

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.36.005

三脉紫菀有效组分配比的平喘作用及其毒性研究^{*}

康林之¹,朱建成²,任刚³,罗云³,张婧³,刘荣华²,杨明³,王芳²,何小汝³,赵海平^{2△}
(江西中医药大学:1. 护理学院;2. 药学院;3. 现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

[摘要] 目的 研究三脉紫菀抗慢支组分平喘作用的最佳配比及其毒性。方法 合格豚鼠 72 只,体质量(300±20)g,雄性,分为空白组、氨茶碱组(0.047 g/kg)、三脉紫菀总皂苷与总黄酮不同配比组(8:1,4:1,2:1,1:1,1:2,1:4,1:8,0.38 g/kg)。各组连续灌胃给药 3 d,每天 1 次,采用 His-Ach 雾化引喘法通过诱咳引喘仪优选最佳配比;制备豚鼠离体气管环标本,采用 Powerlab 生物信号采集系统,考察豚鼠平滑肌条在正常克氏液条件下加入氯化乙酰胆碱(Ach)后的收缩变化,以及其他组分别在 Ach 致平滑肌收缩最明显时,加入氨茶碱(1.25 mg/mL)后的平滑肌舒张百分率。采用经典的小鼠急性毒性实验方法,考察三脉紫菀总皂苷、总黄酮及其 1:2 配比的急性毒性。结果 较之空白组,氨茶碱组、其他各给药组的致喘潜伏期延长显著($P<0.05$),其中 1:1,1:2,1:4 组与其他配比组均有显著差异($P<0.05$),但又以 1:2 组引喘潜伏期最长。氨茶碱组与各配比组均能明显松弛 Ach 导致收缩的豚鼠气管平滑肌,其中氨茶碱组舒张百分率最大(24.12±1.20)%,各配比组舒张百分率不及氨茶碱组($P<0.05$),但以 1:2 组与之最接近。三脉紫菀总皂苷、总黄酮及其 1:2 配比对小鼠的最大耐受量分别为 300,345,325 g/kg。结论 在给药总量恒定的情况下,三脉紫菀总皂苷与总黄酮 1:2 平喘解痉作用明显,其总黄酮、总皂苷及 1:2 配比的急性毒性实验未显示明显的毒性作用,安全性相对良好。

[关键词] 三脉紫菀;皂苷类;黄酮类;平喘;急性毒性

[中图分类号] TQ461

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5056-03

Study on the effective compositions of Aster ageratoides Turcz for relieving asthma and its toxicity^{*}

Kang Linzhi¹, Zhu jiancheng², Ren Gang³, Luo Yun³, Zhang Jing³, Liu Ronghua², Yang Ming³,
Wang Fang², He Xiaoru³, Zhao Haiping^{2△}

(1. School of Nursing; 2. College of Pharmacy; 3. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education,
Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi 330004, China)

[Abstract] **Objective** To study the effective composition of Aster ageratoides Turcz for relieving asthma and its toxicity.

Methods Seventy-two qualified male guinea pigs, body mass(300±20)g, were randomly divided into the control group, aminophylline group(0.047 g/kg) and different ratio group of total saponins and total flavonoids(8:1,4:1,2:1,1:1,1:2,1:4,1:8). Every group received at dose of 0.38 g/kg once a day for 3 days by intragastric administration. The effect of relieving asthma was taken as the indicators for the optimization of compositions, which was detected by observing the latent period of asthma induced by acetylcholine-histamine in guinea rats. The relaxation percentage of smooth muscle retracted by acetylcholine was detected by Powerlab biological signal collecting system when aminophylline(1.25 mg/mL) and different matching drugs(0.02 g/mL) were added in Krebs' solution. The acute toxicities of total saponins, total flavonoids and mixture of total saponins with total flavonoids(ratio of 1:2) were detected by classical acute toxicity test of mice. **Results** Compared with the control group, aminophylline group, each group latent period of inducing asthma significantly or very significantly prolonged ($P<0.05$), among them, 1:1, 1:2, 1:4 group and other matching group were significantly different($P<0.05$), but 1:2 group cited the longest incubation period. Aminophylline group and the ratio could significantly relaxe guinea pig tracheal smooth muscle retracted by acetylcholine. Aminophylline group diastolic percentage was the largest(24.12±1.20)% , all the groups were less than the percentage of diastolic aminophylline group ($P<0.05$), but in 1:2 group with the closest. Aster ageratoides Turcz, tatarian aster total saponins, total flavonoids and the ratio of 1:2 to mice maximum tolerance was respectively 300, 345, 325 g/kg. **Conclusion** For the same total dosage, the relieving asthma effects of proportions of 1:2 Aster ageratoides Turcz were obvious. There are no abnormal changes in the acute toxicity tria with total flavonoids, total saponins, as well as the ratio of 1:2, safety is relatively good.

[Key words] Aster ageratoides Turcz;saponins;flavone;antiasthma;acute toxicity

一味中药就是由其自身有效组分构成的“小复方”,其临床效应是“复方”体系对病变黑箱(患者)产生的总体效应,而组分构成比例变化是药物总体效应强弱的关键。三脉紫菀(Aster ageratoides Turcz.)为菊科(Compositae)紫菀属植物的干燥全草或根。曾在 1971 年被定为全国 18 种防治慢性气管炎有效

药物之一^[1-6]。据报道其地上部分主含黄酮苷,根部主含皂苷,此外还含有萜类、甾类等成分。其中黄酮类成分、皂苷类成分是其抗慢支的主要药效物质基础^[7-8]。本课题组前期从祛痰止咳角度开展了其有效组分的最佳配比研究^[9],基于此,本研究拟进一步采用豚鼠探讨三脉紫菀有效组分平喘的最佳配比,并

* 基金项目:十一五重大新药创制资助项目(2009ZX09310-005);江西省科技厅资助项目(2011BBG70005-4);江西中医药大学校基金资助项目(Y027)。作者简介:康林之(1979—),讲师,硕士,主要从事中西医结合的临床研究。△ 通讯作者,E-mail:cdzhp3690098@163.com。

初步考察其相应的安全性,以期为其抗慢支机制及创制新药提供有力支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 实验用三脉紫菀采集于南昌市近郊,经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心鉴定为三脉紫菀。

1.1.2 试剂 氨茶碱片(太原市振兴制药有限责任公司,批号 20111206);氯化乙酰胆碱(Ach)与磷酸组胺(His,上海楷洋生物技术有限公司,批号 2012116 与 2012116)。改良 Krebs 液^[10]:NaCl 7.5 g, CaCl₂ 0.24 g, MgCl₂ 0.05 g, KCl 0.35 g, NaHCO₃ 1.15 g, NaH₂PO₄ 0.1 g, 葡萄糖 1.0 g 配于 1 000 mL 蒸馏水。实验前用 5% O₂ 和 CO₂ 混合气体饱和。其他试剂均为化学纯。

1.1.3 仪器 YLS-8A 多功能诱咳引喘仪(济南益延科技发展有限公司);AUTOMATIC ORGAN BATH(Panlab);Powerlab 生物系号采集系统(ML141 sptrometer, ML132 Bto Amp)。

1.1.4 动物 KM 种小鼠[清洁级,江西中医药大学动物中心,SCXK(赣),2011-0001];豚鼠[普通级,上海生旺实验动物养殖有限公司,SCXK(沪),2012-0007]。

1.2 方法

1.2.1 药品制备 参照前期三脉紫菀制备工艺^[7,11-12]。总皂苷部位制备:取根部 500 g,经 70%、95% 乙醇浸提,大孔吸附树脂处理滤液,浓缩干燥,得浸膏 3.99%。总黄酮部位制备:取茎叶 500 g,经 70%、95% 乙醇浸提,大孔吸附树脂处理滤液,浓缩干燥,得浸膏 1.477%。保存备用。

1.2.2 剂量设定 参照前期剂量设计方法^[13-14],确定总皂苷、总黄酮部位的总量,参照药典及其他文献等资料设定两类成分的配比。其中,按一定梯度一类成分递减的同时,另一类成分递增,反之亦然。配比如下(质量比):总皂苷与总黄酮以 8:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:8。

1.2.3 平喘实验研究

1.2.3.1 豚鼠筛选实验 72 只雄性豚鼠体,质量(300±20)g,接通多功能诱咳引喘仪后,分别对每只豚鼠进行筛选,将配制好的引喘液(2.0×10^{-2} g/mL Ach 和 1.0×10^{-3} g/mL His 等体积混合液)喷入仪器 7 s,每只豚鼠的引喘潜伏期一般小于 150 s,如大于 150 s 者,不予选用组内。豚鼠因吸入引喘液出现痉挛抽搐,立刻打开仪器取出,必要时人工辅助呼吸,避免窒息死亡^[15]。

1.2.3.2 对豚鼠的平喘实验 将筛选出的 72 只豚鼠分为 9 组,每组 8 只。灌胃给药,每只 0.2 mL/10 g,每天 1 次,共 3 d。氨茶碱组豚鼠灌胃氨茶碱 0.047 g/kg,空白组豚鼠灌胃等量的生理盐水,各给药组按设定剂量给药。第 3 次给药 1 h 后,将豚鼠放入仪器内,喷 7 s 引喘液,观察记录其出现哮喘性痉挛抽搐的潜伏期(即引喘潜伏期)。如 2 min 内未出现喘息,视其潜伏期为 120 s^[15]。

1.2.4 对豚鼠离体气管平滑肌的舒张实验 用木棒击豚鼠后脑致昏后,在颈部腹面正中切开皮肤及皮下组织,分离气管,剪下甲状软骨下至气管分叉处的部分,长约 20 mm,制备平滑肌环,固定于离体气管仪器内,基值调整 3 g,置换 Kerb 液 1 次/20 min,稳定约 1 h,曲线稳定后,对 9 个组别分别开始实验。对 Ach 组,于气管条平衡稳定后,加入 5×10^{-4} g/mL Ach 0.4 mL,并记录数据。其他 8 组分别于 Ach 致收缩曲线上升至最明显时,加入氨茶碱(1.25×10^{-3} g/mL)及各组的配比药液

(0.02 g/mL)0.4 mL。观察并记录实验数据,计算舒张百分率。舒张百分率=(给药前曲线最大值-给药后曲线最小值)/给药前曲线最大值×100%^[10,15]。

1.2.5 急性毒性实验研究

1.2.5.1 预实验 健康 KM 小鼠 36 只,体质量(20±2)g,雌雄各半,分成 9 组,每组 4 只。即总皂苷高、中、低组,总黄酮高、中、低组,总皂苷与总黄酮 1:2 配比高、中、低组,实验前 12 h 禁食不禁水。将总皂苷、总黄酮及其 1:2 配比分别配制成最大浓度(0.75、0.86、0.81 g/mL),且等比(1:0.85)稀释,得到其他剂量。各组按最大体积 0.4 mL/10 g 容量,一次性灌胃,连续观察 7 d,记录期间小鼠死亡数和一般情况^[16-17]。结果表明,各组小鼠精神与活动状态良好,无死亡。提示各组药物的急性毒性较小,无法测得其半数致死量(LD₅₀),故改为测定各组药物的小鼠最大耐受量(Maximum tolerated dose, MTD)。

1.2.5.2 MTD 实验 健康 KM 小鼠 80 只,雌雄各半,体质量(20±2)g,分为 4 组,每组 20 只,即:空白组、总皂苷组(0.75 g/mL)、总黄酮(0.86 g/mL)、总皂苷与总黄酮 1:2 配比组(0.81 g/mL),实验前 12 h 禁食不禁水。各组给药 1 次,0.4 mL/10 g,空白组给予等体积蒸馏水。给药后连续观察 14 d^[10,16-17],期间详细观察记录实验动物每天的反应及体质量变化、摄食量变化、中毒反应及死亡情况等。观察期结束后,处死小鼠进行尸体解剖检查。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 豚鼠的平喘实验 与空白组比较,氨茶碱组与其他各给药组的引喘潜伏期延长显著($P < 0.05$);其中 1:1、1:2、1:4 组与其他配比组均有显著差异($P < 0.05$),但又以 1:2 组引喘潜伏期最长。见表 1。

表 1 各组对豚鼠的平喘作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量(g/kg)	引喘潜伏期(s)
空白组	—	63.38±3.93
氨茶碱组	0.047	125.38±18.91 [#]
总皂苷与总黄酮 8:1	0.380	81.13±9.67 [*]
总皂苷与总黄酮 4:1	0.380	86.50±9.30 [*]
总皂苷与总黄酮 2:1	0.380	93.50±9.93 [#]
总皂苷与总黄酮 1:1	0.380	96.88±15.43 ^{#△}
总皂苷与总黄酮 1:2	0.380	109.25±16.2 ^{#△}
总皂苷与总黄酮 1:4	0.380	100.38±16.8 ^{#△}
总皂苷与总黄酮 1:8	0.380	86.00±14.76 [*]

*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$, 与空白组比较; △: $P < 0.05$, 与其他各给药组比较; —: 此项无数据。

2.2 豚鼠离体气管平滑肌舒张作用的实验 氨茶碱组与各配比组均能明显松弛 Ach 导致收缩的平滑肌。其中,氨茶碱组舒张百分率最大,各配比组舒张百分率不及氨茶碱组($P < 0.05$),但尤以 1:2 组作用明显。见表 2。

2.3 急性毒性实验 本实验结果显示,总皂苷、总黄酮及其 1:2 配比对小鼠单次灌胃给药的 MTD 分别为 300、345、325 g/kg。观察期间,各给药组灌胃后 2 h 内个别动物出现自主活动减少、反应迟钝,其余未见异常现象;给药后第 2 天起,所有动物饮食正常,精神状态良好,皮毛光泽、活动灵活积极,体质正常增长;继续观察 14 d 后无动物死亡。处死并解剖各组

小鼠,未见心、肝、脾、肺、肾等主要脏器出现异常。

表 2 各组对豚鼠离体气管平滑肌的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量(mg/mL)	舒张百分率(%)
Ach 组	0.50	0
氨茶碱组	1.25	24.12±1.20
总皂苷与总黄酮 8:1	20.00	14.04±0.56 [#]
总皂苷与总黄酮 4:1	20.00	16.17±3.36 [#]
总皂苷与总黄酮 2:1	20.00	18.37±2.30 [*]
总皂苷与总黄酮 1:1	20.00	19.82±2.48 [*]
总皂苷与总黄酮 1:2	20.00	20.74±2.59 [*]
总皂苷与总黄酮 1:4	20.00	19.36±2.42 [*]
总皂苷与总黄酮 1:8	20.00	15.92±1.99 [#]

*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$, 与氨茶碱组比较。

3 讨 论

中药有效组分配伍是目前中药配伍的新兴模式之一,而厘清各有效组分配伍间的协同、拮抗等机制,则是优选科学配比的关键一环^[1-6]。毒性研究是反映药物对机体安全性的初始资料^[17],在其综合的安全性评价体系中具有极其重要的地位和作用。

本研究数据显示,在确定三脉紫菀总皂苷、总黄酮部位总量的情况下,各配比组可使豚鼠的引喘潜伏期延长显著($P < 0.05$),且平喘作用随总黄酮比例增加而增强,1:1、1:2、1:4 组与其他配比组差异显著($P < 0.05$),但又以 1:2 组引喘潜伏期最长。表明各配比组的平喘作用与总皂苷和总黄酮的配比密切相关,且存有协同增效的可能。豚鼠气管平滑肌分布的受体主要有 H1、M 和 β_2 等,其中兴奋 H1、M 受体可发生收缩,兴奋 β_2 受体可发生舒张。Ach 致气管平滑肌收缩模型,是由 Ach 作用于 M 受体,使钙通道(ROC)和 VDC 开启,发生钙内流,并水解细胞膜上磷酸肌醇,生成二酯基甘油(DAG)与肌醇三磷酸(IP3),使内钙释放,气管平滑肌收缩^[18-19]。研究结果显示氨茶碱组与各配比组均能明显松弛 Ach 导致收缩的平滑肌,氨茶碱组舒张百分率最大(24.12±1.20)%,其中虽各配比组不及氨茶碱组($P < 0.05$),但尤以 1:2 组舒张作用明显,而抑制 Ca^{2+} 内流可能是其主要机制。三脉紫菀总皂苷、总黄酮及其 1:2 配比的急性毒性实验结果显示,各组药物对小鼠单次灌胃给药的 MTD 分别为 300、345、325 g/kg(分别相当于成人用量 25、28.75、27.08 g/kg),各组动物活动饮食正常,观察结束后无死亡,主要脏器肉眼观亦未见异常。提示各组药物对小鼠几乎无急性毒性损害。

目前,国内外均有文献报道^[20-21],黄酮及皂苷类物质具有多种生物活性及药理作用。三脉紫菀作为抗慢支的有效药物之一,加强其有效组分配比的优化研究,可为今后的开发利用提供数据支撑。然而,也有报道称^[22-23],诸如沙青子总黄酮、盾叶薯蓣皂苷及七叶皂苷等组分对实验动物有毒性作用。可见,对于不同来源的黄酮或皂苷类物质,其安全性不能一概而论。所以,今后也有待于结合组分间相互作用、体内转化代谢及长毒观察等方面深入探讨。

参考文献

- [1] 张会宗,孟莉,刘晶,等. 中药细辛自身活性组分配比优化研究[J]. 世界中西医结合杂志,2011,6(11):944-946,967.
- [2] 肖红斌,刘艳秋,王莉,等. 基于成分相互作用的中药复方

- 组分配伍研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2011,13(2):240-243.
- [3] 高会丽,于成瑶,李连达. 中药复方配伍规律研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(9):60-63.
- [4] 张伯礼,王永炎,商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方法[J]. 继续医学教育,2006,20(19):89-91.
- [5] 陈建萍,吴伟康,张敏生,等. 中药复方配伍规律研究的思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2000,6(1):1-4.
- [6] 苗明三,马霄,王灿. 中药有效组分配伍研究的探讨[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5):487-490.
- [7] 何小汝. 三脉紫菀总黄酮、总皂苷制备工艺及其化痰止咳功效研究[D]. 南昌:江西农业大学,2012.
- [8] 刘可越,赵昱波. 紫菀属植物化学成分与生物活性研究进展[J]. 现代药物与临床,2009,24(5):276-278.
- [9] 赵海平,康林之,任刚,等. 基于红管药祛痰止咳有效组分的最佳配比研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):163-166.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:323.
- [11] 刘爱红,袁金斌,刘荣华,等. 三脉紫菀总皂苷的提取工艺研究[J]. 江西中医药,2013(12):55-57.
- [12] 周志望,黄慧莲,邵峰,等. 三脉紫菀总黄酮的提取纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):7-10.
- [13] 靳康,阚红卫,石静丽,等. 双丹组分对大鼠离体血管和急性心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):197-201.
- [14] 杨金果,李珩,李运伦. 中药有效组分配伍的研究进展[J]. 上海中医药杂志,2012,46(3):89-92.
- [15] 李文宏,徐国良,王跃生,等. 麻杏石甘汤平喘量-效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):171-174.
- [16] 李津,覃永长,李桂勇,等. 蒙古茎、叶提取物的急性毒性[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):178-181.
- [17] 周立国. 药物毒理学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:146-162.
- [18] 周钦海,朱美华,朱敏敏,等. 不同浓度的咪唑安定对兔离体气管平滑肌收缩的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2007,23(8):670-672.
- [19] 屈会化,赵琰,张晗睿,等. 加味三拗汤对离体豚鼠气管平滑肌的解痉作用[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(4):251-253.
- [20] 田永利,许志宇,葛林,等. 总黄酮类化合物含量测定方法和药理作用研究进展[J]. 河北医药,2010,32(15):2094-2096.
- [21] 马生堂,寇俊萍,余伯阳. 植物中皂苷类成分的毒性研究近况[J]. 药学进展,2012,36(3):110-115.
- [22] 陈慧,宁明刚,刘宇,等. 沙参总皂苷对小鼠急性毒性作用研究[J]. 甘肃农业大学学报,2013,48(3):14-18.
- [23] Qin Y, Wu X, Huang W, et al. Acute toxicity and subchronic toxicity of steroidal saponins from Dioscorea zingiberensis C. H. Wright in rodents[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(3):543-550.