

· 实验研究 ·

基于模型动物研究通腑泻肺灌肠液治疗急性支气管炎
药效及入血成分^{*}宋永真^{1,2,3} 李雅静^{2,3} 郭 幸^{2,3} 张振凌^{2,3,4▲} 汪 坤¹

摘要 目的:探讨通腑泻肺灌肠液治疗急性支气管炎的药效及入血成分,为基于“肺与大肠相表里”理论通过灌肠疗法治疗小儿急性支气管炎提供实验依据。**方法:**将 60 只大鼠随机均分为正常组、模型组、阳性药组(麻苈消咳颗粒组)及通腑泻肺灌肠液高、中、低剂量组,采用烟雾吸入法构建大鼠急性支气管炎模型。每天灌肠给药 1 次,连续给药 7 d,比较不同组别的肺组织病理形态学结果及白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;比较通腑泻肺灌肠液体外供试品及含药血清样品和空白血清样品的 HPLC 色谱图,根据保留时间及对照品,明确通腑泻肺灌肠液给药后血中入血成分。**结果:**与模型组比较,不同剂量的通腑泻肺灌肠液可以不同程度地改善急性支气管炎大鼠倦怠、食欲减退、皮毛松弛以及支气管和肺组织的损伤;通腑泻肺灌肠液各剂量组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量与模型组相比呈不同程度的减低($P < 0.01$);给药后血清样品有 9 个入血成分,5 个血中移行成分,3 个体内代谢成分,通过与对照品比对,指出 7 个成分,初步预测没食子酸和厚朴酚为通腑泻肺灌肠液的入血成分。**结论:**通腑泻肺灌肠液可以减轻烟熏引起的急性支气管炎,保护机制可能与 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平有关,没食子酸和厚朴酚可能是通腑泻肺灌肠液的体内直接作用物质,为其药效物质基础及药效机制奠定基础。

关键词 通腑泻肺灌肠液;急性支气管炎;IL-6;IL-1 β ;TNF- α ;HPLC;入血成分

急性支气管炎是儿童较为常见的呼吸系统疾病,主要以咳嗽、咳痰、发热为临床表现^[1]。中医认为小儿脾、肺常不足,易受外界影响,生痰湿阻于气道,肺不得肃清而发病,治疗应以止咳化痰为主。

崔应麟教授(以下简称“崔教授”)是第二届全国名中医,其长期从事中医临床、科研与教学工作,对中医灌肠疗法有深入研究,完成著作《中医灌肠疗法》,研制了“通腑泻肺灌肠液”医院制剂。通腑泻肺灌肠液由麻黄 6 g、炒苦杏仁 10 g、大黄 6 g、生石膏 30 g、瓜蒌 24 g、甘草 6 g 组成,具有清宣肺气,通腑泻热之功,主治邪毒闭肺,热结肠燥证,常用于治疗急性支气管炎、支气管哮喘等呼吸系统疾病。崔教授认为,肺

气受外邪侵袭会出现肺气郁闭,肺中痰浊化热后进而出现肠燥热结证,临床表现为咳嗽、黄痰,或兼喘息不宁等症状。此时通过清宣肺气,通腑泻热,可促使痰湿热毒从肠道排出,邪热从皮表外散,起到祛邪扶正的作用。通腑泻肺灌肠液不经过肝脏作用,直接进入大循环,可减少药物刺激,改善肠道的微生态环境,增加有益菌群,还可避免儿童吃药或打针时所产生的恐惧心理,减轻用药困难,且不易导致呕吐。因此该剂型深受儿童家长的喜欢,但其药效物质基础与作用机制尚未完全阐明。

中药血清药代动力学^[2]是一门以传统药理学为基础的应用学科,对接受中药治疗后血清中的流动成分进行分析鉴定,可确定中药有效性的物质基础。本研究通过测定血清中的 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 相关炎性因子,分析不同组别血清及体外供试品的 HPLC 图,进而与混合对照品比对,确定通腑泻肺灌肠液的入血成分,为其在临床的深入研究提供一定参考。

^{*}基金项目 河南省中医药拔尖人才培养项目(No. 豫卫中医函[2021]15号);河南省中医药科学研究专项(No.2022ZY1093)

▲通信作者 张振凌,女,教授。研究方向:中药饮片质量及炮制作用机制研究。E-mail:zhangzl6758@163.com

• 作者单位 1.河南省中医院(河南 郑州 450046);2.河南中医药大学药学院(河南 郑州 450046);3.河南省中药特色炮制技术工程研究中心(河南 郑州 450046);4.河南省中药饮片炮制重点实验室(河南 郑州 450046)

1 材料

1.1 动物 体质量为 180~220 g 的 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,动物合格证号:SCXK(鲁)2020003。实验过程严格遵守“3R”原则。动物伦理审查批准编号 DWLLGZR202202211。动物置于实验环境中饲养,在正常的光照条件下,大鼠可自由饮水和进食。

1.2 药材 麻黄、炒苦杏仁、大黄、生石膏、瓜蒌、甘草饮片及麻苈消咳颗粒经河南中医药大学药学院张振凌教授鉴定均为正品。样品信息见表 1。

表 1 样品信息

| 药材 | 生产厂家 | 批号 |
|--------|------------|-----------|
| 麻苈消咳颗粒 | 天长亿帆制药有限公司 | Z20040092 |
| 麻黄 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |
| 生石膏 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |
| 炒苦杏仁 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |
| 瓜蒌 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |
| 大黄 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |
| 甘草 | 康美药业股份有限公司 | 20230201 |

1.3 试剂与仪器 试剂与仪器的生产厂家及批号见表 2。

2 方法

2.1 造模及给药 大鼠购入后适应性饲养 3 d,随后将大鼠随机分为正常组、模型组、麻苈消咳颗粒组(0.24 g/kg,简称为“阳性药组”),以及通腑泻肺灌肠液高、中、低剂量组(分别简称为“高剂量组”“中剂量组”“低剂量组”,给药浓度分别为 20 mL/kg、10 mL/kg、5 mL/kg),每组 10 只。除去正常组,其余组大鼠置于自制的烟箱中,每次用香烟 20 支烟雾刺激 1 h,每日 2 次,共 14 d^[3]。烟雾刺激 10 d 后,每组各取 3 只,取肺组织做病理切片,观察造模是否成功。造模成功后,阳性药组、高剂量组、中剂量组、低剂量组分别按对应的给药浓度灌肠给药 7 d,正常组及模型组给予相同体积的蒸馏水灌肠。

2.2 取材 灌肠给药 7 d 后,大鼠禁食 12 h(不禁水)。打开大鼠腹腔,用注射器抽取腹主动脉血 4 mL,置于采血管室温静置,完全凝固后,以 3000 r/min 离心 5 min 分离血清,置于-80 °C 冰箱保存。同时取肺组织用 4% 多聚甲醛固定,用于 HE 染色。

2.3 大鼠生化指标的检测 取出冻存的大鼠血清标本,采用 Elisa 法测定 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量。

2.4 色谱条件 色谱条件见表 3。

2.5 体外供试品溶液的制备 称取麻黄 6 g、生石膏

表 2 试剂与仪器信息

| 试剂与仪器 | 生产厂家 | 批号 |
|-------------------------|-----------------|---------------|
| IL-6 ELISA 试剂盒 | 江苏酶免实业有限公司 | MM-0190R1 |
| L-1 β ELISA 试剂盒 | 江苏酶免实业有限公司 | MM-0047R1 |
| TNF- α ELISA 试剂盒 | 江苏酶免实业有限公司 | MM-0180R1 |
| 酶标分析仪 | 美国 Bio-Rad 公司 | 20180908 |
| 高速冷冻离心机 | 上海伊沐医疗器械有限公司 | 20170312 |
| 超纯水系统 | 美国 Millipore 公司 | 20191203 |
| 电子天平 | 北京赛多利斯科学仪器有限公司 | 20170823 |
| 大黄酚 | 中国食品药品检定研究院 | 110796-201922 |
| 香草酸 | 中国食品药品检定研究院 | 110776-201805 |
| 没食子酸 | 中国食品药品检定研究院 | 110736-200526 |
| 大黄酸 | 中国食品药品检定研究院 | 110757-201607 |
| 盐酸伪麻黄碱 | 中国食品药品检定研究院 | 171237-201510 |
| 盐酸麻黄碱 | 中国食品药品检定研究院 | 171241-201809 |
| 厚朴酚 | 中国食品药品检定研究院 | 110729-202015 |
| 芦荟大黄素 | 中国食品药品检定研究院 | 110795-201609 |
| 没食子酸甲酯 | 中国食品药品检定研究院 | 111549-201605 |
| 甲醇 | 安徽天地高纯溶剂有限公司 | 20231002 |
| 乙腈 | 安徽天地高纯溶剂有限公司 | 20231005 |
| 磷酸 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 | 20230919 |
| 甲酸 | 天津市大茂化学试剂厂 | 20230919 |
| 水 | 实验室自制 | 20230919 |

表 3 色谱条件

| 项目 | 具体内容 |
|--------|--|
| 色谱柱 | Sunfire C ₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m) |
| 流动相 | A 为乙腈, B 为 0.3% 磷酸水溶液 |
| 梯度洗脱程序 | 0~28 min, 5%A~20%A; 28~50 min, 20%A~26%A; 50~55 min, 26%A~31%A; 55~68 min, 31%A~36%A; 68~80 min, 36%A~42%A; 80~85 min, 42%A~52%A; 85~92 min, 52%A~69%A; 92~102 min, 69%A~85%A; 102~106 min, 85%A~100%A; 106~110 min, 100%A~5%A |
| 流速 | 1 mL/min |
| 柱温 | 30 °C |
| 检测波长 | 210 nm |
| 进样量 | 10 μ L |

30 g(先煎)、炒苦杏仁 10 g、瓜蒌 24 g、大黄 6 g(后下)、甘草 6 g,将药材置于电陶瓷壶中,煎煮 2 次。第 1 次生石膏加 8 倍量水先煎煮 30 min,煎好后,将生石膏和水煎液倒入加 8 倍量水浸泡的麻黄、炒苦杏仁、瓜蒌、甘草中,煎煮 20 min,再加入大黄共煎 10 min,滤过;第二次煎煮加 6 倍量水,煎煮 30 min,煎液滤过,将 2 次过滤得到的药液混合,减压蒸干,残渣加 50% 甲醇溶解并定容到 5 mL 量瓶中,摇匀滤过即得。

2.6 混合对照品溶液的制备 分别取没食子酸、盐

酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、没食子酸甲酯、香草酸、芦荟大黄素、厚朴酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,分别制成质量浓度为0.32、0.23、0.28、0.35、0.22、0.24、0.36 mg/mL的混合对照品溶液。

2.7 血清样品处理 取-80 °C保存的血清样本,于4 °C下解冻;取血清样本和甲醇以1:1混合于2 mL离心管,在4 °C下,以12000 r/min离心15 min,全部上清液用移液枪吸出至离心管后进行氮吹;加入50 μL甲醇复溶残渣,在4 °C下,12000 r/min离心15 min,取上清液用于测定。

2.8 样品测定及分析 根据高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)条件,取体外供试品溶液以及含药血清样品进行测定,通过比较不同组别的HPLC图,确定入血成分及移行成分,并与对照品色谱峰比对,指认色谱峰成分。

3 结果

3.1 大鼠一般状态比较 正常组大鼠饮食正常、呼吸均匀,毛发顺滑有光泽,较活跃,没有咳嗽和咳喘等症状。模型组大鼠出现疲劳、行动迟缓、食欲减退、毛发松弛枯燥,伴随咳嗽、喘息;随着烟熏时间的加长,症状逐渐加重。给药后,与模型组比较,通腑泻肺灌肠液各剂量组及阳性药组大鼠活动频率和饮食增加,咳嗽和呼吸急促等状态有不同程度的改善,症状减轻。

3.2 对肺组织病理形态学的影响 HE染色结果显示,正常组大鼠肺泡结构清晰,肺泡腔内无渗出;模型组大鼠支气管壁局部增厚,有肺泡壁增厚、黏膜充血、水肿等情况;通腑泻肺灌肠液各剂量组及阳性药组大鼠气管内分泌物、肺泡壁厚度较模型组显著减少,炎症细胞浸润等症状较模型组显著改善。见图1。

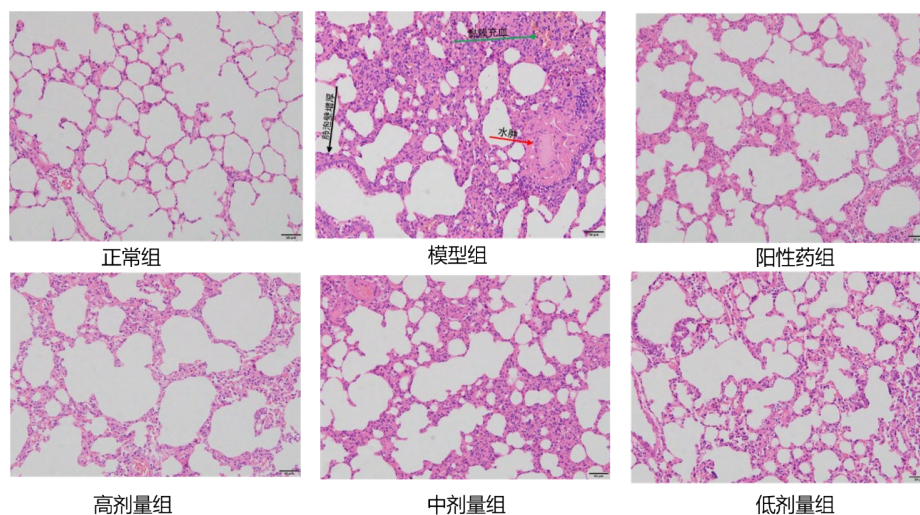


图1 通腑泻肺灌肠液对急性支气管炎模型大鼠肺组织病理形态学的影响(HE染色,×200)

3.3 对急性支气管炎模型大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α含量的影响 模型组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α含量与正常组比较显著升高($P<0.01$);通腑泻肺灌肠液各剂量组大鼠血清中IL-6、IL-1β、TNF-α含量与模型组相比呈不同程度的减低($P<0.01$)。见图2。

3.4 方法学考察

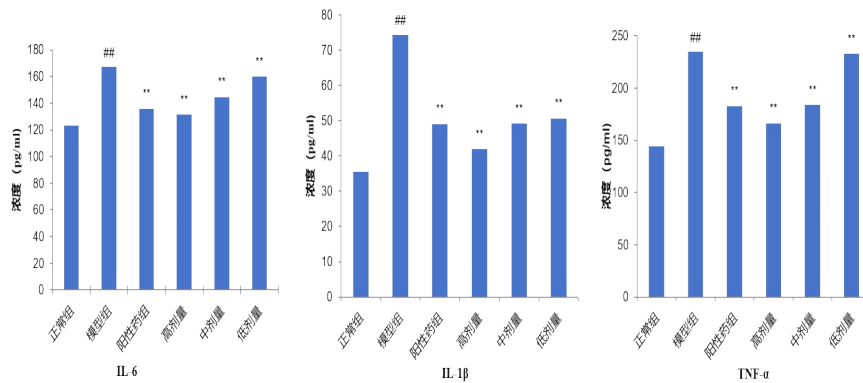
3.4.1 精密度试验 取同一份通腑泻肺灌肠液中剂量组大鼠血清,按照“2.4”项下色谱条件连续进样6次,结果各共有峰的相对保留时间RSD<2.61%,相对峰面积RSD<2.55%,表明仪器精密度良好。

3.4.2 重复性试验 取同一批次通腑泻肺灌肠液中剂量组大鼠血清,按照“2.5”项下方法平行制备6份供

试品溶液,按照“2.4”项下色谱条件进样分析,结果各共有峰的相对保留时间RSD<2.89%,相对峰面积RSD<2.50%,表明该方法重复性良好。

3.4.3 稳定性试验 取同一份通腑泻肺灌肠液中剂量组大鼠血清分别在溶液制备后0、2、4、8、12、24 h,在“2.4”项下色谱条件下进行测定,结果各共有峰的相对保留时间RSD<2.69%,相对峰面积RSD<2.63%,表明血清供试品溶液在24 h内稳定。

3.5 通腑泻肺灌肠液给药大鼠血中多种成分分析 对大鼠灌肠给药后血清样品图谱进行色谱指纹图谱相似度分析,获得其共有峰。根据其相应数据,与体外供试品的HPLC图谱色谱峰比较,结果发现通腑泻肺灌肠液给药后血清样品有9个入血成分(峰1、峰4、

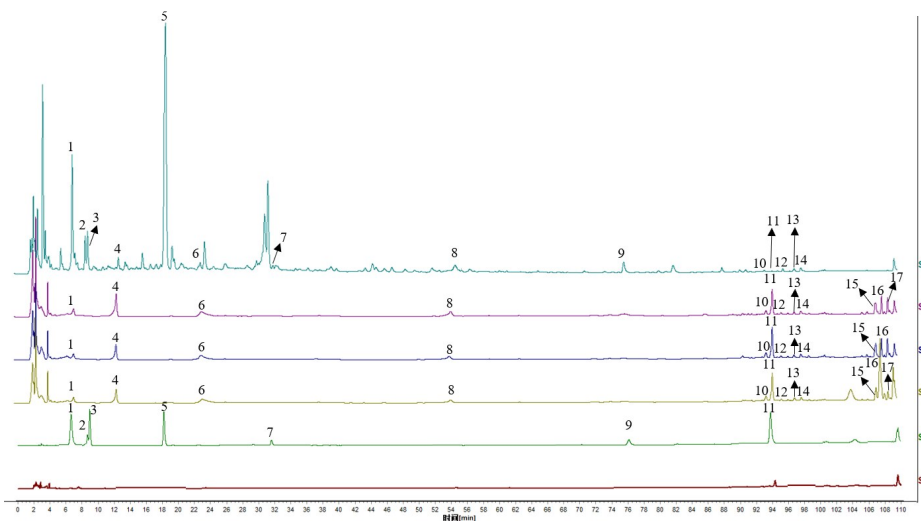


与正常组比较,## $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$ ($\bar{x} \pm s, n=7$)

图2 通腑泻肺灌肠液对急性支气管炎模型大鼠血清IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量的影响

峰6、峰8、峰10、峰11、峰12、峰13、峰14),有5个血中移行成分(峰2、峰3、峰5、峰7、峰9),有3个体内代谢成分和应激产物(峰15、峰16、峰1)。通过与对照品

比对,推测峰1为没食子酸、峰2为盐酸麻黄碱、峰3为盐酸伪麻黄碱、峰5为没食子酸甲酯、峰7为香草酸、峰9为芦荟大黄酸、峰11为厚朴酚。见图3。



S1. 空白血清;S2. 混合对照品;S3. 高剂量血清;S4. 中剂量血清;S5. 低剂量血清;S6. 体外供试品;1. 没食子酸;2. 盐酸麻黄碱;3. 盐酸伪麻黄碱;5. 没食子酸甲酯;7. 香草酸;9. 芦荟大黄酸;11. 厚朴酚

图3 通腑泻肺灌肠液给药大鼠血中多种成分HPLC图

4 讨论

急性支气管炎是呼吸系统常见病^[4],主要表现为咳嗽急性发作并持久,可能伴咯痰^[5]。由于小儿免疫力低下,急性支气管炎感染时有发生,目前西医学常采用抗生素类药物对儿童上呼吸道感染进行治疗,但抗生素不良反应较多,易产生耐药性,疗效亦欠佳。近年来越来越多医者把目光转向中医药,其中,中药灌肠疗法逐渐被更多人接受。本研究通过对促炎因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平进行检测,来评价通腑泻肺灌肠液的疗效,并结合HPLC法明确其入血成分,为该方的临床应用提供实验依据。

目前支气管炎造模的方法较多,如采用注入脂多糖、氨水雾化、二氧化硫吸入、定点种植流感病毒等^[3],但烟熏法更符合人类罹患急性支气管炎的环境。研究^[6]表明,烟熏法可以诱导气道产生炎症细胞及炎症因子,引发咳嗽等高敏反应,符合急性支气管炎非特异性炎症的病理特征。本实验通过烟熏法构建急性支气管模型,比其他方法用时更短、更容易操作,且更符合实际情况。

通腑泻肺灌肠液乃《伤寒论》中的麻杏石甘汤与《温病条辨》记载的宣白承气汤的合方,是全国名中医崔教授的经验方,已在临床应用30余年。此方是在“六腑以通为用”思想指导下形成的,与“醒脑灌肠液”

“通脉祛浊散”等中药制剂一脉相承。通腑泻肺灌肠液由麻黄、生石膏、炒苦杏仁、瓜蒌、大黄、甘草组成,具有清宣肺气、通腑泻热之功,药简力专。方中麻黄为君,生石膏为臣,麻黄味辛、温,可使肺气宣畅而宣肺平喘,散寒通滞以逐经络阴寒之邪,然麻黄性温,故方中生石膏数倍于麻黄,使麻黄宣肺而不助热,麻黄使生石膏清泻肺中壅热而不凉遏;炒苦杏仁、大黄、瓜蒌为使,与麻黄相伍一宣一降,旨在恢复肺之气机升降出入之序;甘草既可缓和麻黄辛温发散较强之性,又可协助麻黄宣肺而达到补气之功,还可辅助生石膏清热益气生津,能调和药性而达到清宣肺气,通腑泻热之功。其中,炒苦杏仁苦降肺气,药性平和,又略兼宣散之性;大黄、瓜蒌肃降肺气,使肺中痰湿为邪热得以从肠道排出;炒苦杏仁、大黄、瓜蒌得生石膏可使肺中邪热得以降泻,以复肺气清肃之令。

IL-6、IL-1 β 和TNF- α 是炎症发生、发展过程中起重要作用的细胞炎症因子。本研究结果表明,正常组大鼠血清中IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平显著低于模型组。可见,IL-6、IL-1 β 和TNF- α 是急性支气管炎发病机制中的重要促炎因子,也是引起气道高反应性的关键因素。通腑泻肺灌肠液高剂量组与阳性药组血清中的IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平较模型组明显下降,中剂量组与低剂量组有不同程度的降低,这与促炎因子与抗炎因子系统之间的不平等导致气道炎症引起的急性支气管炎的结论一致。对血中多种成分进行分析,可以为筛选通腑泻肺灌肠液的Q-marker(质量标志物)提供可行依据^[7]。通过与对照品比对,本研究鉴别出5个移行成分,分别为盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱^[8]、没食子酸甲酯、香草酸、芦荟大黄酸;2个人血成分,分别为没食子酸^[9]和厚朴酚,另外有7个人血成分未鉴别出,仍需要通过其他质谱技术进一步鉴定。其中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱属于君药麻黄中的生物碱类成分,有文献^[10]报道麻黄碱的平喘作用与中枢作用相关,可促使支气管平滑肌松弛、黏膜毛细血管收缩,还可通过神经途径影响下丘脑的温度控制中心,从而产生发汗效应。有研究^[11]报道,没食子酸可以减轻小鼠哮喘的异常,其机制是没食子酸抑制了myd88的表达,下调核因子 κ B信号传导,降低IL-33的表达,从而阻止IL-33介导的2型淋巴细胞活化和随后Th2的释放。此外,没食子酸可以抑制促细胞炎性因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的分泌,对革兰阴性菌细胞壁中的脂多糖诱发炎症反应起间接抑制作用^[12]。厚朴酚可明显降低大鼠模型中炎症细胞因子

IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达,增加垂体、肾上腺和血清糖皮质激素中促肾上腺皮质激素的含量,改善大脑中的神经炎症反应^[13]。实验结果表明,入血成分没食子酸、厚朴酚与通腑泻肺灌肠液治疗支气管炎等药效密切相关,为药效物质基础及药效机制研究奠定了基础。

综上所述,通腑泻肺灌肠液各剂量组可以不同程度降低急性支气管炎模型大鼠血清中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量,推测其可以显著改善大鼠的整体状态,作用机制可能与IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子有关,通过血清指纹图谱研究方法初步确定通腑泻肺灌肠液的人血成分为没食子酸和厚朴酚。本研究结果可为通腑泻肺灌肠液治疗急性支气管炎提供试验数据,具有一定的临床意义。

参考文献

- [1]黄艳青. 肺力咳合剂联合孟鲁司特钠对急性支气管炎患儿血清炎症介质水平的影响[J]. 实用中西医结合临床, 2023, 23(14): 109-112.
- [2]杨会锦, 尹华. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(5): 399-402.
- [3]李炜, 张丹参. 诱发慢性支气管炎动物模型方法及评价[J]. 神经药理学报, 2019, 9(1): 18-22.
- [4]金文峰, 吴雪芳, 方艳君. 清肺化痰止咳方联合吸入用乙酰半胱氨酸治疗小儿急性支气管炎痰热壅肺证临床研究[J]. 实用中医药杂志 2023, 39(10): 1995-1998.
- [5]王爽. 小儿急性支气管炎应用中医贴敷疗法的临床体会[J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(9): 109-110.
- [6]李敏, 魏朝霞. 小儿清肺止咳口服液对烟雾诱发的急性支气管炎大鼠的血清IL-4及IFN- γ 水平的影响[J]. 中国妇幼保健研究, 2017, 28(5): 524-525, 546.
- [7]张莉野, 田成旺, 刘素香, 等. 桂枝茯苓方的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(2): 265-272.
- [8]邝林娟, 毛国华, 陈刚, 等. 高效液相色谱法测定哮喘片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱及苦杏仁苷的含量[J]. 新中医, 2023, 55(5): 18-21.
- [9]赵芳, 赵青, 刘玮琳, 等. 没食子酸减轻香烟烟雾诱导的小鼠气道炎性反应[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(11): 1648-1654.
- [10]彭秘, 苏丹, 李晗芸, 等. UHPLC-QTOF-MS-E与UHPLC-MS/MS分析麻黄生物碱在血脑屏障间的移行及脑区分布特征[J]. 药理学学报, 2017, 52(9): 1437-1443.
- [11]LORICCO J G, XU C S, NEIDLEMAN J, et al. Gallic acid is an antagonist of semen amyloid fibrils that enhance HIV-1 infection [J]. Biol Chem, 2016, 291(27): 14045-14055.
- [12]栾淞莹. 没食子酸在烟曲霉菌性角膜炎中的抗真菌及抗炎作用研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [13]张明发, 沈雅琴. 厚朴提取物、厚朴酚及和厚朴酚的抗炎作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(12): 2739-2746.

(收稿日期: 2024-01-17)

(本文编辑: 金冠羽)