

- [3] Luo Z R, Ge X B, Zheng W X, *et al*. Effects of puerarin on unstable angina pectoris and its coagulant, fibrinolytic and function of endothelial cells [J]. *Chin J Intergrated Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2000, 7: 105-106.
- [4] Anderson S, Rennke H G, Brenner B M. Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats [J]. *Kidney Int*, 1992, 41: 891-897.
- [5] Morkve O, Learun O D. Flow cytometric measurement of P53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissue from bronchial carcinomas [J]. *Cytometry*, 1991, 12: 438-441.
- [6] McClennan S V, Kelly D J, Cox A J, *et al*. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effect of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases [J]. *Diabetologia*, 2002, 45: 268-275.
- [7] Van Bilsen J H, Wagenaar-Hilbers J P, Van der Cammen J M, *et al*. Successful immunotherapy with matrix metalloproteinase-derived peptides in adjuvant arthritis depends on the timing of peptide administration [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4: R2.
- [8] Mathew R, Khanna R, Kumar R, *et al*. Stromelysin-2 overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications [J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, 26: 222-228.
- [9] Saghizadeh M, Brown D J, Castellon R, *et al*. Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158: 723-734.

枇杷叶抗炎和止咳作用研究

王立为¹, 刘新民¹, 余世春², 肖培根¹, 杨峻山^{1*}

- (1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;
2. 安徽省安泰医药生物技术有限责任公司, 安徽 合肥 230088)

摘要:目的 研究枇杷叶抗炎和止咳作用的有效成分, 为制定枇杷叶的质量标准提供科学可靠的实验依据。方法 采用二甲苯致小鼠耳肿胀法、二氧化硫引起小鼠咳嗽和枸橼酸喷雾致豚鼠咳嗽模型, 观察枇杷叶不同分离部分及单体成分的抗炎及止咳作用。结果 P2 和 P3 部分对小鼠耳肿胀法所致的炎症具有较好的对抗作用, 且 P2 部分具有明显的止咳作用。P2 部分中的枇杷苷 I, P3 部分中的总三萜酸和熊果酸均具有良好的抗炎、止咳效果。结论 枇杷苷 I、熊果酸和总三萜酸是枇杷叶抗炎、止咳作用的主要成分, 可作为制定枇杷叶质量标准的定量指标。

关键词: 枇杷叶; 抗炎; 止咳; 枇杷苷 I

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)02-0174-03

Anti-inflammatory and antitussive effects of *Eriobotrya japonica*

WANG Liwei¹, LIU Xinmin¹, YU Shichun², XIAO Peigen¹, YANG Junshan¹

- (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union of Medical College, Beijing 100094, China; 2. Anhui Antech Medicine & Biological Technology Co. Ltd., Hefei 230088, China)

Abstract: **Object** To research the active components from leaves of *Eriobotrya japonica* Thunb. on anti-inflammatory and antitussive effect for controlling its quality. **Methods** Inflammatory model induced by dimethyl benzene of ear edema in mice; tussive models induced by SO₂ in mice, and cough model induced by citric acid in guinea pigs were used to observe the anti-inflammatory and antitussive effects of different part from the leaves of *E. japonica*. **Results** Five fractions from raw materials of *E. japonica* were tested on anti-inflammatory and antitussive effects with mice and guinea pigs. The results showed that the ear edema induced by dimethyl benzene could be obviously reduced when ig P2 and P3 105 mg/kg in mice; The EJA (eribotroside I) isolated from P2, EJB (ursolic acid) and EJC (total triterpenic acid) isolated from P3 were main components on anti-inflammatory effect. P2 and P3 75 mg/kg could reduce the episodes of cough and prolong the latency of cough induced in mice by SO₂. After 1 h ig P2 105 mg/kg showed the relief effects to cough induced by citric acid in guinea pigs, and further experimental results also showed the EJA, EJB, and EJC are antagonist components to cough. **Conclusion** The EJA, EJB, and EJC isolated from the leaves of *E. japonica* are main anti-inflammatory and antitussive components. The present experimental results firstly provide strong evidence to control quality of *E. japonica*.

Key words: the leaves of *Eriobotrya japonica* Thunb.; anti-inflammation, antitussive; eribotroside I

枇杷叶为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya Japonica* (Thunb.) Lindl 的干燥叶,具清肺止咳、降逆止呕之功效^[1]。药理研究表明枇杷叶具较好的抗炎和止咳作用^[2,3]。临床常用于治疗急、慢性呼吸道疾病。但长期以来其抗炎、止咳作用的物质基础不甚清楚。为此,本实验利用经典的炎症和咳嗽动物模型,从枇杷叶粗提物开始,对其抗炎和止咳作用进行研究,以期找到枇杷叶抗炎和止咳作用的有效成分,为制定枇杷叶的质量标准提供科学可靠的实验依据。

1 材料

1.1 药材及提取物制备:枇杷叶 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl, 1996 年 12 月购自安徽亳州中药材市场,由安徽中医学院中药系周建理教授鉴定,药材样本保留于本所生药标本馆。枇杷叶干燥、粉碎后乙醇提取,浸膏用硅胶搅拌均匀,装柱,硅胶柱分别用石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇和蒸馏水顺序洗脱,先后分离得到 P1, P2, P3, P4 和 P5 共 5 个部分。从 P2 部分分离得到枇杷苷 I (eribotroside I, 纯度 $\geq 95\%$); P3 部分分离得到熊果酸 (ursolic acid, 经 HPLC 检测,其纯度为 98.2%) 和总三萜酸 (total triterpenic acid, 经 HPLC 检测,总三萜酸中含熊果酸、齐墩果酸、2 α -羟基熊果酸、2 α -羟基齐墩果酸、坡模酸和蔷薇酸 6 个单体,三萜酸总量达 86.4%)。各样品临用前均用生理盐水配制。

1.2 药品:二甲苯、枸橼酸、二氧化硫等化学试剂均为市售。阿司匹林肠溶片,北京双桥制药公司生产,25 mg/片,批号 011002;磷酸可待因片,青海制药厂生产,30 mg/片,批号 010615;磷酸苯丙哌林缓释片,广东昌益制药有限公司生产,52.7 mg/片,批号 011101。

1.3 动物:清洁级昆明种小鼠,雄性,体重 (22 $\pm$ 3) g,合格证号 (医动字) SCXK1100-0006;豚鼠,体重 (220 $\pm$ 20) g,雌雄兼用,均由中国医学科学院实验动物研究所提供。

2 方法与结果

2.1 枇杷叶的抗炎作用 (鼠耳肿胀法)^[4]:选取健康雄性小鼠,随机分组,每组各 10 只。枇杷叶各组分别 ig 枇杷叶各部位或成分的生理盐水溶液,对照组 ig 等体积的生理盐水,阳性对照组 ig 阿司匹林生理盐水溶液,每天 1 次,连续 3 d,各组末次给药后 45 min,用涂有二甲苯的棉球接触小鼠右耳 5 s,15 min 后脱颈椎处死小鼠。以直径 8 mm 打孔器将小鼠双耳同部位切下,精密天平称质量。以左耳与右

耳的质量差为肿胀度,并计算抑肿率作为抗炎指标,各组数据进行统计处理。结果见表 1。

抑肿率= (对照组肿胀度- 给药组肿胀度)/对照组肿胀度 $\times 100\%$

表 1 枇杷叶各部分对小鼠耳肿胀的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

Table 1 Inhibition of different parts from leaves of *E. japonica* on ear edema induced by dimethyl benzene in mice ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

组 别	剂量/(mg $\cdot$ kg $^{-1}$)	肿胀度/mg	抑肿率/%
对照	-	12.2 $\pm$ 3.78	-
P1	280	13.1 $\pm$ 4.10	- 7.4
P2	105	7.3 $\pm$ 1.92*	40.2
P3	105	8.2 $\pm$ 2.08*	32.8
P4	700	11.0 $\pm$ 3.14	9.8
P5	210	12.8 $\pm$ 3.45	- 4.9
对照	-	20.80 $\pm$ 2.49	-
枇杷苷 I	40	12.90 $\pm$ 5.32***	37.98
	20	16.70 $\pm$ 2.98**	19.71
熊果酸	240	10.35 $\pm$ 3.56***	53.30
	120	9.78 $\pm$ 5.82***	55.80
	60	12.98 $\pm$ 8.14**	41.40
总三萜酸	400	12.99 $\pm$ 7.38**	41.30
	200	14.05 $\pm$ 6.15*	36.60
	100	17.17 $\pm$ 6.59	22.50
阿司匹林	150	12.24 $\pm$ 6.01***	44.70

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

实验结果表明 P2 和 P3 部分 ig 给药对二甲苯所致小鼠耳肿胀有明显抑制作用,以 P2 部分作用最强。但 P1、P4 和 P5 部分无明显的抗炎作用。P2 部分分离出的枇杷苷 I、P3 部分分离出的总三萜酸和熊果酸对二甲苯所致小鼠耳肿胀也有明显抑制作用。

2.2 枇杷叶的止咳作用

2.2.1 二氧化硫刺激法^[5]:取雄性昆明种小鼠,随机分组,每组各 10 只。枇杷叶各组分别 ig 相应的各部分溶液,对照组 ig 等体积生理盐水。1 h 后将小鼠放入通以 8 mL 二氧化硫气体的测试箱内引咳,以小鼠出现明显的张口喘息为咳嗽指标,记录小鼠放入测试箱内到咳嗽发生的潜伏期并计算止咳率。结果见表 2。结果表明 P2 和 P3 部分 ig 给药 1 h 后能明显延长二氧化硫气体所引起小鼠咳嗽的潜伏期 ($P < 0.05$),而其他部分则无明显作用。

止咳率= $\frac{\text{给药组咳嗽潜伏期}}{\text{对照组咳嗽潜伏期}} \times 100\%$

2.2.2 枸橼酸喷雾引咳法^[5]:选取健康豚鼠,雌雄各半。豚鼠放入实验测试箱内,用超声波医用雾化器喷入 17.5% 枸橼酸溶液的雾化气体 40 s,计算 5

表 2 枇杷叶各部分对二氧化硫所致小鼠咳嗽的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of different parts from leaves of *E. japonica* on cough induced by SO_2 in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	咳嗽潜伏期/s	止咳率/%
对照	-	41.8 $\pm$ 10.6	-
P ₁	200	42.7 $\pm$ 14.3	102.2
P ₂	75	65.4 $\pm$ 13.1 [*]	156.5
P ₃	75	54.4 $\pm$ 13.8 [*]	130.1
P ₄	500	49.3 $\pm$ 12.6	117.9
P ₅	150	44.6 $\pm$ 17.3	106.7

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs control group

5 min 内豚鼠咳嗽次数, 选取 5 min 内咳嗽次数超过 10 次的豚鼠为待试动物, 休息 2 d 后用于正式实验。豚鼠随机分组, 每组 6 只。各组分别 ig 枇杷叶各部分的生理盐水溶液, 对照组 ig 同体积生理盐水, 可待因组 ip 可待因生理盐水溶液作阳性对照。各组给药 1 h (ip 可待因 0.5 h) 后, 豚鼠放入实验测试箱内, 同上法引咳, 喷雾 60 s。记录 5 min 内豚鼠的咳嗽潜伏期及咳嗽次数。实验结果见表 3。

表 3 枇杷叶各部分对枸橼酸致豚鼠咳嗽的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effects of different parts from leaves of *E. japonica* on cough induced by citric acid in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数/(次 $\cdot$ 5 min $^{-1}$)
对照	-	62.8 $\pm$ 51.2	34.0 $\pm$ 13.98
P ₂	105	163.4 $\pm$ 117.6 [*]	15.4 $\pm$ 10.38 [*]
P ₃	105	84.6 $\pm$ 33.4	23.4 $\pm$ 8.05
P ₄	700	53.8 $\pm$ 32.8	29.6 $\pm$ 7.53
P ₅	210	79.2 $\pm$ 62.6	29.0 $\pm$ 20.8
可待因	15	134.6 $\pm$ 48.9 [*]	17.2 $\pm$ 10.7 [*]
对照	-	36.5 $\pm$ 33.09	28.16 $\pm$ 8.21
枇杷苷 I	30	86.0 $\pm$ 56.48	12.00 $\pm$ 9.12 ^{**}
	60	88.0 $\pm$ 33.82 [*]	11.00 $\pm$ 5.59 ^{**}
可待因	15	124.2 $\pm$ 52.73 ^{**}	5.67 $\pm$ 3.83 ^{***}

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group

另取健康豚鼠按枸橼酸引咳法选取待试动物后, 随机分 9 组, 每组 8 只, 分别 ig 熊果酸和总三萜酸各剂量的生理盐水溶液, 阳性对照组分别 ig 可待因和磷酸苯丙哌林生理盐水溶液, 对照组 ig 等体积生理盐水。各组 ig 给药 1 h 后, 按枸橼酸引咳法测试, 结果见表 4。

表 4 枇杷叶中熊果酸、总三萜酸对枸橼酸致豚鼠咳嗽的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 Effects of EJB, EJC from leaves of *E. japonica* on cough induced by citric acid in guinea pigs ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/($mg \cdot kg^{-1}$)	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数/(次 $\cdot$ 5 min $^{-1}$)
对照	-	42.75 $\pm$ 19.15	26.00 $\pm$ 5.87
可待因	30	107.75 $\pm$ 21.89 ^{***}	12.50 $\pm$ 6.61 ^{**}
磷酸苯丙哌林	20	95.50 $\pm$ 47.95 [*]	13.25 $\pm$ 7.04 ^{**}
熊果酸	240	79.75 $\pm$ 25.45 [*]	13.75 $\pm$ 5.44 ^{**}
	120	46.00 $\pm$ 22.36	17.50 $\pm$ 5.41 [*]
	60	42.25 $\pm$ 20.19	23.50 $\pm$ 10.89
总三萜酸	400	73.00 $\pm$ 30.68 [*]	14.25 $\pm$ 6.75 ^{**}
	200	70.00 $\pm$ 31.32 [*]	17.75 $\pm$ 6.77 [*]
	100	64.25 $\pm$ 35.01	21.75 $\pm$ 10.16

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs control group

表 3 结果表明 P₂ 部分 105 mg/kg ig 给药 1 h 后能明显延长枸橼酸喷雾引咳法所引起豚鼠咳嗽的潜伏期, 减少咳嗽次数 ($P < 0.05$), 而其他部分的作用不明显。表 3, 4 结果表明 P₂ 部分中的枇杷苷 I (30, 60 mg/kg)、P₃ 部分中的熊果酸 (120, 240 mg/kg) 和总三萜酸 (200, 400 mg/kg) ig 给药 1 h 后也能明显延长枸橼酸喷雾所致豚鼠咳嗽的潜伏期, 减少咳嗽次数。

3 讨论

本实验结果表明在枇杷叶提取分离的 5 个部分中, P₂ 和 P₃ 部分对鼠耳肿胀法所致炎症和二氧化硫刺激法所致小鼠咳嗽具有较好的对抗作用, P₂ 部分对枸橼酸喷雾所致的豚鼠咳嗽也具有明显的止咳效果。进一步的实验表明 P₂ 部分中的枇杷苷 I、P₃ 部分中的熊果酸和总三萜酸是枇杷叶中主要的抗炎和止咳作用成分。

References

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000, Vol 1.
- [2] Yanagisawa H, Ohshima Y, Okada Y, et al. A sesquiterpene glycoside, loquatifolin A from the leaves of *E. japonica* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(4): 1270-1274.
- [3] Li X W, Lu W Q, Qin Z L, et al. Pharmacokinetics and toxicity of amygdalin [J]. *Chin J New Drugs Clin Res* (新药与临床), 1986, 5(3): 141.
- [4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [5] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学), [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.