

龙利叶止咳活性部位筛选及其作用机制研究

丘 琴¹, 赵应学^{2#}, 范秀春¹, 甄丹丹¹, 周 颖¹, 黄敏琪³, 甄汉深^{1*}, 庾丽峰¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

2. 广西壮族自治区江滨医院, 广西 南宁 530021

3. 广西卫生职业技术学院, 广西 南宁 530023

摘要:目的 对龙利叶的止咳作用进行研究, 筛选其活性部位, 并初步研究其止咳作用机制。方法 制备龙利叶 75%乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇部位提取物, 采用改良寇氏法研究龙利叶不同提取部位的急性毒性; 采用氨水引咳法制备小鼠模型, 用序贯法求出引起半数小鼠咳嗽的喷雾时间, 进行止咳活性部位的筛选; 采用辣椒素引咳实验, 通过观察龙利叶各部位提取物对小鼠阿片受体激动作用和对 ATP 敏感性钾通道 (KATP) 的作用, 探讨其作用机制。结果 龙利叶 75%乙醇、醋酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇部位对小鼠的半数致死剂量 (LD₅₀) 分别为浸膏 7.30、17.00、69.68、75.88 g/kg; 石油醚部位最大耐受量为浸膏 117.71 g/kg; 75%乙醇部位和醋酸乙酯部位具有止咳作用, 其止咳作用与激动中枢系统的阿片受体和 KATP 通道有关。结论 75%乙醇和醋酸乙酯部位为龙利叶止咳活性部位, 其止咳机制与激动中枢系统的阿片受体和 KATP 通道有关。

关键词: 龙利叶; 止咳; 活性部位; 作用机制; 阿片受体; ATP 敏感性钾通道

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1430-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.026

Antitussive effect and mechanism study of effective fractions from *Sauropus rostratus*

QIU Qin¹, ZHAO Ying-xue², FAN Xiu-chun¹, ZHEN Dan-dan¹, ZHOU Ying¹, HUANG Min-qi³,
ZHEN Han-shen¹, YU Li-feng¹

1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Guangxi Jiangbin Hospital, Nanning 530021, China

3. Guangxi health Career Technical College, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To study the antitussive effect of *Sauropus spatulifolius*, screen the active part of its antitussive effect, and study its antitussive mechanism. **Methods** The acute toxicity of different extraction sites of *S. spatulifolius* were studied by modified Karber's method; The model was made with ammonia liquor to induce cough. The spray time that caused half of the mice to cough was calculated by sequential method with aim to screen the active sites. Capsaicin was used to induce cough, and the mechanism of action of extracts from various parts of *S. spatulifolius* on opioid receptor and ATP-sensitive potassium channel (KATP) of mice was explored. **Results** The LD₅₀ of 75% ethanol, ethyl acetate, *n*-butanol, and 95% ethanol extracts was 7.30, 17.00, 69.68, and 75.88 g/kg, respectively; The maximum tolerance dose (MTD) of petroleum ether extracts was 117.71 g/kg; Extracts from 75% ethanol and ethyl acetate had antitussive effects, and its antitussive effect was related to opioid receptor and KATP pathway. **Conclusion** The fractions from 75% ethanol and ethyl acetate are the active parts of *S. spatulifolius* for relieving cough, and its antitussive mechanism is related to the KATP pathway and opioid receptors in the excited central system.

收稿日期: 2018-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460601); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项 (GZZJ13-03); 2018 年广西一流学科建设项目重点课题 (2018XK052); 壮瑶-药协同创新中心项目 (桂教科研 [2013] 20 号); 广西壮瑶药重点实验室项目 (桂科基字 [2014] 32 号); 广西重点学科壮药学项目 (桂教科研 [2013] 16 号); 广西八桂学者中药创新理论与药效研究项目 (J13162)

作者简介: 丘 琴 (1983—), 女, 博士, 副教授, 从事药学和中药学的教学和科研工作。E-mail: 12031983@163.com

***通信作者** 甄汉深, 教授, 博士生导师, 从事药学和中药学的教学和科研工作。E-mail: 8zhen@163.com

#并列第一作者 赵应学 (1983—), 男, 硕士, 主管药师。Tel: 15977752390 E-mail: 465770916@qq.com

Key words: *Sauropus spatulifolius* Beille; antitussive effect; active fraction; mechanism of action; opioid receptor; ATP-sensitive potassium channel

龙利叶为大戟科守宫木属常绿小灌木 *Sauropus spatulifolius* Beille 的干燥叶, 又名龙脷叶、牛耳叶、龙味叶、龙舌叶^[1-2], 在我国主要分布于广西、福建、广东等地^[3], 具有清热止咳、润肺化痰之功效, 临床主治肺热、咳嗽、痰多、便秘、口干等症, 可治疗支气管哮喘及上呼吸道炎症等肺部疾病^[2,4-5]。临床研究表明, 配伍龙利叶的方剂多用于治疗肺炎、支气管炎等呼吸系统疾病, 如千龙合剂(木蝴蝶、龙利叶、太子参等)用于防治肺炎双球菌引起的肺炎^[6], 千龙汤(木蝴蝶、鱼腥草、龙利叶等)用于治疗间质性肺炎^[7], 天龙茶(青天葵、龙利叶、款冬花等)用于治疗急性支气管炎, 疗效均较好^[8]。

前期研究表明, 龙利叶水提液具有抗炎和镇痛作用^[9-11], 本研究龙利叶止咳活性部位及其作用机制, 为龙利叶的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠(SPF级), 体质量(20±2)g, 雌雄各半, 由广西医科大学提供, 实验动物许可证号SYXK(桂)2010-0001。

1.2 药品与试剂

龙利叶药材购自广西玉林, 经广西一心药业有限公司马利飞副主任药师鉴定为大戟科守宫木属龙利叶 *Sauropus spatulifolius* Beille 的干燥叶; 聚山梨酯-80(天津博迪化工股份有限公司); 石油醚(60~90℃)、醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇, 成都市科龙化工试剂厂; 浓氨水(AR, 广州化学试剂厂); 磷酸可待因片(批号H63020056, 青海制药厂有限公司); 盐酸纳洛酮注射液(批号H20065190, 山西普德药业有限公司); 格列本脲片(批号H44021808, 广东三才石岐制药有限公司); 辣椒素(批号1510150, 天津宏盛辣素有限公司)。

1.3 仪器

TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司); HWS26 型电热恒温水浴锅(上海恒科学仪器有限公司); KQ5200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); RE-5205 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); DLSB-10/20 低温冷却液循环泵、SHB-B95 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 开口反应器(10 L, 成都蜀牛玻璃仪器

厂); Striousecp224s 电子分析天平(德国赛多利斯公司); NB-150U 超声雾化器(欧姆龙公司); BCD-247 直冷式冷藏冷冻箱(德国西门子股份有限公司)。

2 方法

2.1 龙利叶不同提取部位制备

称取龙利叶药材 8 250 g, 剪碎, 加 7 倍量 75%乙醇浸泡 7 d, 渗漉提取, 回收溶剂, 水浴蒸干得 75%乙醇部位浸膏 3 170 g。称取 75%乙醇部位浸膏 2 942.10 g 用适量的蒸馏水溶解, 依次用等体积石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 回收溶剂, 水浴蒸干得石油醚部位浸膏 283.72 g, 提取率 3.71%; 醋酸乙酯部位浸膏 160.48 g, 提取率 2.70%; 正丁醇部位浸膏 168.10 g, 提取率 2.20%。将正丁醇萃取后水溶部分浓缩蒸干得干浸膏, 医用纱布包裹浸膏, 用 95%乙醇回流提取, 每次加 3 倍体积 95%乙醇, 提取 5 次, 每次提取 1.5 h, 减压回收, 水浴蒸干得 95%乙醇部位浸膏共 465.67 g, 提取率 6.08%。

2.2 龙利叶各部位提取物急性毒性实验

根据改良寇氏法^[12], 预试验获得龙利叶各部位的 0~100%致死量范围, 在此范围内, 组间剂量按 1:0.8 确定龙利叶 75%乙醇、醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇部位各剂量(以浸膏计)。取昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机分组, 每组 10 只, 实验前禁食不禁水 12 h, 以最大体积(40 mL/kg) ig 给药 1 次后连续观察 14 d, 记录小鼠活动情况、中毒反应、死亡数和死亡原因, 并对死亡小鼠进行解剖, 观察其内脏器官的变化。按改良寇氏法计算半数致死剂量(LD₅₀)。预试验中, 石油醚部位以最大浓度和最大给药体积 ig 给药无法测出 LD₅₀, 因此对其进行最大耐受量(MTD)的测定, 取昆明种小鼠 20 只, 雌雄各半, 实验前禁食不禁水 12 h, 以石油醚部位浸膏最大浓度 1.4 g/mL, 40 mL/kg ig 给药, 8 h 后 ig 给药第 2 次, 常规饲养, 7 d 后脱颈椎处死小鼠, 解剖, 肉眼观察小鼠组织器官变化。

2.3 龙利叶止咳活性部位的筛选^[13-18]

取小鼠, 雌雄各半, 随机分为模型组(生理盐水), 阳性对照可待因组(60 mg/kg), 龙利叶各部位提取物高、中、低剂量组, 每组 10 只。连续给药 5 d, 每天 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 末次给药前小鼠禁食不禁水 12 h, 氨水引咳实验前 1 h ig 给药。

将小鼠置于玻璃钟罩内, 打开真空泵电源开关, 压力表调到 180 mmHg (23.99 kPa), 喷雾 5 s 以后放入小鼠, 继续喷雾让小鼠接受恒压的氨水喷雾刺激至预定设计的时间, 停止喷雾后, 立即取出小鼠, 观察 1 min 内出现 3 次以上典型咳嗽动作(嘴张大或有咳嗽声)者, 记为“咳嗽”, 否则记“无咳嗽”。以 20 s 作为开始时间, 在该段时间向上或下连续的递增或递减, 改变每只小鼠的喷雾刺激时间。序贯喷雾时间序列为 10.4、12.0、14.1、16.7、20.0、24.2、29.7、36.8、46.4 s (喷雾时间的对数比为 0.94:1)。实验时, 当前 1 只小鼠出现咳嗽反应, 则下 1 只就用低 1 级的氨水刺激时间, 相反, 若未出现咳嗽, 下 1 只就用高 1 级的时间。用序贯法(上下法)求出引起半数小鼠咳嗽的喷雾时间(EDT₅₀), 计算 R 值, 若 $R > 130\%$, 说明受试药物有止咳作用; 若 $R > 150\%$, 则表明有显著止咳作用。

$$\text{EDT}_{50} = \log^{-1} c/n$$

$$c = \sum rx$$

$$R = \text{EDT}_{50 \text{ 药物}} / \text{EDT}_{50 \text{ 模型}}$$

n 为每组动物数; r 为每个序列的动物数; x 为剂量的对数; c 为 rx 值的总和

2.4 龙利叶止咳活性部位作用机制研究^[18-22]

2.4.1 对小鼠阿片受体激动作用的影响 取小鼠若干只, 将其逐一置于玻璃钟罩内, 用超声雾化器喷雾 300 $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素溶液, 记录自喷雾起 5 min 内小鼠的咳嗽次数, 挑选咳嗽次数多于 8 次的小鼠进行后续实验。将经上述筛选合格的小鼠随机分为模型组(生理盐水), 纳洛酮(生理盐水+纳洛酮 8 mg/kg)组, 磷酸可待因(磷酸可待因 60 mg/kg+生理盐水)组, 磷酸可待因+纳洛酮(磷酸可待因 60 mg/kg+纳洛酮 8 mg/kg)组, 龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量(3.40、1.70、0.85 g/kg)组, 龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量+纳洛酮(龙利叶醋酸乙酯部位 3.40、1.70、0.85 g/kg+纳洛酮 8 mg/kg)组, 连续 ig 给药 5 d, 每天给药 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 末次给药前禁食不禁水 12 h, 给药 45 min 后 ip 纳洛酮, 给药 60 min 后进行辣椒素引咳实验, 记录自喷雾起 5 min 内小鼠的咳嗽次数, 计算抑咳率。

抑咳率 = (给药前小鼠咳嗽次数 - 给药后小鼠咳嗽次数) / 给药前小鼠咳嗽次数

2.4.2 对小鼠 KATP 作用的影响 取小鼠若干只, 将其逐一置于玻璃钟罩内, 用超声雾化器喷雾 300

$\mu\text{mol/L}$ 辣椒素溶液, 记录自喷雾起 5 min 内小鼠的咳嗽次数, 挑选咳嗽次数多于 8 次的小鼠进行后续实验。将筛选合格的小鼠随机分为模型组(生理盐水), 格列本脲(生理盐水+格列本脲 40 mg/kg)组, 磷酸可待因(磷酸可待因 60 mg/kg+生理盐水)组, 磷酸可待因+格列本脲(磷酸可待因 60 mg/kg+格列本脲 40 mg/kg)组, 龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量(3.40、1.70、0.85 g/kg)组, 龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量+格列本脲(龙利叶醋酸乙酯部位 3.40、1.70、0.85 g/kg+格列本脲 40 mg/kg)组, 连续 ig 给药 5 d, 每天给药 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 末次给药前禁食不禁水 12 h, 给药 45 min 后 ip 格列本脲, 给药 60 min 后进行辣椒素引咳实验, 记录自喷雾起 5 min 内小鼠咳嗽次数, 计算抑咳率。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 龙利叶各部位提取物急性毒性

小鼠 ig 给予龙利叶 75%乙醇、醋酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇部位提取物后, 活动减少, 精神萎靡, 有腹泻症状, 死亡时间在给药后 0~48 h, 未死亡小鼠腹泻症状在 3~4 d 后好转; 部分活动减少, 给药 24 h 后精神状态恢复, 14 d 未见死亡。死亡小鼠肉眼可见肝、肾、脾等器官充血, 颜色变成深红色。小鼠 ig 给予石油醚部位提取物后, 在观察期间活动、食量、大小便均正常, 体质量均有增加, 观察期间未见死亡, 脱颈椎处死小鼠, 各器官未见异常。计算得到 75%乙醇、醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇部位提取物的 LD₅₀ 分别为 7.30、17.00、69.68、75.88 g/kg。石油醚部位提取物 MTD 为 2 次给药剂量的总和, 即 112 g/kg。

3.2 龙利叶止咳活性部位的筛选

与模型组比较, 可待因组的 $R > 130\%$, 有止咳效果, 说明造模成功。龙利叶 75%乙醇部位中剂量组和醋酸乙酯部位中、高剂量组 $R > 150\%$, 有显著的止咳效果; 龙利叶 75%乙醇部位高剂量组和醋酸乙酯部位低剂量组 $R > 130\%$, 有止咳效果; 龙利叶 75%乙醇部位低剂量及石油醚、正丁醇、95%乙醇部位高、中、低剂量均无止咳效果。实验表明, 龙利叶 75%乙醇和醋酸乙酯部位具有止咳作用, 为龙利叶的止咳活性部位(表 1)。

表 1 龙利叶各部位提取物的止咳作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Antitussive effect of different extraction parts of *S. spatulifolius* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	EDT ₅₀ /s	R/%
对照	—	21.25	—
可待因	0.06	29.30	137.89
75%乙醇	0.36	25.77	121.27
	0.72	34.95	164.45
	1.44	31.86	149.94
	5.86	22.89	107.70
石油醚	11.72	15.47	72.78
	23.44	19.01	89.44
	0.85	42.55	136.96
	1.70	52.46	156.55
醋酸乙酯	3.40	52.46	156.55
	3.48	25.89	64.11
	6.97	25.77	81.26
	13.93	19.01	80.87
正丁醇	3.86	35.15	110.31
	7.73	23.81	74.72
	15.45	29.30	91.96
	15.45	29.30	91.96

3.3 龙利叶止咳活性部位作用机制研究

3.3.1 对阿片受体的影响 与模型组比较,可待因对辣椒素诱导的小鼠咳嗽有显著止咳效果 ($P < 0.01$, 表 2),可待因是中枢阿片受体激动剂,与非选择性阿片受体阻断剂纳洛酮联用后,其对小鼠的抑咳率显著下降 ($P < 0.05$),纳洛酮能够显著阻断可待因止咳作用的发挥。与模型组比较,龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量有显著止咳作用 ($P < 0.05$ 、 0.01),其高、中剂量与纳洛酮联用可使抑咳率显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。研究结果表明纳洛酮能阻断龙利叶醋酸乙酯部位提取物和可待因止咳效果的发挥,说明龙利叶醋酸乙酯部位提取物的止咳作用与中枢系统的阿片受体有关。

3.3.2 对小鼠 KATP 的影响 与模型组比较,格列本脲对辣椒素诱导的小鼠咳嗽无显著的影响 (表 3)。可待因有显著止咳作用 ($P < 0.01$),与格列本脲联用时,仍有显著止咳作用 ($P < 0.01$),说明格列本脲对中枢止咳药可待因无拮抗作用。龙利叶醋酸乙酯部位高、中、低剂量都有显著止咳作用 ($P < 0.01$),与格列本脲联用后,止咳效果下降,与对应剂量醋酸乙酯组间有显著性差异,实验结果表明格列本脲对龙利叶醋酸乙酯部位的止咳作用有影响,说明龙利叶醋酸乙酯部位的止咳作用与 KATP 通道有关。

表 2 龙利叶醋酸乙酯部位对小鼠阿片受体的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of ethyl acetate extraction parts of *S. spatulifolius* on opioid receptor agonist of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	咳嗽次数	抑咳率/%
模型	—	16.00 ± 10.13	—
可待因	8	5.50 ± 2.37**	65.63
纳洛酮	60	14.90 ± 9.99 [#]	6.88
可待因 + 纳洛酮	60 + 8	14.60 ± 6.11 [#]	8.75
醋酸乙酯	3 400	6.10 ± 3.60*	61.88
	1 700	7.60 ± 2.91*	52.50
	850	5.70 ± 3.13**	64.38
醋酸乙酯 + 纳洛酮	3 400 + 8	19.70 ± 11.51***	-21.13
	1 700 + 8	15.00 ± 6.48**	6.25
	850 + 8	9.50 ± 4.03	40.63

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与可待因组比较: [#] $P < 0.05$;

与醋酸乙酯同剂量组比较: *** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs codeine group;

*** $P < 0.01$ vs same dose of ethyl acetate group

表 3 龙利叶醋酸乙酯部位对小鼠 KATP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of ethyl acetate extraction parts of *S. spatulifolius* on KATP of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	咳嗽次数	抑咳率/%
模型	—	14.30 ± 5.77	—
可待因	60	5.50 ± 2.37**	61.54
格列本脲	40	11.60 ± 7.69	18.88
可待因 + 格列本脲	60 + 40	5.50 ± 4.43**	61.54
醋酸乙酯	3 400	6.10 ± 3.60**	57.34
	1 700	7.60 ± 2.91**	46.85
	850	5.70 ± 3.13**	60.14
醋酸乙酯 + 格列本脲	3 400 + 40	10.80 ± 5.25*	24.48
	1 700 + 40	11.30 ± 3.89*	20.98
	850 + 40	9.40 ± 4.01*	34.27

与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与醋酸乙酯同剂量组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs model group; * $P < 0.05$ vs same dose of ethyl acetate group

4 讨论

氨水引咳和辣椒素引咳是目前应用较多的引咳模型,因此,本实验分别采用了氨水引咳和辣椒素引咳对龙利叶的止咳作用及其作用机制进行研究,

评价了龙利叶 75%乙醇、石油醚、醋酸乙酯、正丁醇、95%乙醇部位的止咳作用,实验结果表明,龙利叶 75%乙醇和醋酸乙酯部位是其止咳活性部位。

辣椒素可兴奋 C 神经纤维导致咳嗽反射,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,也可间接导致快速适应受体激活而引起咳嗽反射^[18]。纳洛酮是人工合成的阿片受体拮抗剂,无激动活性,是二氢吗啡酮的衍生物,与吗啡的化学结构相似,但纳洛酮与可待因的药理作用完全相反,可拮抗 β -内啡肽所致的呼吸中枢抑制,提高自主呼吸功能^[19]。因此本实验采用辣椒素引咳,非选择性阿片受体阻断剂纳洛酮联合中枢阿片受体激动剂可待因研究龙利叶的止咳作用机制,探讨其止咳作用是否与激动阿片受体有关。实验结果表明,纳洛酮能阻断龙利叶醋酸乙酯部位提取物和可待因止咳效果的发挥,说明龙利叶醋酸乙酯部位提取物的止咳作用与中枢系统的阿片受体有关。

KATP 开放剂具有止咳作用,格列本脲本身对咳嗽没有显著影响,但是可以和 KATP 开放剂合用,阻断 KATP 通道,限制钾离子开放剂的作用^[20-21],因此本实验采用可待因联合格列本脲研究龙利叶醋酸乙酯部位提取物的止咳作用是否与钾离子通道有关。实验结果表明,格列本脲在一定程度上能阻断龙利叶醋酸乙酯部位提取物的止咳作用,提示龙利叶醋酸乙酯部位提取物的止咳作用与 KATP 通道有关。而其止咳作用是否与 5-羟色胺(5-HT)和 P 物质等有关有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第四册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [3] 中国科学院植物研究所. 中国植物志 [M]. 北京: 中国科学院植物所, 2005.
- [4] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编下册 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [5] 广西壮族自治区革命委员会卫生局. 广西本草下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1974.
- [6] 张国熙, 叶锡洪, 林胜英, 等. 千龙合剂对小鼠肺炎双球菌的药效学研究 [J]. 新中医, 2002, 32(4): 35.
- [7] 邓汉华, 邓景云, 孔令深, 等. 千龙汤治疗间质性肺炎 62 例 [J]. 新中医, 1999, 29(11): 42.
- [8] 史筱冰, 赵不潜, 潘俊辉, 等. 天龙茶治疗急性支气管炎的临床观察 [J]. 现代临床医学生物工程杂志, 1997, 3(2): 126.
- [9] 丘 琴, 甄汉深, 王 莹, 等. 龙利叶根急性毒性和抗炎作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 286-288.
- [10] 丘 琴, 黄培倩, 甄汉深, 等. 龙利叶茎急性毒性和抗炎作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 541-542.
- [11] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [12] 甄汉深, 刘 蓉, 丘 琴, 等. 龙利叶抗炎镇痛作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 270-273.
- [13] 王孝勋, 黄茂春, 赵 旭, 等. 序贯法研究广西不同产地对叶百部总生物碱对小鼠的止咳作用 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1935-1937.
- [14] 刘 宾, 江 南. 序贯法研究甘草酸二铵对小鼠止咳作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(10): 820-822.
- [15] 陈 奇. 中药药理实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [16] 唐慧勤, 龙 颖, 董 威, 等. 产地、生长期、商品规格等不同因素对罗汉果止咳作用的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3051-3054.
- [17] 杨冰月, 李 敏, 任 敏, 等. 基于灰色关联度分析法对半夏及其炮制品总有机酸止咳作用的谱-效关系研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2301-2307.
- [18] 晏子俊, 罗燕秋, 李作燕, 等. 暗紫贝母及浙贝母镇咳作用的化学刺激引咳法比较 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2522-2525.
- [19] 徐启贵, 李勤耕, 田 睿, 等. 羟丙哌嗪衍生物的合成及其镇咳活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(2): 85-88.
- [20] Undem 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.
- [21] 陈晓芳. 枇杷花醇提物镇咳、平喘、祛痰作用及其机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [22] Orita 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.