

百部新碱与罗汉果皂苷V联用对小鼠的镇咳、祛痰作用研究^Δ

吴旂^{1,2*}, 江仁望³, 赵斌^{1,2} (1. 中山火炬职业技术学院生物医学系, 广东 中山 528436; 2. 国家中药现代化工程技术研究中心中山健康产品分中心, 广东 中山 528436; 3. 暨南大学药学院, 广州 510632)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1755-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.08

摘要 目的: 研究百部新碱与罗汉果皂苷V联用后对小鼠镇咳、祛痰作用的影响, 并筛选其最优配比。方法: 各实验均选70只小鼠随机分为7组, 分别为溶剂组(生理盐水)、可待因(15 mg/kg)或氨溴索(30 mg/kg)组(阳性对照)、百部新碱组(30 mg/kg)、罗汉果皂苷V组(30 mg/kg)和质量比分别为2:1、1:1、1:2的百部新碱-罗汉果皂苷V联用组(30 mg/kg), ig给药, 每天1次。分别进行氨水致咳实验(阳性药物为可待因)和气管酚红排泌实验(阳性药物为氨溴索), 以咳嗽潜伏期、咳嗽次数和气管酚红排泌量为指标, 比较各组药物的镇咳、祛痰作用。结果: 与溶剂组比较, 各给药组小鼠的咳嗽潜伏期明显缩短、咳嗽次数明显减少、气管酚红排泌量明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与罗汉果皂苷V组比较, 百部新碱-罗汉果皂苷V不同配比组小鼠的咳嗽潜伏期明显缩短、咳嗽次数明显减少($P < 0.05$), 且以2:1、1:1配比组效果较好; 与百部新碱组比较, 百部新碱-罗汉果皂苷V不同配比组小鼠的气管酚红排泌量明显增加($P < 0.05$), 且以1:1、1:2配比组效果较好。结论: 百部新碱与罗汉果皂苷V联用后对镇咳、祛痰具有协同作用, 可以百部新碱-罗汉果皂苷V质量比为2:1、1:1作为该组合配比优选的参考。

关键词 百部新碱; 罗汉果皂苷V; 镇咳; 祛痰; 小鼠

Study on the Relieving Cough and Eliminating Phlegm Effects of Stemoninine Combined with Mogroside V on Mice

WU Yi^{1, 2}, JIANG Renwang³, ZHAO Bin^{1, 2} (1. Dept. of Biomedical Sciences, Zhongshan Torch Polytechnic, Guangdong Zhongshan 528436, China; 2. Zhongshan Health Products Sub-center, National Engineering Research Center for Modernization of TCM, Guangdong Zhongshan 528436, China; 3. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the relieving cough and eliminating phlegm effects of stemoninine combined with mogroside V on mice, and select its optimal ratio. **METHODS:** 70 mice were selected in each experiment and randomly divided into 7 groups, namely solvent group (normal saline), codeine (15 mg/kg) or ambroxol (30 mg/kg) group (positive control), stemoninine group (30 mg/kg), mogroside V group (30 mg/kg), stemoninine-mogroside V combination group (30 mg/kg) with mass ratio of 2:1, 1:1, 1:2, ig, once a day. Ammonia-induced cough experiment (positive drug was codeine) and tracheal phenol red excretion experiment (positive drug was ambroxol) were respectively conducted. Using cough latent period, cough times and volume of tracheal phenol red excretion as indexes, the antitussive and expectorant effects of drug in each group were compared. **RESULTS:** Compared with solvent group, cough latent period was obviously shortened, cough times was obviously reduced, volume of tracheal phenol red excretion was obviously increased in each administration group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with mogroside V group, cough latent period was obviously shortened, cough times was obviously reduced in stemoninine-mogroside V group with different mass ratios ($P < 0.05$), and 2:1, 1:1 groups showed the best effects. Compared with stemoninine group, volume of tracheal phenol red excretion was obviously increased in stemoninine-mogroside V group with different mass ratios ($P < 0.05$), and 1:1, 1:2 groups showed the best effects. **CONCLUSIONS:** The combination of stemoninine and mogroside V shows synergistic effects on relieving cough and eliminating phlegm, stemoninine-mogroside V mass ratio of 2:1, 1:1 can be used as preferred combination of reference.

KEYWORDS Stemoninine; Mogroside V; Relieving cough; Eliminating phlegm; Mice

百部新碱是从传统中药百部中发现的新型镇咳药先导物^[1-3], 具有自主知识产权(已获得美国授权专利1项)^[4]。前期镇咳作用机制研究表明, 其可通过抑制周围神经使咳嗽阈值升高^[5], 最终减轻咳嗽症状, 且无中枢呼吸抑制作用; 急性毒性实验结果表明, 百部新碱ig给药

4.0 g/kg时, 未见小鼠死亡, ip给药的半数致死量(LD₅₀)为2.3 g/kg; 一般药理学研究未见其对心血管系统、呼吸系统和神经系统的毒性。研究表明, 罗汉果皂苷V ip给药10 mg/kg时对小鼠就有明显的祛痰作用, 咳嗽抑制率达到52.93%, 并呈一定的量效关系; 当罗汉果皂苷V的给药量增加至75 mg/kg时能明显延长小鼠咳嗽潜伏期, 且其甜度是蔗糖的256~344倍^[6]。

百部新碱与传统镇咳药相比, 可针对咳嗽的多种原因进行镇咳, 具有高效、低毒的优势, 但百部新碱味苦。此外, 咳嗽为一种综合症状, 常伴随痰液的产生, 并因痰

^Δ 基金项目: 广东省省级科技计划项目(No.2013A022100029); 中山市科技计划项目(No.2015B2306); 广东省一流高职院校建设项目(粤教高函[2016]250号)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药理学、新药研发。电话: 0760-88291713。E-mail: 524169050@qq.com

液而加重咳嗽,而百部生物碱虽能镇咳,但祛痰作用不明显。为达到治疗咳嗽的目的,将作用机制明确、作用靶点不同的祛痰药按照合理的剂量进行组合应用,可达到协同增效的作用效果^[7]。本课题组已就百部新碱-罗汉果皂苷V的药物组合申请发明专利1项(公开号:CN106038577A)。在本研究中笔者拟从现代药理学角度研究该药物组合的镇咳、祛痰作用,并筛选其最优组合,为该药物组合的临床应用提供实验参考。

1 材料

1.1 仪器

UV1100 紫外-可见分光光度计(上海天美科技仪器有限公司);402A1 超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);BP61 电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 药品与试剂

百部新碱(由本课题组自制,批号:20160616,纯度:99.6%);罗汉果皂苷V(上海谱振生物科技有限公司,批号:20160319,纯度:99.8%);磷酸可待因片(以下简称可待因,青海制药厂有限公司,批号:20160906,规格:15 mg/片);盐酸氨溴索片(以下简称氨溴索,天津怀仁制药有限公司,批号:20160121,规格:30 mg/片);氨水(25%,天津市大茂化学试剂厂);酚红(天津市福晨化学试剂厂);其余试剂均为分析纯或者化学纯。

1.3 动物

SPF级KM小鼠140只,♀♂各半,体质量为15~25 g,购自中山大学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2011-0029]。根据我国《实验动物管理条例》,小鼠在恒温房间内饲养,并提供实验室标准动物饲料,饲养期间自由饮水进食。

2 方法

2.1 分组及给药

各实验均设7组,分别为溶剂组、可待因或氨溴索组(阳性对照)、百部新碱组、罗汉果皂苷V组和质量比分别为2:1、1:1、1:2的百部新碱-罗汉果皂苷V联用组。溶剂组小鼠ig生理盐水,可待因组小鼠ig可待因30 mg/kg,百部新碱组小鼠ig百部新碱30 mg/kg^[8],罗汉果皂苷V组小鼠ig罗汉果皂苷V 30 mg/kg,质量比分别为2:1、1:1、1:2的百部新碱-罗汉果皂苷V联用组小鼠ig药物总量为30 mg/kg,给药体积均为20 mL/kg。

2.2 小鼠镇咳实验

取健康KM小鼠70只,♀♂各半,先置于24 L的密闭盒子内适应性饲养3~5 d^[9-10]。然后将小鼠按“2.1”项下方法进行分组、给药。给药60 min后,通过超声雾化喷雾器将25%氨水以恒速喷入盒内,诱导咳嗽(小鼠咳嗽表现为腹肌收缩,同时张大嘴,有时有咳声)^[11]。观察并记小鼠10 min内的首次咳嗽时间(咳嗽潜伏期)及咳嗽次数^[12]。

2.3 小鼠祛痰实验

2.3.1 酚红标准曲线的绘制 分别精密量取0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1、1.3、1.5 mL 1%酚红溶液置于100 mL量瓶中,用1 mol/L氢氧化钠-生理盐水(1:10)混合液定容

至刻度。用紫外-可见分光光度计于478 nm波长处测定溶液吸光度,以酚红质量浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)进行线性回归,得酚红回归方程为 $y=0.391 3x+0.023 7$ ($r=0.999 6$),线性范围为0.2~3.1 μg/mL。

2.3.2 气管酚红排泄量的测定 取健康KM小鼠70只,♀♂各半,禁食不禁水9 h,然后按“2.1”项下方法分为7组,每组10只。将各组小鼠适应性饲养1周后,按“2.1”项下方式给药,每天1次,连续7 d。末次给药30 min后,ip 1%酚红溶液(0.2 mL/10 g),30 min后处死小鼠。剪开小鼠颈部皮肤,分离甲状软骨至气管分支处的一段气管,置于4 mL生理盐水中,加入0.2 mL氢氧化钠溶液显色后,用紫外-可见分光光度计测定其在478 nm波长处的吸光度,将测得吸光度值代入“2.3.1”项下标准曲线,计算酚红排泄量^[13-14]。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 镇咳实验测定结果

与溶剂组比较,各给药组小鼠的咳嗽潜伏期均显著延长、咳嗽次数均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与可待因组比较,百部新碱组、各药物组合组小鼠的咳嗽潜伏期、咳嗽次数差异均无统计学意义($P>0.05$),且以百部新碱-罗汉果皂苷V(2:1)组与可待因组作用最为接近;与百部新碱组比较,各药物组合组小鼠的咳嗽潜伏期、咳嗽次数差异均无统计学意义($P>0.05$);与罗汉果皂苷V组比较,各药物组合组小鼠的咳嗽潜伏期均显著延长、咳嗽次数均显著减少($P<0.05$),结果详见表1。

表1 各组小鼠咳嗽潜伏期、咳嗽次数测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 1 Results of cough latent period, cough times of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量,mg/kg	咳嗽潜伏期,s	咳嗽次数
溶剂组		31.79±12.03	28.66±3.77
可待因组	15	86.21±9.00**	5.57±2.78**
百部新碱组	30	78.21±10.47**	8.18±1.92**
罗汉果皂苷V组	30	65.00±8.58 ^a	13.85±1.48 ^a
百部新碱-罗汉果皂苷V(2:1)组	30	83.74±8.21***	5.93±1.56***
百部新碱-罗汉果皂苷V(1:1)组	30	80.71±11.04***	7.29±2.43***
百部新碱-罗汉果皂苷V(1:2)组	30	78.43±9.73***	8.07±2.05***

注:与溶剂组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与可待因组比较,^a $P<0.05$;与罗汉果皂苷V组比较,^a $P<0.05$

Note: vs. solvent group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. codeine group, ^a $P<0.05$; vs. mogroside V group, ^a $P<0.05$

3.2 祛痰实验测定结果

与溶剂组比较,各给药组小鼠的气管酚红排泄量均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与氨溴索组比较,罗汉果皂苷V组、各药物组合组小鼠的气管酚红排泄量差异均无统计学意义($P>0.05$),且百部新碱-罗汉果皂苷V(1:2)作用与氨溴索相当接近,而百部新碱-罗汉果皂苷V(1:1)作用优于氨溴索;与百部新碱组比较,各药物组

合组小鼠的气管酚红分泌量均显著增加($P<0.05$);与罗汉果皂苷V组比较,各药物组合组小鼠的气管酚红分泌量差异均无统计学意义($P>0.05$),结果详见表2。

表2 各组小鼠气管酚红分泌量测定结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 2 Results of the volume of tracheal phenol red excretion in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	酚红分泌量, $\mu\text{g/mL}$
溶剂组		0.421 \pm 0.573
氨溴索组	15	1.763 \pm 0.531**
百部新碱组	30	1.016 \pm 0.414 ^Δ
罗汉果皂苷V组	30	1.318 \pm 0.306**
百部新碱-罗汉果皂苷V(2:1)组	30	1.498 \pm 0.413***
百部新碱-罗汉果皂苷V(1:1)组	30	1.801 \pm 0.209***
百部新碱-罗汉果皂苷V(1:2)组	30	1.757 \pm 0.329***

注:与溶剂组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与氨溴索组比较, $\Delta P<0.05$;与百部新碱组比较, $\Delta P<0.05$

Note: vs. solvent group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. ambroxol group, $\Delta P<0.05$; vs. stemoninine group, $\Delta P<0.05$

4 讨论

药物组合是将几个作用机制明确、作用靶点不同的药物或有效成分按照合理的剂量相互配伍后组合应用,从而达到增效减毒的目的。药物组合研究主要遵循以下几个原则:(1)几种药物或有效成分效用可以互补,组合后的作用效果优于其中任一种药物或成分,达到“1+1>2”的协同效果;(2)组合药物中的几种药物或成分对某种疾病有直接或间接的治疗作用,疗效确切、靶点基本明确,但作用机制可以不同;(3)几种药物或成分组合后毒副作用减小、安全性提高。

可待因作为中枢镇咳药,对咳嗽中枢具有较高选择性,被认为是目前最有效的镇咳药,因此在本研究的镇咳实验中以其为阳性对照。氨溴索作为祛痰药中黏液润滑药的代表药,具有与罗汉果皂苷V相同的作用机制,故在本研究的祛痰实验中以其为阳性对照。本实验中百部新碱、罗汉果皂苷V及两者药物组合的小鼠给药剂量是在前期研究的基础上,通过预实验结果对剂量进行调整后得出;而阳性药物剂量是通过药品说明书的成人用药剂量换算成小鼠的等效剂量,二者具有可比性。

百部新碱-罗汉果皂苷V的药物组合属于本课题组的原创研究,本课题组已就该组合用药申请发明专利1项。百部新碱是通过抑制周围神经发挥镇咳作用,而罗汉果皂苷V是通过刺激呼吸道分泌上皮细胞、裂解黏蛋白的多黏纤维、降低痰液黏滞度而发挥祛痰作用,两种药物组合后达到效用互补,产生“1+1>2”的协同效果。

本研究通过氨水引咳实验观察了百部新碱-罗汉果皂苷V组合用药后的镇咳作用。结果显示,百部新碱-罗汉果皂苷V组合用药后可延长小鼠咳嗽潜伏期、减少咳嗽次数,配伍后表现出不同程度的协同作用,且百部新碱-罗汉果皂苷V(2:1)可达到与可待因相当的镇咳活性。小鼠气管酚红分泌法是较常用的祛痰实验方法,笔者在前期实验中发现样品在478 nm波长处有最大吸收,故本研究以此为检测波长。结果显示,不同配比百部新碱-罗汉果皂苷V组合用药后增加小鼠酚红分泌量

的作用均较两药单用好,且发现百部新碱-罗汉果皂苷V(1:2)组合后的祛痰活性与氨溴索相当,而百部新碱-罗汉果皂苷V(1:1)组合后的祛痰活性已超过氨溴索。本研究结果证实了百部新碱与罗汉果皂苷V联用具有协同增效的作用。

百部新碱与罗汉果皂苷V镇咳的作用靶点和机制均不同,推测两药联用后通过不同镇咳机制相互影响、互相协同,从而达到增强药效的作用。通过本研究结果笔者推测,质量比2:1、1:1可作为百部新碱-罗汉果皂苷V配比优选的参考。但本研究仅通过氨水致咳实验及小鼠气管酚红分泌实验来反映两药联用后的镇咳、祛痰作用,至于两药联用后是通过何种机制发挥的作用,以及两药以何种配比组合才能发挥最佳的协同作用尚不清楚,仍有待进一步研究与考证。

参考文献

- [1] Jiang RW, Shaw PC, Bi PX, et al. Alkaloids and chemical diversity of *Stemona tuberosa*[J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(10):749-754.
- [2] Yi M, Xia X, Jiang RW, et al. Structures and chemotaxonomic significance of semona alkaloids from *stemona japonica*[J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(12):2097-2099.
- [3] Zhang RR, Tian HY, Wu Y, et al. Isolation and chemotaxonomic significance of stenine and stemoninine-type alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2014, 25(9):1252-1255.
- [4] But PHP, Xu YT, Shaw PC, et al. *Method of making antitussive medicine and relieving cough*: US, 7867998B2 [P]. 2011-01-11.
- [5] Xu YT, Shaw PC, Jiang RW, et al. Antitussive and central respiratory depressant effects of *Stemona tuberosa*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3):679-684.
- [6] 刘婷,王旭华,李春,等.罗汉果皂苷V的镇咳、祛痰及解痉作用研究[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(20):1534-1536.
- [7] 陈畅,马兴,满国峰,等.组合药物-现代药物研发的新趋势[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(14):310-312.
- [8] 吴旖,谢敏.百部新碱口腔崩解片的制备[J]. *中国药房*, 2016, 27(16):2268-2271.
- [9] 张金艳,赵乐,郭琰,等.苦杏仁与桔梗止咳、祛痰的配伍比例研究[J]. *中成药*, 2011, 33(10):1677-1680.
- [10] 张金艳,何萍,李贻奎.苦杏仁与桔梗及二者配伍止咳、祛痰作用的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(18):173-175.
- [11] 郑浩锋,许志威,陈佳敏,等.大蒜素在氨水诱导的小鼠实验性咳嗽中的镇咳作用及机制[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2015, 36(6):821-826.
- [12] 马骁,王建,黄聪,等.厚朴炙远志炮制品的安神和祛痰作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1):90-93.
- [13] 谭淑芳,刘春芳,王春生,等.基于均匀设计法评价制川乌与川贝、浙贝反药配伍组合的镇痛和祛痰镇咳作用[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(16):2706-2713.
- [14] 傅勇,王建,江娟,等.远志与厚朴配伍对安神祛痰药效的影响[J]. *成都中医药大学学报*, 2011, 34(4):69-72.

(收稿日期:2016-12-27 修回日期:2017-02-13)

(编辑:林 静)