

## 杏贝止咳颗粒对豚鼠感染后咳嗽的治疗作用

袁胜男<sup>1</sup>, 张新庄<sup>2</sup>, 刘婧<sup>2</sup>, 范小雪<sup>2</sup>, 曹亮<sup>2</sup>, 王振中<sup>2</sup>, 肖伟<sup>1,2\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

**摘要:** **目的** 探讨杏贝止咳颗粒对豚鼠感染后咳嗽 (post-infectious cough, PIC) 的治疗作用。**方法** 除对照组外, 将 3~4 周龄 SPF 级雄性 Hartley 豚鼠采用鼻滴脂多糖、烟熏、辣椒素雾化激发来构建 PIC 豚鼠模型。造模成功后分为模型组及杏贝止咳颗粒低、中、高剂量 (0.93、1.86、3.72 g/kg) 组、阿斯美 (21.62 mg/kg) 组和苏黄止咳胶囊 (313.88 mg/kg) 组, 末次给药后 24 h, 通过辣椒素雾化诱咳测定咳嗽次数及潜伏期, 采用 ELISA 法检测血清、肺泡灌洗液和肺组织中 P 物质 (substance P, SP)、降钙素相关基因肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、神经肽 A (neurokinin A, NKA)、神经肽 B (neurokinin B, NKB)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 和缓激肽 (bradykinin, BK) 含量, 血液分析仪测定肺泡灌洗液中白细胞分类, 并用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肺组织病理变化。**结果** 与对照组比较, 模型组豚鼠体质量上升缓慢, 咳嗽次数明显增多 ( $P < 0.001$ ), 咳嗽潜伏期明显缩短 ( $P < 0.001$ ), 中性粒细胞和嗜酸性粒细胞占比显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 血清、肺泡灌洗液和肺组织中 SP、CGRP、NKA、NKB、NGF、PGE<sub>2</sub> 和 BK 含量均显著增高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 肺组织中炎性细胞浸润明显。与模型组比较, 杏贝止咳颗粒能够改善 PIC 豚鼠体质量增加缓慢趋势, 显著减少咳嗽次数 ( $P < 0.001$ ), 延长咳嗽潜伏期 ( $P < 0.001$ ), 显著降低白细胞中嗜酸性细胞和中性粒细胞比例 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 显著降低豚鼠血清、肺泡灌洗液和肺组织中 SP、CGRP、NKA、NKB、NGF、PGE<sub>2</sub> 和 BK 含量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 改善肺组织病理变化。**结论** 杏贝止咳颗粒对 PIC 豚鼠具有治疗作用。

**关键词:** 感染后咳嗽; 豚鼠; 杏贝止咳颗粒; 咳嗽敏感性; 神经源性炎症

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)10-3197-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.017

## Therapeutic effect of Xingbei Zhike Granules on post-infectious cough in guinea pigs

YUAN Sheng-nan<sup>1</sup>, ZHANG Xin-zhuang<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>2</sup>, FAN Xiao-xue<sup>2</sup>, CAO Liang<sup>2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of Xingbei Zhike Granules (杏贝止咳颗粒, XBZK) on post-infectious cough (PIC). **Methods** In addition to control group, 3—4 weeks old SPF male Hartley guinea pigs were used to establish PIC guinea pig model by nasal drops of lipopolysaccharide, smoking and capsaicin atomization. After successful modeling, guinea pigs were divided into model group, Xingbei Zhike Granules low-, medium- and high-dose (0.93, 1.86, 3.72 g/kg) groups, Asmeton (21.62 mg/kg) group and Suhuang Zhike Capsules (苏黄止咳胶囊, 313.88 mg/kg) group. After the last administration, cough frequency and latency were measured by capsaicin atomization. Substance P (SP), calcitonin gene related peptide (CGRP), neuropeptide A (NKA) and neuropeptide B (neuropeptide B, NKB), nerve growth factor (NGF), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and bradykinin (BK) levels in serum, alveolar lavage fluid and lung tissue were detected by ELISA. The leukocyte classification in alveolar lavage fluid was determined by blood analyzer. Pathological changes of lung tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with control group, the weight of guinea pigs in model group was slowly increased, the number of coughs was significantly increased ( $P < 0.001$ ), the latent

收稿日期: 2023-02-15

基金项目: 2021 年国家中医药管理局青年岐黄学者项目 (国中医药人教函[2022]6 号)

作者简介: 袁胜男 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发及过程控制。E-mail: 1163855048@qq.com

\*通信作者: 肖伟, 中国工程院院士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研发及过程控制。E-mail: kanionlunwen@163.com

period of cough was significantly shortened ( $P < 0.001$ ), the proportions of neutrophils and eosinophils were significantly increased ( $P < 0.01, 0.001$ ), and the contents of SP, CGRP, NKA, NKB, NGF, PGE<sub>2</sub> and BK in serum, alveolar lavage fluid and lung tissue were significantly increased ( $P < 0.01, 0.001$ ). Hyperplasia and inflammatory cell infiltration in lung tissue were obvious. Compared with model group, Xingbei Zhike Granules improved the slow increase trend of body weight in PIC guinea pigs, significantly reduced the number of coughs ( $P < 0.001$ ), prolonged the cough incubation period ( $P < 0.001$ ), significantly reduced the proportions of eosinophils and neutrophils in white blood cells ( $P < 0.01, 0.001$ ), and significantly reduced the contents of SP, CGRP, NKA, NKB, NGF, PGE<sub>2</sub> and BK in serum, alveolar lavage fluid and lung tissue ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), relieved the histopathological changes of lung tissue.

**Conclusion** Xingbei Zhike Granule has therapeutic effect on PIC guinea pigs.

**Key words:** post-infectious cough; guinea pigs; Xingbei Zhike Granules; cough sensitivity; neurogenic inflammation

感染后咳嗽 (post-infectious cough, PIC) 又称感冒后咳嗽, 患者遭受急性上呼吸道感染后, 感染本身症状消失, 胸部 X 线检查正常, 而咳嗽仍然迁延不愈, 持续时间 3 周以上<sup>[1]</sup>。临床上, 11%~40% 慢性咳嗽属 PIC<sup>[2-3]</sup>, 造成 PIC 的诱因有空气污染、受寒、过度疲劳后病毒或细菌感染、物理化学刺激或年老防御功能退化等多种因素。目前, PIC 病机尚不十分明确, 但大多数学者认为, 患者感染病原体后, 呼吸道上皮损伤, 气道的屏障作用减弱, 使得支气管及肺部咳嗽敏感器暴露, 被气道炎症激活产生咳嗽反射, 同时产生神经源性炎症, 使得气道处于高反应状态, 咳嗽反射的敏感性 (cough reflex sensitivity, CRS) 增加, 致使 PIC 发生<sup>[4-5]</sup>。

多年临床应用资料分析显示杏贝止咳颗粒对 PIC 患者有较好的疗效, 前期研究也证实, 源自临床验方的杏贝止咳颗粒, 可延长咳嗽模型动物的咳嗽潜伏期, 降低咳嗽次数, 增加小鼠气道酚红排出量和豚鼠气道排痰量, 降低炎症模型动物的耳肿胀和足趾肿胀, 改善细菌感染小鼠死亡率。但杏贝止咳颗粒对 PIC 的疗效和作用机制尚无相关报道。故本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 致 PIC 的造模方法<sup>[6]</sup>, 模拟 PIC 的病理表现, 观察杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠的生物效应, 并初步探讨其作用机制, 为临床应用提供理论支撑。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 Hartley 豚鼠 105 只, 3~4 周龄, 体质量 220~250 g, 购自青岛康大爱博生物科技有限公司, 合格证号 No.370823221100097572, 许可证号 SCXK (鲁) 2021-0003, 动物实验伦理批准号 2022080501。动物饲养于江苏康缘药业股份有限公司屏障环境下, 室温 (22±2) °C, 相对湿度 50%~60%。

### 1.2 药品与试剂

杏贝止咳颗粒 (批号 200405) 由江苏康缘药业

股份有限公司提供; 阿斯美 (批号 SY141AA) 购自第一三共制药 (上海) 有限公司; 苏黄止咳胶囊 (批号 21011811) 购自扬子江集团有限公司; LPS (批号 0000114327) 购自美国 Sigma 公司; 辣椒素 (批号 1018I021) 购自北京索莱宝科技有限公司; 南京香烟 (焦油量、烟气烟碱量、烟气一氧化碳量分别为 11、1.1、11 mg) 购自江苏中烟工业有限责任公司; 舒泰 50 (批号 BN8G4VA) 购自法国维克有限公司; 盐酸赛拉嗪注射液 (批号 20210102) 购自长沙拜特生物科技研究所有限公司; P 物质 (substance P, SP)、降钙素相关基因肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、神经肽 A (neurokinin A, NKA)、神经肽 B (neurokinin B, NKB)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 和缓激肽 (bradykinin, BK) ELISA 试剂盒 (货号分别为 DG40023G、DG40040G、DG40027G、DG40028G、DG96320Q、DG96307Q、DG96300Q, 批号均为 202208) 购自北京冬歌博业生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

自制烟箱 (1 m×1 m×0.5 m); YLS-8A 型多功能诱咳引喘仪 (上海欣软信息科技有限公司); FCI-280 型电热恒温培养箱 (日本 ASONE 公司); BY-R20 型医用离心机 (北京白洋医疗器械有限公司); EnSpire-23001437 型酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司)。

## 2 方法

### 2.1 给药剂量设计

杏贝止咳颗粒临床用量为 1 次 1 袋, 1 袋 4 g, 3 次/d。本研究采用 4 周龄雄性豚鼠, 体质量以 300 g 计, 参照第 3 版《药理实验方法学》及相关文献, 按体表面积等效剂量法计算豚鼠等效剂量为 930 mg/kg, 按照 1、2、4 倍设定药物低、中、高剂量组, 分别为 930、1860、3720 mg/kg。阿斯美按等效剂量系数折算法计算豚鼠等效剂量为 21.62 mg/kg, 苏黄止咳胶囊按等效剂量系数折算法计算豚鼠等效剂量

为 313.88 mg/kg。

## 2.2 动物分组、模型制备与给药

105 只 SPF 级雄性 Hartley 豚鼠适应性饲养 7 d 后, 除空白组 15 只外, 剩余 90 只豚鼠置于自制烟箱中, 用 8 支香烟和 50 g 锯末制造烟雾, 熏烟 30 min, 1 次/d, 连续 10 d, 自由进食饮水。之后分别第 11、14、17 天以舒泰 50 麻醉, 滴鼻 0.4 mg/mL LPS 溶液 (1 μL/g), 在第 12、13、15、16、18 天, 将豚鼠置于诱咳引喘仪中, 以 1×10<sup>-4</sup> mol/L 辣椒素溶液雾化吸入激发 3 min, 每日观察各组豚鼠状态。模型制备成功后根据咳嗽次数随机分组, 将豚鼠分为对照组、模型组及杏贝止咳颗粒低、中、高剂量 (930、1860、3720 mg/kg) 组和阿斯美 (21.62 mg/kg) 组、苏黄止咳胶囊 (313.88 mg/kg) 组, 每组 15 只。于第 19 天开始给药, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d。

## 2.3 检测指标

**2.3.1 体质量** 每日称定豚鼠体质量, 计算体质量变化率。

体质量变化率=(给药期体质量-第 1 天体质量)/第 1 天体质量

**2.3.2 咳嗽敏感性** 于末次给药 24 h 后, 把豚鼠放入多功能诱咳引喘仪的密闭钟罩内, 使用辣椒素溶液雾化吸入 3 min, 从仪器判断的第一声响亮咳嗽开始, 记录首次咳嗽时间和 8 min 内咳嗽次数 (包含雾化吸入 3 min 内人工记录的咳嗽次数)。

**2.3.3 血清中细胞因子检测** 咳嗽次数测定后, im 舒泰 50 (20 mg/kg) 和 ip 盐酸赛拉嗪注射液 (2

mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定豚鼠, 剪开腹部皮肤, 分离腹主动脉采血, 冰上静置 30 min, 3000 r/min 离心 15 min, 收集血清, -80 °C 保存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 SP、CGRP、NKA、NKB、BK、PGE<sub>2</sub> 和 NGF 含量。

**2.3.4 肺泡灌洗液中细胞因子检测及细胞分类计数** 采血后, 打开胸腔, 于豚鼠剑突上 5 mm 处采用倒“T”字形切口剪开皮肤, 上至下颚, 左右至腋下, 分离皮下结缔组织和肌肉, 暴露气管; 分离气管两侧及气管与食管间结缔组织, 游离气管。止血钳夹住右侧肺支气管, 将灌流针缓缓刺入气管, 针尖不超过胸锁关节, 缓缓抽出针芯并保持灌流软管不动, 用生理盐水冲洗支气管肺泡 3 次 (体积分别为 2、1、1 mL), 合并肺泡灌洗液, 4 °C、1500 r/min 离心 10 min, 收集上清分装, -80 °C 保存备用, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 SP、CGRP、NKA、NKB、BK、PGE<sub>2</sub> 和 NGF 含量; 收集细胞沉淀, 生理盐水重悬后进行白细胞分类计数。

**2.3.5 肺组织中细胞因子检测** 取右肺上叶, 生理盐水冲洗, 取 100 mg 新鲜右肺上叶组织, 加 900 μL PBS 和蛋白酶抑制剂, 冰上充分研磨, 5000×g 离心 10 min, 取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 SP、CGRP、NKA、NKB、BK、PGE<sub>2</sub> 和 NGF 含量。

**2.3.6 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺和支气管组织病理变化** 肺和支气管组织经 4% 多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋, 切片厚 4 μm, 进行 HE 染色, 由病理专业人员阅片。选取同一份样本 HE 切片的 2 个视野, 采用光学显微镜分别观察肺和支气管组织病理学改变, 评分标准见表 1、2。

表 1 肺组织评分标准<sup>[7-8]</sup>

Table 1 Criteria for lung tissue scoring<sup>[7-8]</sup>

评分	肺泡间隔增厚	炎性细胞浸润	支气管痉挛
0	单层细胞, 无增厚, 肺泡完整	正常, 无或偶见炎性细胞浸润	正常, 未见管腔狭窄
1	轻度增厚, 正常厚度的 1~3 倍, 偶可见肺泡壁断裂损伤	轻度, 散在浸润	轻度, 散见, 多数管腔大小正常
2	中度增厚, 正常厚度的 3~5 倍, 肺泡壁断裂	有中性粒细胞浸润	中度, 镜下均可见痉挛, 管腔狭窄
3	重度, 正常厚度的 5 倍以上, 肺泡壁断裂损伤, 肺泡结构仍可见	重度, 大量中性粒细胞浸润	重度, 严重痉挛, 管腔严重狭窄

表 2 支气管评分标准<sup>[7-8]</sup>

Table 2 Criteria for bronchial scoring<sup>[7-8]</sup>

评分	黏膜上皮肿胀和细胞脱落	杯状细胞增多	炎性浸润
0	正常, 绒毛排列整齐	正常, 未见杯状细胞增多	正常, 无或偶见炎性细胞浸润
1	黏膜上皮轻度水肿, 偶见上皮细胞脱落	轻度, 散见, 多数管腔大小正常	轻度, 散在浸润, 偶见聚集成团
2	黏膜上皮中度水肿, 部分脱落, 露出固有膜	中度, 黏液腺增生, 支气管微微扩张	中度, 聚集成团, 但尚未见侵及支气管黏膜下层
3	黏膜上皮重度水肿, 成片脱落, 固有膜破坏	重度, 黏液腺增生, 支气管扩张	重度, 大量成团, 侵及支气管黏膜下层甚至黏膜层

## 2.4 统计学分析

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  来表示, 采用 GraphPad prism 7 软件, 选择单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验联合 Dunnett 的多重比较测试方法进行数据统计分析。等级资料和无序资料以四分位数 [M (Q1, Q3)] 描述, 采用 SPSS 20.0 统计软件, 选择 K-W 非参数检验进行数据统计分析。

## 3 结果

### 3.1 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠体质量的影响

整个实验过程中, 杏贝止咳颗粒低、中剂量组豚鼠分别死亡 1 只和 2 只, 阿斯美组豚鼠死亡 1 只。造模和给药期间对豚鼠体质量进行监测, 如图 1 所示, 模型组豚鼠体质量增加缓慢, 给予杏贝止咳颗粒后, 杏贝止咳颗粒各剂量组 PIC 豚鼠体质量增加, 其中以高剂量组最为明显, 与阳性对照药苏黄止咳胶囊基本一致。

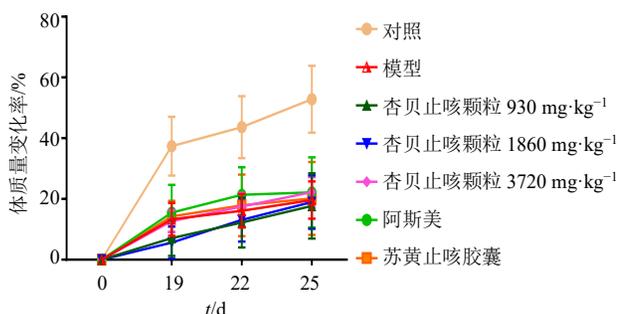


图 1 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠体质量的影响

Fig. 1 Effect of Xingbei Zhike Granules on body weight of guinea pigs with PIC

### 3.2 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠咳嗽敏感性的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组豚鼠咳嗽次数显著增多 ( $P < 0.001$ ), 咳嗽潜伏期显著缩短 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 杏贝止咳颗粒各剂量

表 3 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠咳嗽潜伏期和咳嗽次数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of Xingbei Zhike Granules on cough latency and frequency of guinea pigs with PIC ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	n/只	咳嗽潜伏期/s	咳嗽次数
对照	—	15	131.50 ± 32.10	4.00 ± 2.40
模型	—	15	46.40 ± 8.20 <sup>###</sup>	17.60 ± 5.30 <sup>###</sup>
杏贝止咳颗粒	930	14	96.50 ± 19.30 <sup>***</sup>	8.20 ± 4.30 <sup>***</sup>
	1860	13	103.80 ± 28.10 <sup>***</sup>	5.90 ± 3.00 <sup>***</sup>
	3720	15	128.90 ± 24.10 <sup>***</sup>	3.70 ± 2.20 <sup>***</sup>
阿斯美	21.62	14	93.80 ± 22.60 <sup>***</sup>	8.50 ± 4.10 <sup>***</sup>
苏黄止咳胶囊	313.88	15	109.50 ± 21.70 <sup>***</sup>	6.00 ± 4.40 <sup>***</sup>

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ , 下表同

<sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group, same as below tables

组豚鼠咳嗽次数和延长咳嗽潜伏期显著减少 ( $P < 0.001$ ), 且呈剂量相关性, 高剂量组药效与阳性药阿斯美基本一致。

### 3.3 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠血清和肺泡灌洗液中细胞因子水平的影响

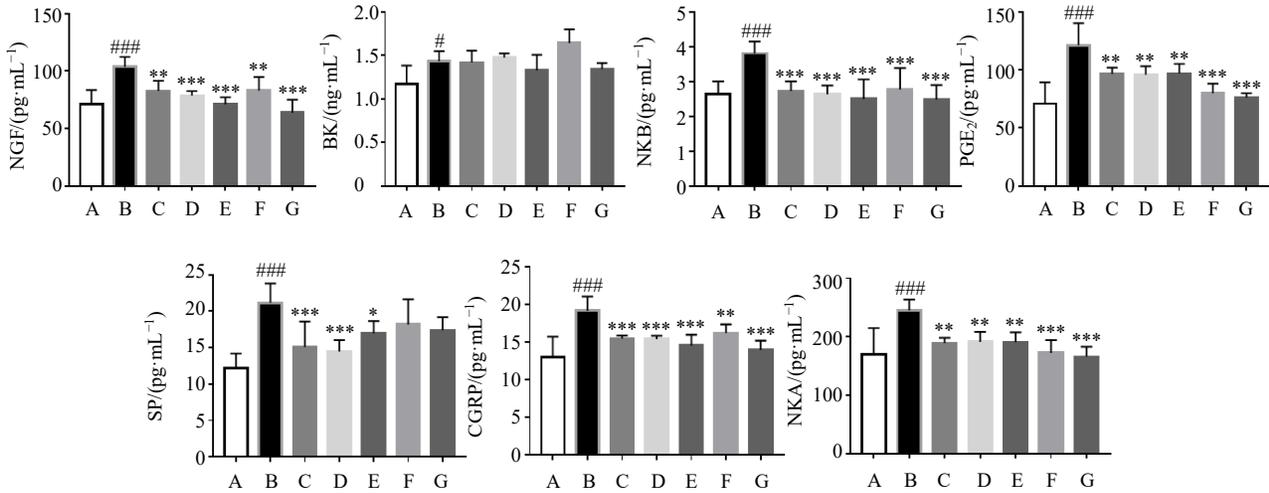
如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组血清中 SP、CGRP、NKA、NKB、PGE<sub>2</sub>、BK、NGF 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.001); 与模型组比较, 各给药组血清中 CGRP、NKA、NKB、PGE<sub>2</sub>、NGF 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001), 杏贝止咳颗粒各剂量组 SP 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.001)。

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组肺泡灌洗液中 CGRP、NKA、NKB、PGE<sub>2</sub> 和 NGF 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.001); 与模型组比较, 各给药组肺泡灌洗液中 CGRP、NKB 水平均显著降低 ( $P <$

0.05、0.01、0.001), 杏贝止咳颗粒低、高剂量组及阿斯美组和苏黄止咳胶囊组 NKA、PGE<sub>2</sub> 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 杏贝止咳颗粒低、中剂量组和苏黄止咳胶囊组 NGF 水平均显著降低 ( $P < 0.001$ ), 杏贝止咳颗粒高剂量组和苏黄止咳胶囊组 BK 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.4 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺泡灌洗液白细胞分类的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组白细胞总数、嗜碱性粒细胞及单核细胞占比无显著差异, 中性粒细胞和嗜酸性粒细胞占比显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001), 淋巴细胞占比显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组中性粒细胞和嗜酸性粒细胞占比显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 淋巴细胞占比显著升高 ( $P < 0.01$ 、0.001)。



A-对照组 B-模型组 C-杏贝止咳颗粒低剂量组 D-杏贝止咳颗粒中剂量组 E-杏贝止咳颗粒高剂量组 F-阿斯美组 G-苏黄止咳胶囊 与对照组比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001; 与模型组比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001, 图3、4同

A-control group B-model group C-Xingbei Zhike Granules low-dose group D-Xingbei Zhike Granules medium-dose group E-Xingbei Zhike Granules high-dose group F-Asmeton group G-Suhuang Zhike Capsules #*P* < 0.05 ##*P* < 0.01 ###*P* < 0.001 vs control group; \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 \*\*\**P* < 0.001 vs model group, same as below figs. 3, 4

图2 杏贝止咳颗粒对PIC模型豚鼠血清中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of Xingbei Zhike Granules on cytokine levels in serum of guinea pigs with PIC ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

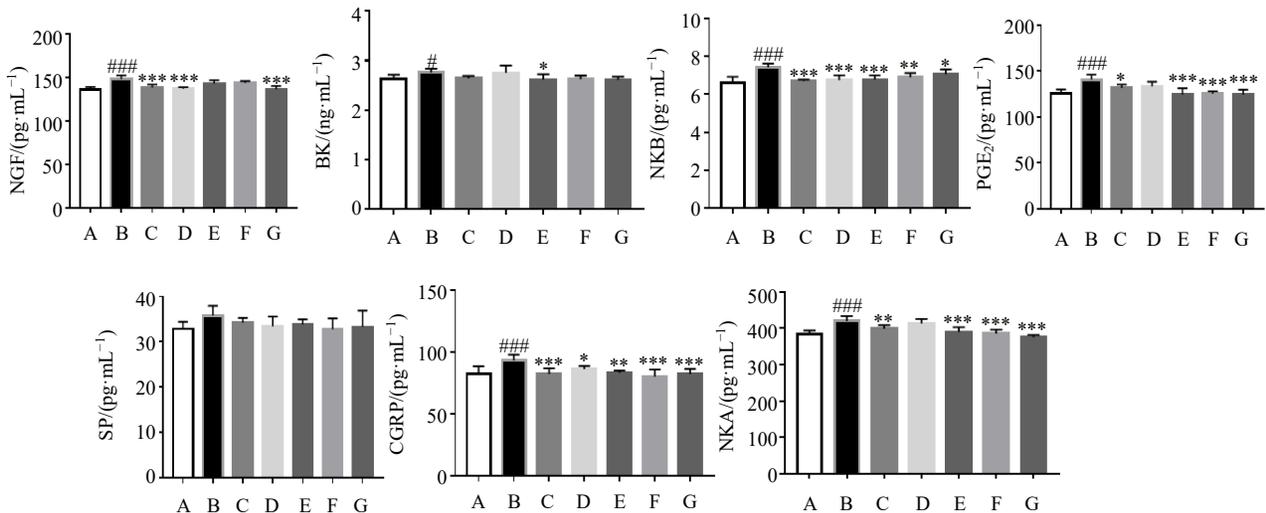


图3 杏贝止咳颗粒对PIC模型豚鼠肺泡灌洗液中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of Xingbei Zhike Granules on cytokine levels in alveolar lavage fluid of guinea pigs with PIC ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表4 杏贝止咳颗粒对PIC模型豚鼠肺泡灌洗液白细胞分类的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Xingbei Zhike Granules on white blood cell classification in alveolar lavage fluid of guinea pigs with PIC ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	白细胞/(1×10 <sup>9</sup> 个·L <sup>-1</sup> )	中性粒细胞/%	嗜酸性粒细胞/%	嗜碱性粒细胞/%	单核细胞/%	淋巴细胞/%
对照	—	0.91±0.56	28.62±5.89	3.72±2.09	2.60±1.97	5.95±1.36	60.57±6.90
模型	—	0.39±0.15	43.03±11.22###	11.32±0.93###	2.78±1.40	7.20±3.79	36.82±9.86###
杏贝止咳颗粒	930	1.91±0.86	13.68±2.51***	6.78±1.69**	2.92±2.47	3.97±1.23	74.13±2.45***
	1860	3.73±3.34**	13.67±5.05***	5.15±2.36***	2.40±2.59	3.18±1.44*	76.42±8.97***
	3720	2.32±1.08	9.90±5.73***	4.43±1.38***	4.17±3.64	3.72±2.60	80.30±8.97***
阿斯美	21.62	1.08±1.07	31.37±11.48*	7.78±3.31*	4.63±2.81	7.33±4.76	51.00±15.09*
苏黄止咳胶囊	313.88	3.52±1.26**	12.93±4.19***	4.62±0.67***	2.47±1.90	4.13±3.01	77.08±3.81***

### 3.5 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺组织中细胞因子水平的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组肺组织中 NGF、BK、NKB、PGE<sub>2</sub>、SP、CGRP 和 NKA 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 与模型组比较, 各给药组 NKB、PGE<sub>2</sub> 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 杏贝止咳颗粒各剂量组和阿斯美组 NGF、SP 和 NKA 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 杏贝止咳颗粒低、中剂量组和阿斯美组 BK 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

### 3.6 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺组织病理及评分的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组肺泡间隔为正常厚度的 5 倍以上, 肺泡壁断裂损伤, 肺泡结

构仍可见; 大量中性粒细胞浸润; 支气管严重痉挛, 管腔严重狭窄; 黏膜上皮重度水肿, 成片脱落, 固有膜破坏; 炎性细胞大量成团, 侵及支气管黏膜下层甚至黏膜层。与模型组比较, 各给药组肺泡间隔轻度增厚, 为正常厚度的 1~3 倍, 偶可见肺泡壁断裂损伤; 炎性细胞散在浸润; 支气管可见痉挛, 管腔狭窄; 黏膜上皮轻度水肿, 偶见上皮细胞脱落; 炎性细胞散在浸润。评分结果见表 5, 对照组豚鼠肺和支气管组织病理学检查有轻微病变, 与对照组比较, 模型组豚鼠肺和支气管组织病理评分均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 与模型组比较, 杏贝止咳颗粒高剂量组和阿斯美组肺组织评分均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 杏贝止咳颗粒各剂量组和阿斯美组支气管组织评分显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。

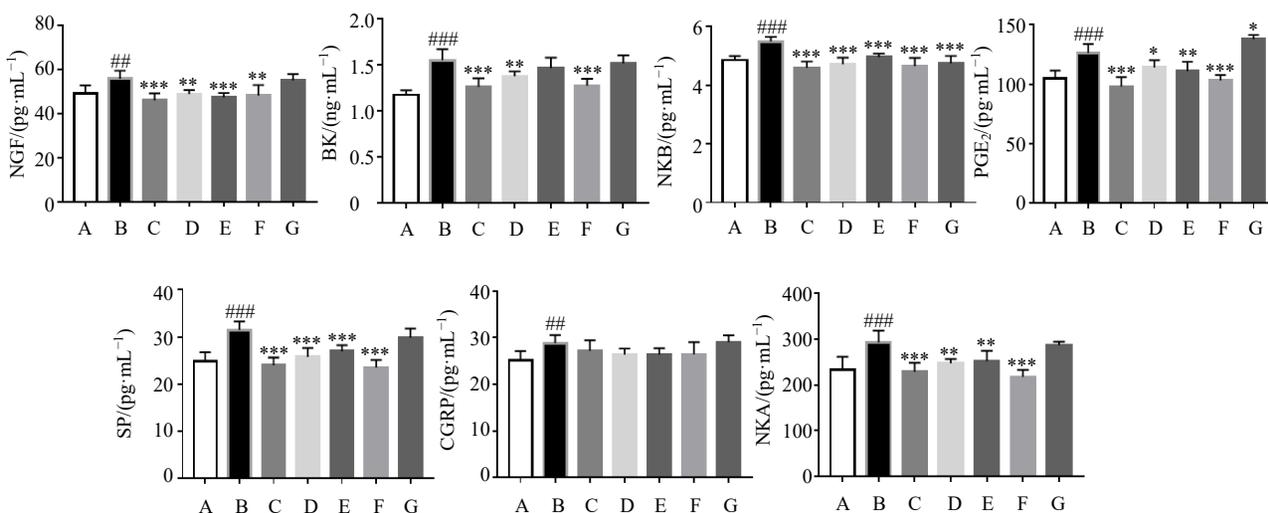
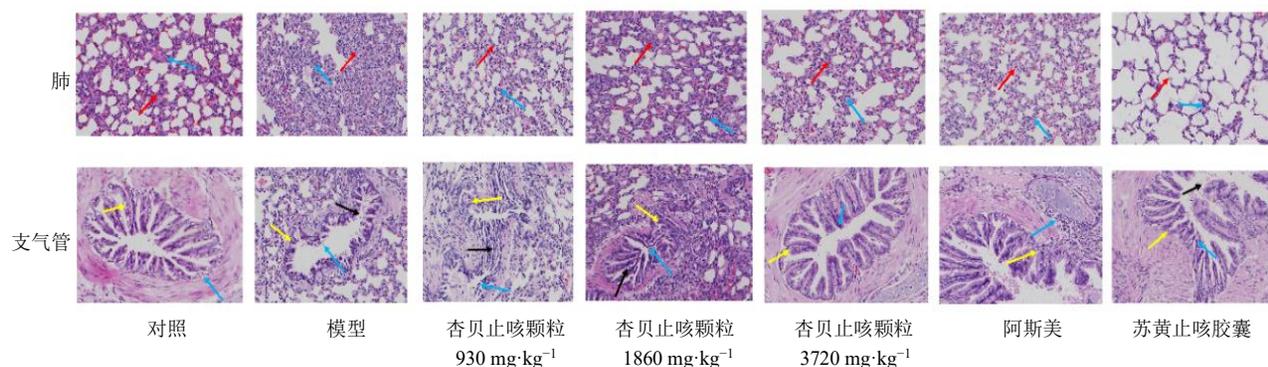


图 4 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺组织中细胞因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 4 Effect of Xingbei Zhike Granules on cytokine levels in lung tissue of guinea pigs with PIC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )



红色箭头表示肺泡间隔增厚, 蓝色箭头表示炎性细胞浸润, 黄色箭头表示上皮细胞脱落, 黑色箭头表示管腔狭窄

red arrows indicate alveolar septal thickening, blue arrows indicate inflammatory cell infiltration, yellow arrows indicate epithelial cell shedding and black arrows indicate bronchus narrowing

图 5 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺和支气管组织病理的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 5 Effect of Xingbei Zhike Granules on pathology of lung and bronchial tissue in guinea pigs with PIC (HE,  $\times 200$ )

表 5 杏贝止咳颗粒对 PIC 模型豚鼠肺和支气管组织病理学评分的影响

Table 5 Effect of Xingbei Zhike Granules on histopathological score of lung and bronchial tissue in guinea pigs with PIC

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	n/只	肺组织评分	支气管评分
对照	—	6	1.00 (1.00, 1.75)	2.00 (1.25, 2.00)
模型	—	6	2.50 (2.00, 3.00) ##	3.00 (3.00, 3.00) ###
杏贝止咳颗粒	930	6	2.50 (2.00, 3.00)	2.00 (2.00, 2.00) **
	1860	6	2.00 (2.00, 2.75)	2.00 (2.00, 2.00) ***
	3720	6	2.00 (1.25, 2.00) *	2.00 (2.00, 2.00) **
阿斯美	21.62	6	2.00 (1.25, 2.00) *	2.00 (2.00, 2.75) *
苏黄止咳胶囊	313.88	6	2.50 (2.00, 3.00)	3.00 (2.25, 3.00)

#### 4 讨论

气道神经源性炎症所致的高 CRS 是 PIC 发病关键环节。研究发现, 受到病毒、细菌和辣椒素等刺激后, 气道 C 类神经纤维上的瞬时受体电位类香草酸受体亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 被激活, 一方面使阳离子向胞内流动, 兴奋神经细胞, 产生动作电位, 引起咳嗽反射<sup>[9]</sup>; 另一方面, 使大量 Ca<sup>2+</sup>内流, 引起神经末梢突触内 SP、CGRP、NKA、NKB 等神经肽大量释放<sup>[10]</sup>, 与气道平滑肌、血管平滑肌、炎症细胞、黏液腺体等效应细胞作用释放组胺、缓激肽、前列腺素、白三烯以及白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis-α, TNF-α) 等炎症介质, 产生神经源性炎症反应 (主要表现为血浆蛋白外渗、支气管平滑肌收缩痉挛和黏液分泌增多), 降低咳嗽阈值, 导致气道高反应, 进而增高 CRS<sup>[11]</sup>。

在气道炎症释放的细胞因子中, 前列腺素 F2α (prostaglandin F2α, PGF2α) 与 EP3 结合后, 激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 与钙离子/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calcium/CaM-dependent protein kinase II, CaMKII) 作用对抗钙调素引起的 TRPV1 脱敏<sup>[12]</sup>; BK 与 BK2 受体结合, 激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC), 产生三磷酸肌醇 (inositol-1,4,5-trisphosphate, IP3) 和二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG), 其中 IP3 作用胞内钙库, 激活 CaMKII 抑制 TRPV1 脱敏, DAG 激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 磷酸化 TRPV1, 增强 TRPV1 受体敏感性<sup>[13-14]</sup>; NGF 可增加神经元细胞膜上离子通道数量降低 TRPV1 激活阈值, 同时也可激活 PLC/PKC 通路增加 TRPV1 受体敏感性, 提示气道炎症的细胞因子通过影响 TRPV1 受体敏感性<sup>[15]</sup>, 使得 CRS 快速动态变化。

临床上目前多采用 H<sub>1</sub> 受体拮抗剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质激素等抗炎药和止咳药来治疗 PIC,

但这些治疗大多都是急性期咳嗽用药, 效果并不理想, 且停药后多有反复<sup>[16]</sup>。中医药更强调多组分、多环节整体治疗<sup>[17]</sup>, 中医认为 PIC 系风邪犯肺、肺气失宣所致, 治疗宜疏风宣肺、止咳利咽。源自临床国医大师周仲瑛经验方——杏贝止咳颗粒由麻黄 (蜜炙)、苦杏仁、桔梗、前胡、浙贝母、百部、北沙参、木蝴蝶、甘草 9 味中药配伍而成, 具有清宣肺气、止咳化痰之功效, 用于外感咳嗽属表寒里热证, 症见微恶寒、发热、咳嗽、咯痰、痰稠质黏、口干苦、烦躁等外感咳嗽的表寒里热证<sup>[18]</sup>。

基于杏贝止咳颗粒显著的止咳化痰作用, 推测其可能成为治疗 PIC 的一种替代方案。为了验证杏贝对 PIC 的治疗作用, 建立 LPS 致 PIC 豚鼠模型, 观察杏贝对 PIC 豚鼠咳嗽的影响。发现杏贝止咳颗粒能够显著降低 PIC 豚鼠的咳嗽次数, 延长咳嗽潜伏期, 疗效与阿斯美、苏黄止咳胶囊相似, 且具有颗粒剂口服利用度高于胶囊剂、配伍组成无动物药而患者更易接受和疗程较短的特点。结果表明, 杏贝止咳颗粒可以有效减轻和延缓 PIC 的咳嗽症状, 是一种有效治疗 PIC 的中药。与对照组比较, 模型组豚鼠咳嗽敏感性增高, 肺组织增生和炎性细胞浸润明显, 肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数量显著增加, 血清、肺泡灌洗液和肺组织中 SP、CGRP、NKA、NKB、NGF、PGE<sub>2</sub> 和 BK 含量均显著增加, 经杏贝止咳颗粒治疗后, 可显著减少咳嗽次数, 延长咳嗽潜伏期, 改善组织增生和炎性细胞浸润, 降低肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞的数量, 减少血清、肺泡灌洗液和肺组织匀浆上清中 SP、CGRP、NKA、NKB、NGF、PGE<sub>2</sub> 和 BK 的含量。

综上, 本研究发现杏贝止咳颗粒能有效改善 PIC, 其机制可能与减少血清、肺泡灌洗液和肺组织中 SP、CGRP、NKA、NKB、NGF、PGE<sub>2</sub> 和 BK 的含量从而降低咳嗽敏感性有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 苏楠. 《咳嗽基层诊疗指南 (2018年)》的解读 [J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(11): 1112-1114.
- [2] Lai K F, Lin L, Liu B J, *et al.* Eosinophilic airway inflammation is common in subacute cough following acute upper respiratory tract infection [J]. *Respirology*, 2016, 21(4): 683-688.
- [3] 唐志军, 毛智荣, 屠春林, 等. 亚急性咳嗽 1007 例临床分析 [J]. 重庆医学, 2011, 40(33): 3399-3400.
- [4] 胡诣璋, 赵俊, 崔媛. 感染后咳嗽发病机制及治疗进展 [J]. 临床药物治疗杂志, 2016, 14(1): 11-16.
- [5] Capristo C, Rossi G A. Post-infectious persistent cough: Pathogenesis and therapeutic options [J]. *Minerva Pediatr*, 2017, 69(5): 444-454.
- [6] 李飞侠, 朱佳, 王文, 等. 一种感染后咳嗽动物模型制作方法的建立及评价 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(10): 2315-2317.
- [7] 岳盈盈, 李鹏, 李志会, 等. 呼吸道合胞病毒感染兔呼吸系统组织病理学的改变和相关指数评分标准的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6): 21-25.
- [8] 范开亮. HO-1 和中药大柴胡汤对重症急性胰腺炎大鼠胰腺和肺保护机制的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [9] Sadofsky L R, Ramachandran R, Crow C, *et al.* Inflammatory stimuli up-regulate transient receptor potential vanilloid-1 expression in human bronchial fibroblasts [J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(2): 75-81.
- [10] Lv H N, Yue J L, Chen Z, *et al.* Effect of transient receptor potential vanilloid-1 on cough hypersensitivity induced by particulate matter 2.5 [J]. *Life Sci*, 2016, 151: 157-166.
- [11] De Logu F, Patacchini R, Fontana G, *et al.* TRP functions in the broncho-pulmonary system [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(3): 321-329.
- [12] 赵祥安, 王瑞, 朱佳. TRPV1 在感染后咳嗽中的作用机制及其药物治疗前景 [J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(1): 125-128.
- [13] 衡立君, 高国栋, 陈军. 辣椒素受体 VR1 在局部炎症状态下的敏化机制 [J]. 神经解剖学杂志, 2004, 20(3): 315-318.
- [14] El-Hashim A Z, Jaffal S M, Al-Rashidi F T, *et al.* Nerve growth factor enhances cough via a central mechanism of action [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 74: 68-77.
- [15] Maher S A, Dubuis E D, Belvisi M G. G-protein coupled receptors regulating cough [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(3): 248-253.
- [16] 赖克方, 聂怡初. 感染后咳嗽发病机制、诊断与治疗研究进展 [J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2014, 7(5): 481-485.
- [17] 王延玲, 孙懿. 感冒后咳嗽的中医药干预进展 [J]. 上海医药, 2020, 41(12): 30-32.
- [18] 吴立峥, 李云涛, 邢磊. 杏贝止咳颗粒辅助治疗对老年慢性阻塞性肺疾病稳定期患者生活质量、焦虑抑郁状态及肺功能的影响 [J]. 药物评价研究, 2022, 42(12): 2541-2547.

[责任编辑 李亚楠]