验第 2 周末, 末次给药后禁食 6 h, 小鼠眼眶后静脉丛取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 制备血清, 检测血清中门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量。采血后, 脱臼处死小鼠, 迅速打开腹腔, 取肝组织, 称质量, 计算肝脏指数; 以 10% 福尔马林液固定部分肝组织左叶和右叶, HE 染色, 观察各组小鼠肝组织的病理改变^[6-9]。

2 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理, 组间比较采用方差分析及 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 抗癆复肝胶囊对小鼠止咳效果的影响

由表 1 可见, 与空白对照组比较, 阳性对照组和抗癆复肝胶囊高剂量组对氨水所致小鼠咳嗽的次数明显减少, 且咳嗽潜伏期明显延长 ($P < 0.05$)。

表 1 抗癆复肝胶囊对氨水所致小鼠咳嗽的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of Kanglao Fugan Capsule on cough of mice induced by ammonia water ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(g·kg ⁻¹)	咳嗽次数 /次	咳嗽潜伏期 /s
对照	8	—	17.5±2.5	20.4±8.1
醋酸地塞米松	8	2.5×10 ⁻⁴	12.9±2.2**	30.9±7.7*
抗癆复肝胶囊	8	0.8	17.1±2.6	22.9±5.9
	9	1.6	15.7±2.8	24.9±8.7
	9	3.2	14.0±3.2*	28.3±8.3*

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

3.2 抗癆复肝胶囊的祛痰作用

由表2可见,与对照组比较,阳性组和抗癆复肝胶囊高剂量组分泌量明显增加($P<0.01$),具有明显的祛痰作用。

3.3 抗癆复肝胶囊对抗结核药致肝损伤的影响

由表3可见,模型组肝脏指数显著增高,血清中AST和ALT水平显著升高,与对照组比较差异显著($P<0.05$),提示造模成功。抗癆复肝胶囊各给药组小鼠肝脏指数显著减低,血清中ALT和AST水平显著降低,与模型组比较差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

由图1可见,空白组小鼠肝脏中央静脉周围肝细胞体积未见增大,胞浆致密,肝窦未见异常;与对照组相比,模型组中央静脉肝细胞体积明显增大,胞浆疏松肝窦受压变窄,并可见大量的红

染物质;抗癆复肝胶囊中、高剂量组与益肝灵胶囊组肝细胞体积、胞浆疏松程度显著减小,肝窦受压程度降低。

表2 抗癆复肝胶囊对小鼠气管分泌作用的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Kanglao Fugan Capsule on trachea secretion of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	酚红排泌量/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	2.81±0.33
醋酸地塞米松	2.5×10 ⁻⁴	4.94±0.36**
抗癆复肝胶囊	0.8	3.29±0.47
	1.6	3.17±0.32
	3.2	4.71±0.31**

与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

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

表3 抗癆复肝胶囊对抗结核药致肝损伤模型小鼠血清中肝脏指数、ALT和AST的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of Kanglao Fugan Capsule on liver indexes, ALT, and AST content in serum of mice induced by antituberculosis drug ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝指数/(mg·g ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
对照	—	4.00±0.14	37.74±7.00	2.96±1.95
模型	—	5.38±0.15	75.47±9.53	53.78±3.63 [△]
益肝灵胶囊	0.6	4.44±0.09**	45.47±9.76**	38.37±6.95
抗癆复肝胶囊	0.8	5.02±0.17	70.10±5.15	45.24±5.42
	1.6	4.87±0.11**	75.38±8.04	40.24±5.73
	3.2	4.46±0.13**	50.15±5.39*	36.07±2.60**

与对照组比较: [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

[△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group

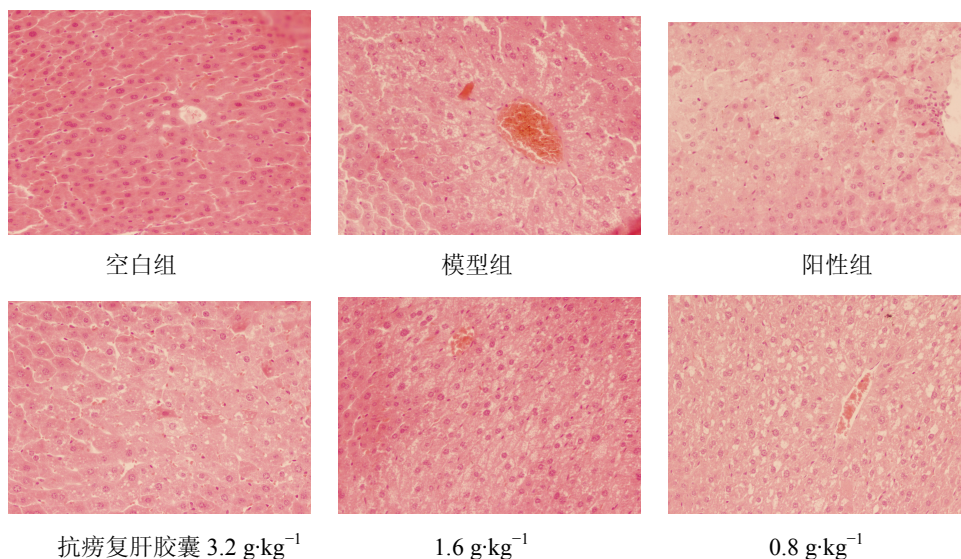


图1 各剂量组小鼠肝脏组织的HE染色观察

Fig. 1 HE staining of liver tissue in mice at each dose

4 讨论

咳嗽是当呼吸道(口腔、咽喉、气管、支气管)受到刺激后,由神经末梢发出冲动传入延髓咳嗽中枢引起的生理反射,通过氨引咳,观察抗癆复肝胶囊能否抑制对刺激的反应性而表现出镇咳作用。醋酸地塞米松主要用于过敏性与自身免疫性炎症性疾病,如支气管哮喘,故选取作为本药引咳药效学试验的阳性对照药。酚红是一种对人体无害的指示剂,通过腹腔注射酚红,观察抗癆复肝胶囊小鼠气管酚红排泄量的影响来考察药物祛痰功效。ALT 主要存在于肝细胞浆中,AST 存在于肝细胞浆和线粒体内。正常细胞由于细胞膜的包裹,ALT 和 AST 不会释入血中。肝细胞受到损害后,细胞变性、坏死,细胞膜破碎或细胞膜的通透性增加,肝细胞中所含的 ALT 和 AST 就会被释放到血液中,使血中 ALT、AST 活性增加。在反映肝细胞损害方面,ALT 优于 AST。肝内 ALT 的总活力为血清中的千倍以上,只要有 1% 的肝细胞损害,就可使血中 ALT 明显升高,对肝损害反应灵敏,是目前临床普遍应用的指标。益肝灵胶囊与本品功能主治基本相同,适应症基本一致,剂型也相同,故选取作为本药效学试验的阳性中药对照药。

本实验结果表明,抗癆复肝胶囊能够明显减少氨水所致小鼠的咳嗽次数,明显延长小鼠咳嗽潜伏期,与对照组比较差异显著($P<0.05$ 、 0.01);抗癆复肝胶囊能显著增加小鼠气管酚红的排泄量,与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。抗癆复肝胶囊各给药组小鼠肝脏指数显著减低,血清中 ALT 和 AST 水平显著降低,与模型组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。从肝组织切片来看,抗癆复肝胶囊对肝组织损伤具有显著的

治疗与保护作用。

抗癆复肝胶囊能显著减少氨水所致的小鼠咳嗽的次数及咳嗽潜伏期,增加小鼠气管酚红的排泄量,对利福平和异烟肼所致的肝组织损伤具有显著的治疗与保护作用。本药物不仅能祛痰止咳治疗癆症,也避免了传统用药对肝损伤,这将成为治疗结核病新的亮点。

参考文献

- [1] 杨丽娟,王 张,孟宪丽,等.基于浓氨水引咳法建立小鼠咳嗽敏感性剔除标准的方法学研究[J].中药药理与临床,2010,26(5):150-151.
- [2] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科技出版社,1991:304-305.
- [3] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上册.上海:上海人民出版社,1977:1222.
- [4] 陈 奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:738.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈 修.药理实验方法学[M].第三版.北京:人民卫生出版社,2002:226-228,905,911-914,1362-1365.
- [6] 蔡大伟,尹晓飞,刘顺良,等.淫羊藿总黄酮对异烟肼和利福平肝损伤小鼠的保护作用[J].西南国防医药,2007,17(6):688-690.
- [7] 杨淑艳,钟秀宏,王 爽,等.灯盏花素对抗结核药致小鼠肝损伤的影响[J].中国医药导报,2011,8(30):25-26.
- [8] 谢 珺,余松华.水飞蓟素脂质体对异烟肼和利福平合用致小鼠肝损伤的保护作用[J].中外健康文摘,2011,8(21):251-252.
- [9] 张瑶纾,吴志丽,王 焕,等.桔梗对异烟肼和利福平致小鼠肝损伤的保护作用[J].天津医科大学学报,2010,16(4):3.