

·方药研究·

本文引用:刘莎,彭晓珊,丁煌,石国民,唐映红.益肺通络颗粒体外抗结核及止咳止血作用研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(4):349-352.

## 益肺通络颗粒体外抗结核及止咳止血作用研究

刘莎<sup>1</sup>,彭晓珊<sup>1</sup>,丁煌<sup>1</sup>,石国民<sup>2</sup>,唐映红<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.长沙市中心医院,湖南长沙410018)

**[摘要]** 目的 研究益肺通络颗粒体外抗结核、止血、止咳作用及对非特异免疫功能的影响,为其临床应用提供实验依据。**方法** 用人型结核分枝杆菌标准菌株(H37Rv)和临床分离的结核分枝杆菌敏感菌株和耐药菌株,接种于含有不同浓度益肺通络颗粒的培养基中,观察结核杆菌的生长情况;应用剪尾法、毛细管法测定小鼠的出血时间、凝血时间,观察益肺通络颗粒的止血作用;用氨水引咳,观察其止咳作用;通过巨噬细胞碳粒廓清试验,观察其对非特异性免疫功能(廓清指数和校正廓清指数)的影响。**结果** 益肺通络颗粒在高浓度(0.01~0.2 g/mL)时对结核分枝杆菌有显著的抑菌作用,但随着浓度降低,其抑菌效果也显著减弱,浓度减低至0.025 g/mL以下时抑菌作用不明显;与对照组小鼠出血时间(321.2±34.3) s、凝血时间(135.8±5.1) s比较,益肺通络高剂量组小鼠出血时间(169.5±23.0) s、凝血时间(97.5±3.3) s均显著缩短( $P<0.01$ );与对照组小鼠氨水引咳的潜伏期(36.4±1.9) s、5 min内小鼠的咳嗽次数(45.9±3.1)次比较,益肺通络高剂量组小鼠氨水引咳的潜伏期(54.1±1.4) s显著延长,5 min内小鼠的咳嗽次数(22.7±2.2)次显著减少( $P<0.01$ );且小鼠廓清指数和校正廓清指数较对照组均有显著提高( $P<0.01$ )。**结论** 益肺通络颗粒具有体外抗结核作用,具有止血止咳和增强非特异性免疫功能的作用。

**[关键词]** 益肺通络颗粒;抗结核;止咳;止血;碳粒廓清指数;结核分枝杆菌

**[中图分类号]** R285.5;R521

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.04.001

### Effects of Yifei Tongluo Granules on Anti-tuberculosis and Relieving Cough and Hemostatic in Vitro

LIU Sha<sup>1</sup>, PENG Xiaoshan<sup>1</sup>, DING Huang<sup>1</sup>, SHI Guomin<sup>2</sup>, TANG Yinghong<sup>1\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Central Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 430100, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of Yifei Tongluo granules on anti tuberculosis and the effect on relieving cough, hemostatic and non-specific immunological function. **Methods** Human *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and clinical isolated *Mycobacterium tuberculosis* sensitive strain and drug-resistant strains were inoculated in culture medium with different concentrations of Yifei Tongluo granules, separately. Growing states of *Mycobacterium tuberculosis* were observed. The bleeding time was measured by tail breaking test in mice and the coagulation time was measured by capillary method in mice to observe the hemostasis effect of Yifei Tongluo granules. The antitussive effect was observed by ammonia water induced cough method. The effect on the non-specific immunological function (clearance index and corrected clearance index) was observed by macrophage carbon particle clearance test. **Results** *Mycobacterium tuberculosis* were significantly inhibited by Yifei Tongluo granules with high concentration (0.01~0.2 g/mL), and the antibacterial effect was significantly reduced by decreasing concentration of Yifei Tongluo granules. The antibacterial effect is not obvious when the concentration of Yifei Tongluo granules decreased to 0.025 g/mL. Compared with the bleeding time (321.2±34.3) s and the clotting time (135.8±5.1) s in the control group mice, the bleeding time (169.5±23) s and the coagulation time (97.5±3.3) s in high concentration of Yifei Tongluo group mice were significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the incubation period (36.4±1.9) s of ammonia induced cough and cough frequency (45.9±3.1) in 5 min in the control group mice, the incubation period (54.1±1.4) s of ammonia induced cough was significantly prolonged and the cough frequency (22.7±2.2) in 5min significantly decreased ( $P<0.01$ ) in the Yifei Tongluo with high dose group mice. Compared with the control group, the clearance index and the corrected clearance index were significantly improved in Yifei Tongluo group mice ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Yifei Tongluo granules have the effects on anti-tuberculosis, relieving cough and hemostasis and enhancing non-specific immunological function in vitro.

**[Keywords]** Yifei Tongluo granules; anti-tuberculosis effect; relieving cough; hemostatic; carbon particles clearance index; *Mycobacterium tuberculosis*

**[收稿日期]** 2016-08-09

**[基金项目]** 国家“十二五”科技重大专项子课题3(2013ZX10005004-003)。

**[作者简介]** 刘莎,女,在读硕士研究生,研究方向:药理学研究。

**[通讯作者]** \*唐映红,女,博士,教授,E-mail:tyhong62@qq.com。

益肺通络颗粒由黄精、白及、太子参、百部、矮地茶、紫花地丁、大蓟等 11 味中药组成,具有益气养阴、化痰通络、去腐生新的功效,主治气阴两虚夹瘀型耐多药肺结核<sup>[1]</sup>。本文对益肺通络颗粒进行了体外抗结核、出血、凝血、止咳及增强免疫等方面的研究,以期为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

益肺通络颗粒(湖南中医药大学药剂室提供,批号 20131110,每克浸膏干粉含 4.3 g 生药);云南白药(云南白药集团股份有限公司,批号:ZEA1406);盐酸喷托维宁片(25 mg/片,吉林省东方制药有限公司,批号:20130903);十全大补丸(九芝堂股份有限公司,批号:201306024,每 8 丸相当于原生药 3 g);阿米卡星(西格玛公司,批号:WXBB6431V);氨水(湖南汇虹试剂有限公司,批号:2014061607);印度墨汁(Salarbio 公司,Cat.NO.18060);碳酸氢钠(天津市大茂化学试剂厂,批号:2014050306);硫酸镁、谷氨酸钠、柠檬酸镁等试剂均为国产分析纯。

### 1.2 动物

昆明种小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,SPF 级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2013-0004。

### 1.3 菌株来源

结核分枝杆菌标准株 H37Rv 由国家 CDC 结核病控制中心提供;结核分枝菌临床分离株(结核分枝杆菌耐药株 22 株、敏感菌 17 株)由长沙市中心医院检验科提供。

### 1.4 仪器

756 型紫外分光光度仪,上海光谱有限公司;HH·B11·600-S 型电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;ZHN-6 型蒸汽恒温凝固器,中国原子能科学研究所;DEN-1 型电子浊度计,英国 GRANT 公司;SI-234 电子天平,丹佛仪器(北京)有限公司;EPPENDORF-GERMANY 移液枪。

## 2 方法

### 2.1 体外对结核分枝杆菌的生长抑制作用

参考文献方法<sup>[2]</sup>,用罗氏基础培养基直接稀释含药基础培养基药液,配制成 1:1、1:2、1:4、1:8 四个不同稀释度的培养基(培养基中相应的含药量:益肺

通络四个浓度生药量含量分别是 0.2 g/mL、0.1 g/mL、0.05 g/mL、0.025 g/mL),分装每试管 7 mL,摆斜面灭菌后备用。临床分离结核分枝杆菌的新鲜培养物(初生长 2 周)无需二次传代即可做药敏试验,与标准麦氏比浊管比浊,即配成 1 mg/mL 的菌悬液。将 1 mg/mL 的菌悬液 10 倍稀释至 10~2 mg/mL,以灭菌吸管准确吸取菌液 0.1 mL 分别接种于含药培养基和对照培养基斜面上,每管接种菌量为 10~3 mg。置于 37 °C 培养。分别在接种后的第 3 天、第 1、2、3、4 周周末观察各培养基上结核分枝杆菌生长情况,同时记录观察结果,至第四周止。根据培养基上细菌生长情况进行判断,罗氏对照培养基中的结核分枝杆菌生长情况良好,如果培养基上无菌生长或菌落数少于 20 个,结果报告为对药物敏感,如果培养基上有细菌生长且菌落数大于 20 个,结果报告为对药物耐药(本次实验中对于含药培养基上有菌生长,但明显少于对照培养基生长菌落数的,判断为有一定抑菌作用,表述为中度敏感)。对 39 株结核分枝杆菌临床分离株和 2 株 H37Rv 标准株的药敏试验进行观察记录。

### 2.2 对出血时间的影响

参考文献方法<sup>[3]</sup>,选取健康小鼠 60 只,雌雄各半。适应环境后,按体质量随机分为 5 组,每组 12 只:(1)正常对照组;(2)益肺通络高剂量组(25.8 g/kg);(3)益肺通络中剂量组(12.9 g/kg);(4)益肺通络低剂量组(6.4 g/kg);(5)云南白药组(0.26 g/kg),每日灌胃给药 1 次,连续 7 d,灌胃容量均为 20 mL/kg,对照组给予等体积的蒸馏水。末次给药 30 min 后,分别以利剪将小鼠尾尖 0.5 cm 处横断,血液自行流出后计时,每隔 15 s 用滤纸吸去血滴 1 次,直至血液停止,计算从血液自行流出至血液自行停止的时间即为出血时间,比较组间差异。

### 2.3 对凝血时间的影响

参考文献方法<sup>[4]</sup>,选取健康小鼠 60 只,雌雄各半。适应环境后,按体质量随机分为 5 组,每组 12 只,前四组同“2.2”,第五组:云南白药组(0.26 g/kg),每日灌胃给药 1 次,连续 7 d,灌胃容量均为 20 mL/kg,对照组给予等体积的蒸馏水。末次给药 30 min 后,用内径为 1 mm 毛细玻璃管经眼眶插入内眦球后静脉丛取血至毛细管内血柱达 5 cm,每隔 15 s 折断毛细管 0.5 cm,并缓慢左右拉开,观察折断处有无血凝丝。计算从毛细玻璃管采血至出现血

凝丝的时间即为凝血时间。

#### 2.4 对小鼠氨水引咳试验的影响

参考文献方法<sup>[5]424</sup>,选取健康小鼠60只,雌雄各半。适应环境后,按体重随机分为5组,每组12只,前四组同“2.2”,第五组:喷托维宁片组(0.013 g/kg),每日灌胃给药1次,连续7 d,灌胃容量均为20 mL/kg,对照组给予等体积的蒸馏水。末次给药30 min后,将动物置于1 000 mL烧杯中,上面加盖筛网,向棉球中注入0.4 mL氨水(25%),迅速将烧杯倒置,刺激小鼠引发咳嗽,以小鼠腹肌强烈收缩,同时张嘴呼气为准。观察并记录各组小鼠咳嗽潜伏期(从倒置烧杯至发生咳嗽的时间),以及小鼠5 min内咳嗽次数。

#### 2.5 对非特异性免疫功能的影响

参考文献方法<sup>[5]155</sup>,选取健康小鼠60只,雌雄各半。适应环境后,按体重随机分为5组,每组12只,前四组同“2.2”,第五组:十全大补丸组(1.5 g/kg),每日灌胃给药1次,连续7 d,灌胃容量均为20 mL/kg,对照组给予等体积的蒸馏水。末次给药30 min后,称取体质量,尾静脉注射印度墨汁0.1 mL/10 g,注射后2 min( $t_{2\text{ min}}$ )、20 min( $t_{20\text{ min}}$ )分别从眼眶后静脉丛采血20  $\mu\text{L}$ ,溶于2 mL 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中摇匀,在波长610 nm下比色,测定光密度(以下分别用 $\text{OD}_{2\text{ min}}$ 和 $\text{OD}_{20\text{ min}}$ 来表示2 min和20 min所取血样的光密度)。取血完毕,用颈椎脱臼法处死小鼠,取其肝脏、脾脏,称质量。按公式对廓清指数(K)及校正廓清指数( $\alpha$ )进行统计学计算。

#### 2.6 统计学方法

所有数据采用SPSS 17.0统计软件处理,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 益肺通络颗粒体外抗结核分枝杆菌作用

结果表明,益肺通络颗粒在高浓度(0.1~0.2 g/mL以上)时对结核分枝杆菌都有显著的抑菌作用,但随着浓度降低,其抑菌效果也显著减弱,浓度减低至0.025 g/mL以下时抑菌作用不明显。见表1。

#### 3.2 益肺通络颗粒对小鼠出血、凝血时间的影响

结果表明,益肺通络颗粒组小鼠的出血、凝血时间均显著低于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见表2。

表1 益肺通络颗粒体外对结核分枝杆菌的生长抑制作用(株,%)

药物品种	敏感	中敏	耐药
益肺通络 0.2 g/mL	41(100)	0(0)	0(0)
益肺通络 0.1 g/mL	23(56.1)	15(36.6)	2(4.9)
益肺通络 0.05 g/mL	6(14.6)	13(31.7)	22(53.7)
益肺通络 0.025 g/mL	1(2.44)	10(24.4)	30(73.2)
阿米卡星 100 $\mu\text{g/mL}$	40(97.6)	0(0)	1(2.4)
阿米卡星 50 $\mu\text{g/mL}$	40(97.6)	0(0)	1(2.4)
阿米卡星 25 $\mu\text{g/mL}$	40(97.6)	0(0)	1(2.4)
阿米卡星 12.5 $\mu\text{g/mL}$	40(97.6)	0(0)	1(2.4)

表2 益肺通络颗粒对小鼠出血、凝血时间的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	剂量(g/kg)	出血时间(s)	凝血时间(s)
对照组	-	321.2 $\pm$ 34.3	135.8 $\pm$ 5.1
益肺通络高剂量组	25.8	169.5 $\pm$ 23.0**	97.5 $\pm$ 3.3**
益肺通络中剂量组	12.9	201.8 $\pm$ 32.4*	104.5 $\pm$ 4.7**
益肺通络低剂量组	6.4	220.3 $\pm$ 25.4*	114.6 $\pm$ 4.0**
云南白药组	0.26	158.4 $\pm$ 12.3**	92.9 $\pm$ 3.5**

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

#### 3.3 益肺通络颗粒对小鼠氨水引咳试验的影响

结果表明,益肺通络颗粒组小鼠氨水引咳的潜伏期显著高于对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),益肺通络颗粒组5 min内咳嗽次数显著低于对照组( $P<0.01$ )。见表3。

表3 益肺通络颗粒对小鼠氨水引咳的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	剂量(g/kg)	引咳潜伏期(s)	5 min咳嗽(次)
对照组	-	36.4 $\pm$ 1.9	45.9 $\pm$ 3.1
益肺通络高剂量组	25.8	54.1 $\pm$ 1.4**	22.7 $\pm$ 2.2**
益肺通络中剂量组	12.9	48.9 $\pm$ 4.9*	31.1 $\pm$ 2.4**
益肺通络低剂量组	6.4	46.8 $\pm$ 3.8*	40.0 $\pm$ 3.7
喷托维宁片	0.013	66.3 $\pm$ 1.5**	21.4 $\pm$ 1.5**

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

#### 3.4 对小鼠非特异性免疫功能的影响

结果表明,与对照组小鼠廓清指数和校正廓清指数比较,中、高剂量益肺通络颗粒组均显著高于对照组( $P<0.01$ ),低剂量益肺通络颗粒组廓清指数高于对照组( $P<0.05$ )。见表4。

表4 益肺通络颗粒对小鼠非特异性免疫功能的影响

组别	剂量(g/kg)	廓清指数( $k\times 10^{-2}$ )	校正廓清指数( $\alpha$ )
对照组	-	1.8 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 0.5
益肺通络高剂量组	25.8	3.0 $\pm$ 0.1**	6.2 $\pm$ 0.5**
益肺通络中剂量组	12.9	2.6 $\pm$ 0.2**	5.8 $\pm$ 0.9**
益肺通络低剂量组	6.4	2.1 $\pm$ 0.1*	5.2 $\pm$ 1.0
十全大补丸	1.5	2.7 $\pm$ 0.09**	6.3 $\pm$ 0.7**

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

## 4 讨论

肺结核,古称“肺癆”,又称“癆瘵”、“尸注”、“鬼注”等,肺癆发病原因主要是人体气血精津内虚,癆虫乘虚袭人,感受为病。由于癆虫从口鼻吸入,直接侵蚀肺脏,可出现干咳、咯血等肺系症状。本病的发病部位主要在肺。由于脏腑之间关系密切,肺病日久可以进一步影响到其他脏器,故有“其邪辗转,乘于五脏”之说。其中与脾肾两脏的关系最为密切。补虚培元、抗癆杀虫为治疗肺癆的基本原则<sup>[6]</sup>。补虚,复其真元,杀虫,绝其病根。根据体质强弱分别主次,但尤需重视补虚培元,增强正气,以提高抗病能力<sup>[7]</sup>。益肺通络方含有黄精、白及、太子参、百部、矮地茶、紫花地丁、大蓟、天冬、款冬花、鳖甲、丝瓜络等11味中药。黄精补气养阴,健脾,润肺,益肾;白及收敛止血,消肿生肌;太子参益气健脾,生津润肺。现代药理研究表明黄精和白及对结核杆菌有抑菌作用<sup>[8-9]</sup>,且黄精有增强免疫功能、抗衰老、抗疲劳、耐缺氧作用,尤擅长于治疗肺结核,研究证实其对结核杆菌有明显抑制作用<sup>[8]</sup>。以上三药为方中主药,可彰显益肺、杀虫、生新之功。方中百部润肺止咳、杀虫,现代研究表明百部含多种生物碱,其中百部碱有较强的抗结核作用,百部浸出液1:80浓度10 min可以将结核杆菌杀死<sup>[10]</sup>;矮地茶、紫花地丁清热润燥、化痰消肿;大蓟凉血止血,祛瘀消肿;天冬养阴润燥化痰;款冬花润肺化痰止咳;鳖甲滋阴潜阳,退热除蒸,软坚散结;丝瓜络之功效有如《本草纲目》所言:“能通人脉络脏腑,而去风解毒,消肿化痰,祛痛杀虫,治诸血病可消肿化痰,去痛杀虫,治诸血病”。上述诸药合用,共奏益气养阴、化痰通络、去腐杀虫之功。

临床研究发现采用益肺通络方联合化疗方案治疗耐多药肺结核可以促进痰菌阴转及肺部病灶吸收,近期疗效有效且安全,优于单纯化疗治疗<sup>[11-12]</sup>。西药治疗肺结核,多重耐药菌和药物的毒副作用已成为治疗失败的主要原因,中药治疗肺癆具有丰富

的经验,近年来与抗癆西药联用,能提高疗效和减少毒副作用<sup>[13]</sup>,中西医结合对复治性、耐药性肺结核的临床研究显示了中医药显著优势和很好的应用前景。

本实验结果表明,益肺通络颗粒具有体外抗结核作用,能缩短小鼠出血时间、凝血时间,对氨水引起的小鼠咳嗽有显著的抑制作用,并且益肺通络颗粒能增强小鼠的非特异性免疫功能。这可能是其治疗耐药结核病,改善临床症状的药理学基础。

## 参考文献:

- [1] 丁 煌,彭晓珊,唐映红.益肺通络方对血瘀证模型大鼠血液流变学的影响[J].浙江中西医结合杂志,2014,24(9):781-782.
- [2] 中国防癆协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防癆杂志,1996,18(2):80-85.
- [3] 徐淑云,卞如廉,陈 修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2006:1271.
- [4] 陈 奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:1067-1068.
- [5] 李仪奎,王钦茂.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:424.
- [6] 张 丽,瞿 融.简议中医古代文献对肺癆的认识[J].河北中医,2016,38(1):111-112,119.
- [7] 洪广祥.肺癆辨治与用药经验[J].中医药通报,2008,7(3):6-8.
- [8] 程金生,林晓明.黄精汤及制剂治疗肺结核和耐药性肺结核临床研究[J].中国当代医药,2011,18(18):58-60.
- [9] Yamaki M, Bai L, Kato T, et al. Dihydrophenanthropyranes from *Bletilla Striata*[J]. *Phytochem*, 1993, 32(2): 427.
- [10] 赵 霞,赵 焯,朱国强.中药在治疗肺结核中的作用及地位[J].实用中医内科杂志,2005,19(6):506-507.
- [11] 封文军,刘艳科,何 芳,等.益肺通络方联合化疗方案治疗耐多药肺结核近期疗效观察[J].新中医,2012,44(3):22-25.
- [12] 封文军,刘艳科,何 芳,等.益肺通络方联合西药化疗对耐多药肺结核的多中心临床中期疗效观察[J].湖南中医药大学学报,2014,34(9):46-50.
- [13] 刘崑松,王 丽,周 杰,等.中药联合西药对初治继发性肺结核病的临床效果研究[J].中国当代医药,2015,22(35):124-126,129.

(本文编辑 李 杰)