DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.009

桃仁止咳平喘药效及作用机制研究

李玲玲[1,2],王晓尧[3],王季俊[1],熊伟[2],李磊[2],崔瑛[1,4]
(1. 河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046;2. 河南羚锐制药股份有限公司,河南 新县 465550;
3. 武警烟台特勤疗养中心,山东 烟台 264001;
4. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南 郑州 450046)

摘要:目的 观察桃仁对咳嗽变异性哮喘(CVA)模型大鼠的影响,探讨桃仁止咳平喘药效及其作用机制。方法 烟熏结合卵清蛋白(OVA)-氢氧化铝致敏并雾化OVA致敏液法建立CVA大鼠模型,通过观察大鼠一般状态,测定其咳嗽潜伏期、咳嗽次数、肺功能,HE染色法观察大鼠肺组织的病理变化,评价桃仁止咳平喘药效。Masson染色法测量大鼠肺组织胶原沉积情况,HE染色法测量支气管的气道形态学参数,酶联免疫吸附(ELISA)法对大鼠肺泡灌洗液(BALF)进行干扰素-γ(IFN-γ)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)、白细胞介素-13(IL-13)、神经生长因子(NGF)的测量,免疫组化法测定α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达,探讨桃仁止咳平喘的作用机制。结果 连续给药2周后,与CVA模型组相比,桃仁各剂量组均可不同程度地改善大鼠的一般形态;显著增加大鼠的体质量($P<0.05$);显著延长大鼠咳嗽潜伏期($P<0.01$)、显著减少大鼠咳嗽次数($P<0.01$);各给药组均可不同程度改善大鼠肺功能;肺组织炎症细胞浸润面积不同程度地缩小,肺泡腔变宽;气管上皮细胞脱落情况、炎症细胞浸润及血管充血情况得到一定的改善;且各给药组可显著升高IFN-γ/IL-4水平($P<0.05$,$P<0.01$),不同程度降低IL-5、IL-13浓度,减少气管周围胶原面积,降低Wat/Pbm、Wam/Pbm,下调α-SMA表达。结论 桃仁可改善CVA模型大鼠的咳喘症状,具有止咳平喘作用,其机制可能与如下因素有关:①纠正Th1/Th2失衡状态,减轻Eos浸润从而减轻气道炎症;②降低IL-13浓度,减少Wat/Pbm、Wam/Pbm从而抑制AHR;③下调α-SMA表达,抑制气道平滑肌增厚及胶原沉积从而减缓气道重塑。

关键词:桃仁;咳嗽变异性哮喘;止咳平喘;作用机制
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0046-09

Investigation on Relieving Cough and Asthma Effect and Its Mechanism of Taoren(Persicae Semen)

LI Lingling[1,2],WANG Xiaoyao[3],WANG Jijun[1],XIONG Wei[2],LI Lei[2],CUI Ying[1,4]
(1. School of Pharmacy,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China;
2. Henan Lingrui Pharmaceutical Company Limited,Xinxian 465550,Henan,China;
3. Drug and Equipment Section,Yantai Special Service Convalescent Center of Armed Police,Yantai 264001,Shandong,China;
4. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed of by Henan province & Education Ministry of The People's Republic of China,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China)

Abstract:*Objective* By observing the effect of Taoren(Persicae Semen) on cough variant asthma(CVA) model rats,it discussed the effect and mechanism of Taoren(Persicae Semen) in relieving cough and asthma. *Methods* Smoke combined with ovalbumin(OVA)-aluminium hydroxide sensitisation and nebulisation of OVA sensitising solution method was used to establish a CVA rat model to evaluate the efficacy of Taoren(Persicae Semen) in relieving cough and calming asthma by observing the general morphology of the rats,determining the incubation period of cough,the number of coughs and lung function and observing the pathological changes in the lung tissues of the rats with the HE staining method. Masson staining was used to measure collagen deposition in rat lung tissues. HE staining was used to measure airway morphological parameters of bronchial tubes. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) method was used to measure the levels of interferon-γ(IFN-γ),interleukin-4(IL-4),interleukin-5(IL-5),interleukin-13(IL-13),nerve growth factor(NGF) in rat bronchoalveolar lavage fluid(BALF),and immunohistochemistry method for α-smooth muscle actin(α-SMA) expression,to explore the mechanism of action of Taoren(Persicae Semen) in relieving cough and asthma. *Results* After 2 weeks of continuous administration,compared with those of the CVA model group,the general morphology of rats in each dose group of Taoren(Persicae Semen) could be improved to different degrees. The body weight of rats was significantly increased($P<0.05$). The incubation period of cough was significantly prolonged($P<0.01$) and the number of cough was significantly decreased($P<0.01$). The lung function of rats could be improved in different degrees in each administration group. The infiltrated area of inflammatory cells in lung tissue was reduced to different degrees,and the alveolar cavity became wider. The exfoliation of trachea epithelial cells,inflammatory cell infiltration

基金项目:国家自然科学基金项目(82204639)
作者简介:李玲玲(1987-),女,河南开封人,讲师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药药性与中药应用。
通讯作者:崔瑛(1961-),男,河南郑州人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药药性及中药抗焦虑。E-mail:cyexin@126.com。

and vascular congestion were improved to a certain extent. In addition, IFN - γ/IL - 4 levels were significantly increased in each administration group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The levels of IL - 5 and IL - 13 were decreased in different degrees, the collagen area around trachea was decreased, the ratios of Wat/Pbm and Wam/Pbm were decreased, and α - SMA expression was down - regulated. *Conclusion* Taoren (Persicae Semen) can improve the symptoms of cough and asthma in CVA rats, and have relieving cough and asthma effects. The mechanism may be as follows. ①It corrects the imbalance of Th1/Th2 and reduce the infiltration of Eos, thereby reducing airway inflammation. ②It decreases IL - 13 concentration and reduces Wat/Pbm and Wam/Pbm to inhibit AHR. ③It down - regulates α - SMA expression and inhibits airway smooth muscle thickening and collagen deposition to slow down airway remodeling.

Keywords: Taoren (Persicae Semen); cough variant asthma; relieving cough and asthma; mechanism

中药功效与药性是直接的对应关系。目前《中华人民共和国药典》有 100 余种中药功效与药性对应关系缺失的情况，显示出中药理论在单味中药应用上的缺陷[1]。按照“以效识性”的中医药思维，本项目通过“文献研究 - 药效验证 - 现代技术佐证”三维整合的系统方法开展中药功效与药性对应关系的研究，寻求依据，弥补缺失的药性，获得了国家自然科学基金青年基金项目的资助。

桃仁是性效不符的典型药物之一。桃仁止咳平喘功效记载明确，应用悠久且内容丰富，但古今桃仁归肺经的记载罕见。桃仁归肺经的缺失，是中药性效不符的代表性问题。课题组前期对桃仁归肺经的遗失进行了文献研究[2]，结果表明桃仁具有独立的止咳平喘功效，为其归肺经的确认奠定了文献依据。因“止咳平喘”是否为桃仁的独立功效是判断桃仁是否归肺经的“分水岭”，该项目建立咳嗽变异性哮喘（CVA）模型，探讨桃仁止咳平喘药效并探讨其作用机制，为桃仁归肺经的确认奠定药效依据。

CVA 是以咳嗽为其唯一或主要临床表现的一种特殊类型哮喘，约占慢性咳嗽原因的三分之一[3-4]。气道炎症、气道高反应性（AHR）及气道重塑被认为是 CVA 发病的主要机制[5]。近年来有关中药治疗 CVA 的相关实验研究主要侧重于中药复方制剂如固本止咳平喘颗粒[6]、加味六安煎[7]、黄龙止咳颗粒[8]、桑梅止咳颗粒[9]等，而单味中药对 CVA 影响及机制的相关研究极为少见。桃仁有止咳平喘功效[10]，如《肘后备急方》[11]中记载了单用桃仁治疗“卒得咳嗽”，《普济方》[12]则有以“桃仁丸”方治疗“咳嗽，亦治诸咳，不以远年，日久不治”的记载等，然而目前未见有关桃仁止咳平喘功效的实验研究。鉴于此，课题组设计如下实验观察桃仁对 CVA 大鼠的影响，并初步探讨其作用机制，为桃仁归肺经的确认奠定药效依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物及制备

山桃仁，购自亳州市永刚饮片厂有限公司，产地河北保定，批号 200628，经河南中医药大学董诚明教授鉴定为蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子；孟鲁司特钠片（顺尔宁），购自杭州默沙东制药有限公司，批号 T015908，规格 10 mg/片；卵清蛋白（OVA），购自北京索莱宝科技有限公司，批号 810R051；辣椒素，购自北京索莱宝科技有限公司，批号 819C021；氢氧化铝[$Al(OH)_3$]，购自上海麦克林生化科技有限公司，批号 C10797220；“散花”牌香烟，购自河南中烟工业有限责任公司，焦油量 11 mg，烟气烟碱量 0.7 mg，烟气一氧化碳量 13 mg。

制备燀桃仁：取山桃仁饮片适量，置沸水中，加热烫至种皮微隆起即捞出至凉水中浸漂，撮开种皮与种仁，将种仁置于烘箱中烘干后密封备用。

制备桃仁浆：取燀桃仁，加蒸馏水适量，使用破壁豆浆机加工后，配制成浓度分别为 0.06、0.12、0.24 g/mL 的桃仁浆。待药品冷却至室温后冷冻保存于冰箱，临用前水浴加热至浆体可自由流动、无浆块。

制备孟鲁司特钠混悬液[7]：取孟鲁司特钠片适量，研钵研匀，精密称取定量粉末，加蒸馏水溶解，搅拌均匀，制得 0.12 mg/mL 的孟鲁司特钠混悬液，冷藏备用。

制备 OVA - $Al(OH)_3$ 致敏液[7]：取 10.0 g 氢氧化铝溶于 100 mL 0.2% CMC - Na 生理盐水溶液，再加入 10.0 g OVA，超声 5 min，搅拌至均匀，即得 10% OVA - $Al(OH)_3$ 凝胶致敏液。现用现配。

制备 OVA 雾化液[7]：称取 OVA 1.0 g 溶于 100 mL 0.2% CMC - Na 生理盐水溶液中，即得 1% OVA 雾化液。现用现配。

制备辣椒素溶液[13]：取辣椒素 30.5 mg，依次加入吐温 - 80 溶液及无水乙醇各 1 mL 溶解，再加入生理盐水 8.0 mL，配成 10^{-2} mol/L 的辣椒素原液。取 1 mL 10^{-2} mol/L 的辣椒素原液，加生理盐水稀释至 100 mL，得 10^{-4} mol/L 辣椒素溶液。现用现配。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 180 ~ 230 g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2016 - 0006，合格证号 110011201107480928。经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核，符合相关规定，审批号 DWLL202003243。大鼠分笼饲养于独立送风隔离笼具系统，实验单位使用许可证编号 SYXK（豫）2020 - 0004。

1.3 试剂

大鼠 γ 干扰素（IFN - γ，批号 MM - 0198R1）、白细胞介素 - 4（IL - 4，批号 MM - 0191R1）、IL - 5（批号 MM - 0094R1）、IL - 13（批号 MM - 0085R1）、神经生长因子（NGF，批号 MM - 0187R1）ELISA 试剂盒，购自江苏酶免实业有限公司。

1.4 仪器

IVC - Ⅱ型独立送风隔离笼具系统（江苏苏州冯氏实验动物有限公司）；DJ12B - P85 型破壁豆浆机（浙江苏泊尔股份有限公司）；403 M 型压缩空气式雾化器（江苏鱼跃医疗设备股份有限公司）；Anires 2005 小动物呼吸测定仪（北京贝兰博科技有限公司）；JW - 2017 HR 型高速冷冻离心机（安徽嘉文仪器装备有限公司）；全波长酶标仪（Bio - Tek EPoch）；不锈钢烟熏架（150 cm × 50 cm × 150 cm，4 层，实验室定制）；有机玻璃雾化箱（40 cm × 30 cm × 25 cm，实验室定制）。

1.5 方法

1.5.1 分组与给药 将 60 只大鼠随机平均分为 6 组：空白对照组、模型对照组、孟鲁司特钠组、桃仁 0.6、1.2、2.4 g/kg 组，每组 10 只。以烟熏结合 OVA - $Al(OH)_3$ 致敏并吸入 OVA 激发法复制 CVA 大鼠模型[6-7]：除空白对照组外，其余大鼠在第 1 ~ 28 天，每日 7：00 am—7：30 am 放入定制密封烟熏架，点燃

20 支“散花”牌香烟(香烟密度约 20 支/m^3),让大鼠自由吸入;造模组大鼠在第 1、8 天腹腔注射 10% OVA - Al(OH)$_3$ 1 mL 致敏;从第 15 天起,将造模大鼠置于密闭有机玻璃雾化箱内,给予 1% OVA 超声雾化激发 10 min,隔日 1 次,共 7 次;空白对照组大鼠腹腔注射或雾化等体积的生理盐水。模型评估:激发时观察大鼠反应,如出现腹肌猛烈收缩、咳嗽、竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕、极度烦躁等现象中 2 种或 2 种以上者,或抽搐、虚脱现象之一者,判定为造模成功[5]。从造模第 15 天开始,在烟熏后 30 min 给药,正常对照组和模型对照组给予蒸馏水,孟鲁司特钠组给予孟鲁司特钠混悬液,桃仁 0.6、1.2、2.4 g/kg 组分别给予相应浓度的桃仁浆。连续给药 15 d,每日一次,给药体积为 1.0 mL/100g。

1.5.2 一般状态观察 观察大鼠在实验期间的形态、活动状况、口鼻分泌物变化等情况;分别于第 15、22、29 天,称量大鼠的体质量,观察桃仁对 CVA 大鼠体质量的影响。

1.5.3 咳嗽潜伏期及咳嗽敏感性的测定 第 28 天,给药后 30 min 将大鼠放置在密闭有机玻璃罩内,雾化吸入 10^{-4}mol/L 辣椒素溶液 120 s,然后关掉雾化器,再在玻璃罩内停留 120 s,记录 240 s 内各只大鼠首次咳嗽的时间及总咳嗽次数。当大鼠出现“洗脸样”抓鼻、腹肌猛烈抽搐及呼吸加速等表现时记为一次咳嗽[14]。

1.5.4 肺功能的测定 大鼠第 29 天给药后,腹腔注射 10% 水合氯醛深度麻醉,剥离气管,用小动物呼吸机检测大鼠 0.2 s 末用力呼气容积(FEV 0.2)、用力肺活量(FVC)、FEV 0.2/FVC、用力最大呼气流速(PEF)值。

1.5.5 肺泡灌洗液(BALF)的收集及 IFN - γ、IL - 4、IL - 5、IL - 13、NGF 的检测 开胸结扎大鼠右主支气管,左肺以磷酸缓冲盐溶液灌洗,每次 3 mL,重复 3 次,收集 BALF,4000 r/min 离心 15 min,取上清液。采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠 BALF 中 IFN - γ、IL - 4、IL - 5、IL - 13、NGF 水平,严格按试剂盒说明书操作。

1.5.6 肺组织标本的制备及观察 行肺泡灌洗术后,取大鼠右肺下叶组织,生理盐水冲洗,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋切片,HE 和 Masson 染色观察支气管肺组织形态学改变,并做病理和免疫组化检测。

1.5.7 气道重塑程度 胶原面积及胶原容积分数(CVF):肺组织常规 Masson 染色后,使用 Image - Pro Plus 6.0 图像分析软件,分析各组胶原纤维表达,计算胶原面积及胶原容积分数,CVF = 胶原面积/组织总面积 × 100%。

气道形态学参数:肺组织常规 HE 染色后,每张切片随机选取 1 个直径约 22 mm 的完整支气管横截面,应用 Image - Pro Plus 6.0 图像分析软件,分别测量每张图片中支气管基底膜周径(Pbm),支气管总面积(Wat),支气管平滑肌面积(Wam),用 Pbm 将测量值标准化,计算支气管管壁厚度 = Wat/Pbm,支气管平滑肌厚度 = Wam/Pbm。

1.5.8 α - 平滑肌肌动蛋白(α - SMA)的表达 蜡块切片,常规脱蜡至水,将组织切片置于盛满 EDTA(pH 9.0)抗原修复液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,自然冷却后将玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤,3% H_2O_2 避光孵育 25 min 阻断内源性过氧化物酶,滴加 3% 牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 30 min,滴加一抗 α - SMA(浓度 1∶1000),4 ℃孵育过夜。次日用 PBS 洗涤玻片,滴加二抗山羊抗兔,室温孵育 50 min,DAB 镜下显色,苏木素复染 1 min,常规脱水封片。显微镜下观察,苏木素染细胞核为蓝色,DAB 显出的阳性表达为棕黄色。每张玻片拍摄 3 个不重复的高倍视野,通过 Image - Pro Plus 6.0 测定阳性信号的阳性面积比及阳性面密度。

1.5.9 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性,采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差非齐性时,采用 Dunnett's T3 法检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义,$P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 桃仁对 CVA 大鼠一般形态的影响

实验期间,空白对照组大鼠行动灵活、毛色光泽,生理盐水雾化期间呼吸平稳。与空白对照组比较,模型对照组大鼠形体消瘦、毛色黯淡,多数大鼠鼻尖有血迹和淡黄色分泌物,烟熏期间及实验后期可闻及哮鸣音,OVA 雾化激发时频繁“洗脸样”抓鼻、腹肌猛烈收缩、干呕、呼吸急促等,提示 CVA 模型复制成功;连续给药 1 周后,各给药组上述症状减轻。与空白对照组相比,模型对照组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组相比,给药后,桃仁 0.6、1.2 g/kg 组及孟鲁司特钠组的大鼠体质量显著增加($P < 0.05$,$P < 0.01$),桃仁 2.4 g/kg 组则无明显变化。见表 1。

表 1 桃仁对 CVA 大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	15 d/(g)	22 d/(g)	29 d/(g)
空白对照组	10		343.72 ± 14.31	380.68 ± 17.89	386.59 ± 16.54
模型对照组	10		307.28 ± 9.67**	327.97 ± 15.15**	347.54 ± 16.23**
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	316.76 ± 9.54	338.74 ± 11.84	363.40 ± 14.34#
桃仁低剂量组	10	0.6	314.83 ± 12.07	349.44 ± 12.07##	362.79 ± 12.00#
桃仁中剂量组	10	1.2	313.21 ± 12.04	347.06 ± 16.31##	363.67 ± 23.23#
桃仁高剂量组	10	2.4	316.69 ± 11.28	339.14 ± 12.62	348.10 ± 11.56

注:**与空白对照组比较,$P < 0.01$;#与模型对照组比较,$P < 0.05$;##与模型对照组比较,$P < 0.01$。

2.2 桃仁对 CVA 大鼠辣椒素诱发咳嗽敏感性的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠咳嗽潜伏期显著降低($P < 0.01$),咳嗽次数明显增多($P < 0.01$)。与模型对照组比较,桃仁 1.2、2.4 g/kg 组及孟鲁司特钠组可显著延长大鼠咳嗽潜伏期($P < 0.01$),减少咳嗽次数($P < 0.01$);桃仁 0.6 g/kg 组可显著减少大鼠咳嗽次数($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 桃仁对 CVA 大鼠咳嗽敏感性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	咳嗽潜伏期/(s)	咳嗽次数/(次)
空白对照组	10		30.90 ± 5.97	12.60 ± 3.34
模型对照组	10		18.10 ± 4.98**	20.10 ± 2.77**
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	34.20 ± 11.09##	11.20 ± 3.46##
桃仁低剂量组	10	0.6	24.30 ± 8.68	15.20 ± 2.39##
桃仁中剂量组	10	1.2	32.70 ± 8.78##	12.10 ± 2.81##
桃仁高剂量组	10	2.4	30.70 ± 6.45##	11.00 ± 4.64##

注:**与空白对照组比较,$P < 0.01$;##与模型对照组比较,$P < 0.01$。

2.3 桃仁对 CVA 大鼠肺功能的影响

如表 3 所示:与空白对照组比较,模型对照组大鼠 FEV 0.2、FVC 及 FEV 0.2/FVC 显著降低($P < 0.05$,$P < 0.01$),提示 CVA 大鼠肺功能受损。与模型对照组比较,桃仁 0.6、2.4 g/kg 组及孟鲁司特钠组可不同程度提高大鼠 FEV 0.2($P < 0.05$,$P < 0.01$),各给药组大鼠的 FVC 均显著升高($P < 0.05$,$P < 0.01$),尤以桃仁 2.4 g/kg 组最为明显,孟鲁司特钠组大鼠 FEV 0.2/FVC 显著提高($P < 0.05$)。

2.4 桃仁对 CVA 大鼠血液流变学指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠全血黏度、红细胞聚

集指数、卡松黏度均显著增加($P<0.05$,$P<0.01$)。与模型对照组相比,桃仁 1.2、2.4 g/kg 组大鼠上述指标均显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),桃仁 0.6 g/kg 组可显著降低不同切变率下的全血黏度($P<0.05$,$P<0.01$),孟鲁司特钠组可显著降低高切(200 s^{-1})水平的全血黏度及卡松黏度($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 4。

2.5 桃仁对 CVA 大鼠肺组织 BALF 中细胞因子的影响

与空白对照组比较,模型对照组 BALF 中 IFN-γ、IFN-γ/IL-4 显著降低($P<0.05$),IL-4、IL-5、IL-13、NGF 显著升高($P<0.05$),桃仁 1.2、2.4 g/kg 组 NGF 浓度极显著升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,孟鲁司特钠组 IFN-γ、IFN-γ/IL-4 水平显著升高($P<0.05$),NGF 浓度显著降低($P<0.05$);桃仁各剂量组 IFN-γ、IFN-γ/IL-4 水平极显著升高($P<0.01$),IL-5、IL-13 浓度显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),桃仁 2.4 g/kg 组 IL-4 浓度显著降低($P<0.05$)。见表 5。

2.6 桃仁对 CVA 大鼠肺组织病理形态的影响

各组大鼠肺组织病理形态见插页 X 图 1。与空白对照组比较,模型对照组大鼠多见气道腔中分泌物,局部大气道可见出血,大范围的肺泡间隔轻中度增宽,上皮细胞和纤维细胞增生,肺泡腔狭窄,伴少量的单个核细胞浸润,较多血管周围可见淋巴细胞浸润,有的可见嗜酸性粒细胞。与模型对照组比较,各给药组气道腔中分泌物减少,未见大气道出血,肺泡间隔轻度增宽,淋巴细胞浸润程度减轻;其中孟鲁司特钠组、桃仁 1.2 g/kg 组情况改善较为明显。

2.7 桃仁对 CVA 大鼠肺组织胶原面积及 CVF 的影响

如表 6、插页 XI 图 2 所示:正常对照组大鼠肺组织镜下气管周围可见环绕薄层胶原纤维;模型对照组镜下气道上皮下可见较厚的胶原沉积层,胶原面积及 CVF 较正常组明显增加($P<0.01$)。与模型对照组比较,孟鲁司特钠组及桃仁 2.4 g/kg 组气管周围胶原面积及 CVF 明显减小,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.8 桃仁对 CVA 大鼠肺组织气道形态学参数的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠 Wat/Pbm、Wam/Pbm 均显著增厚($P<0.01$)。与模型对照组比较,孟鲁司特钠组 Wam/Pbm 显著降低($P<0.05$),桃仁 1.2、2.4 g/kg 组 Wat/Pbm、Wam/Pbm 明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$),桃仁 0.6 g/kg 组则无明显变化($P>0.05$)。见表 7。

2.9 桃仁对 CVA 大鼠肺组织 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达的影响

与空白对照组比较,模型对照组 α-SMA 表达的阳性面积比及阳性面密度均显著提高($P<0.01$)。与模型对照组比较,桃仁高剂量组的阳性面积比及阳性面密度均显著降低($P<0.05$)。见表 8、插页 XII 图 3。

3 讨论

桃仁、山桃仁均为本研究对象的法定来源[10]。有学者对桃仁的来源进行考证,通过对本草著作中药图及相关描述的分析,认为目前所用山桃仁与古人所用的桃仁一致性较高[15]。因此,本实验选择山桃仁为研究对象,其基原为蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana*(Carr.) Franch. 的干燥成熟种子。笔者通过对桃仁止咳平喘功效的应用进行考证,发现古人单用桃仁治疗咳喘病,多以桃仁粥[16-19]的形式。桃仁的主要成分有脂肪油类、苷类、蛋白质和氨基酸、挥发油、甾体及其糖苷等,药材中

表 3 桃仁对 CVA 大鼠肺功能的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	FEV 0.2/(mL)	FVC/(mL)	FEV 0.2/FVC/(%)	PEF/(mL/s)
空白对照组	10		6.57±0.14	9.35±0.33	70.32±2.89	43.27±0.94
模型对照组	10		5.52±0.36**	8.90±0.25*	62.14±5.25**	41.50±2.89
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	6.58±0.25##	9.40±0.48#	70.04±2.73#	43.31±1.51
桃仁低剂量组	10	0.6	6.45±0.21##	9.55±0.21##	67.52±1.92	42.42±1.40
桃仁中剂量组	10	1.2	5.98±0.85	9.76±0.69##	61.53±9.86	41.11±2.73
桃仁高剂量组	10	2.4	6.17±0.50#	10.16±0.57##	60.89±5.21	40.75±4.21

注:*与空白对照组比较,$P<0.05$;**与空白对照组比较,$P<0.01$;#与模型对照组比较,$P<0.05$;##与模型对照组比较,$P<0.01$。

表 4 桃仁对 CVA 大鼠血液流变指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	全血黏度/(mPa·s)			红细胞聚集指数	卡松黏度/(mPa·s)
			低切/(5 s^{-1})	中切/(50 s^{-1})	高切/(200 s^{-1})		
空白对照组	6		30.74±1.43	12.65±0.67	8.87±0.65	9.04±0.45	6.54±0.56
模型对照组	6		38.43±3.38**	14.47±0.93**	10.57±0.98**	11.15±1.38**	7.29±0.90*
孟鲁司特钠组	6	1.2×10^{-3}	35.28±4.02	13.74±0.92	9.47±0.63##	10.64±0.95	6.55±0.61#
桃仁低剂量组	6	0.6	34.10±4.72#	13.01±1.12##	9.55±0.68#	10.30±0.80	6.64±0.47
桃仁中剂量组	6	1.2	33.95±2.66#	13.21±0.42#	9.43±0.39##	10.07±0.77#	6.46±0.19#
桃仁高剂量组	6	2.4	30.86±4.15##	12.19±0.83##	9.09±0.61##	9.13±0.89##	6.46±0.64#

注:*与空白对照组比较,$P<0.05$;**与空白对照组比较,$P<0.01$;#与模型对照组比较,$P<0.05$;##与模型对照组比较,$P<0.01$。

表 5 桃仁对 CVA 大鼠肺组织 BALF 中细胞因子的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	IFN-γ/(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)	IFN-γ/IL-4	IL-5/(pg/mL)	IL-13/(pg/mL)	NGF/(pg/mL)
空白对照组	10		3 346.00±194.12	43.11±3.46	78.07±7.62	92.24±5.05	54.19±3.25	357.58±25.54
模型对照组	10		3 151.50±182.82*	50.09±4.94*	63.36±6.21**	98.21±5.38*	58.05±4.02*	384.58±25.80*
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	3 405.00±183.32##	44.84±2.98	76.23±6.67##	96.40±4.25	57.31±3.97	353.83±19.83#
桃仁低剂量组	10	0.6	3 394.50±131.29##	46.05±2.92	74.01±5.79##	92.86±7.32#	53.93±4.81#	375.58±25.48
桃仁中剂量组	10	1.2	3 453.00±189.97##	45.05±3.12	76.83±4.70##	91.79±5.04##	53.13±3.63##	389.58±36.41**
桃仁高剂量组	10	2.4	3 562.00±95.37##	44.08±1.51#	80.92±3.96##	89.83±4.22##	50.64±2.97##	405.75±22.70**

注:*与空白对照组比较,$P<0.05$;**与空白对照组比较,$P<0.01$;#与模型对照组比较,$P<0.05$;##与模型对照组比较,$P<0.01$。

表 6 桃仁对 CVA 大鼠肺组织胶原面积及 CVF 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	胶原面积/(μm^2)	CVF/(%)
空白对照组	10		515.10 ± 124.48	0.11 ± 0.03
模型对照组	10		3 999.30 ± 800.80**	0.82 ± 0.16**
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	2 218.50 ± 633.47##	0.45 ± 0.13##
桃仁低剂量组	10	0.6	3 422.00 ± 578.19	0.70 ± 0.12
桃仁中剂量组	10	1.2	3 060.40 ± 353.09	0.63 ± 0.07
桃仁高剂量组	10	2.4	1 922.90 ± 535.63##	0.39 ± 0.11##

注：** 与空白对照组比较，$P < 0.01$；## 与模型对照组比较，$P < 0.01$。

表 7 桃仁对 CVA 大鼠支气管管壁厚度(Wat/Pbm)和平滑肌厚度(Wam/Pbm)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	支气管管壁厚度/(μm)	平滑肌厚度/(μm)
空白对照组	10		46.12 ± 7.97	13.19 ± 2.98
模型对照组	10		60.08 ± 6.71**	19.61 ± 2.85**
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	59.25 ± 8.62	16.59 ± 3.33#
桃仁低剂量组	10	0.6	55.33 ± 9.31	17.12 ± 3.58
桃仁中剂量组	10	1.2	51.81 ± 8.58#	14.80 ± 3.67##
桃仁高剂量组	10	2.4	52.19 ± 5.40#	14.94 ± 3.34##

注：** 与空白对照组比较，$P < 0.01$；# 与模型对照组比较，$P < 0.05$；## 与模型对照组比较，$P < 0.01$。

表 8 桃仁对 CVA 大鼠肺组织 α－SMA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量/(g/kg)	阳性面积比(%)	阳性面密度
空白对照组	10		19.561 0 ± 4.632 6	0.024 7 ± 0.006 7
模型对照组	10		28.086 1 ± 5.401 4**	0.036 4 ± 0.006 8**
孟鲁司特钠组	10	1.2×10^{-3}	24.476 4 ± 6.022 2	0.031 0 ± 0.007 5
桃仁低剂量组	10	0.6	26.319 1 ± 7.610 3	0.034 8 ± 0.009 4
桃仁中剂量组	10	1.2	24.724 2 ± 4.781 9	0.031 7 ± 0.004 7
桃仁高剂量组	10	2.4	22.622 7 ± 3.627 9#	0.028 3 ± 0.005 7#

注：** 与空白对照组比较，$P < 0.01$；# 与模型对照组比较，$P < 0.05$；## 与模型对照组比较，$P < 0.01$。

的脂溶性成分约占其干重的 50%[20-21]。因此，本研究使用豆浆机将桃仁制备为桃仁浆，以最大程度保留桃仁中的极性和非极性成分，这也与传统用法基本保持一致。

实验结果显示，桃仁各剂量组均能改善 CVA 模型大鼠的一般形态，桃仁 0.6、1.2 g/kg 组可不同程度增加大鼠体质量，而桃仁 2.4 g/kg 组大鼠体质量增加不显著，且在实验后期，可观察到该组大鼠口中分泌泡沫状稀痰，并闻及“痰鸣音”，查阅有关文献并未见类似报道。按照中医药理论理解，桃仁中含有大量油脂类成分，大鼠过度进食甜腻、肥厚之品，超出脾脏正常运化的阈值，导致脾胃虚损、脾虚失运，则痰湿内生。与模型对照组比较，各给药组的咳嗽敏感性均降低，表现为咳嗽潜伏期延长及单位时间内咳嗽次数降低，尤以桃仁 1.2、2.4 g/kg 组更为明显，表明桃仁止咳平喘确有疗效。桃仁对 CVA 模型大鼠肺功能的改善主要体现在提高 FVC，而桃仁各剂量组 PEF 有下降趋势且呈剂量依赖，表明各给药组大鼠可能存在呼吸抑制的情况。HE 染色结果表明，桃仁各剂量组可改善 CVA 模型大鼠肺组织炎性细胞浸润、水肿、出血等病理损伤。

针对古人认为桃仁止咳平喘在于“血和则气降，咳逆自止”的观点[22-23]，对各组大鼠进行了血液流变学指标检测。结果表明，与空白对照组比较，CVA 模型组大鼠全血黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度均显著升高，与中医血瘀证的临床表现较为一致，表明 CVA 模型可致大鼠血瘀。瘀血既为 CVA 的病理产物，亦为致病因素。斯建中[24]提出从瘀论治 CVA 的观点，盖“久咳耗气，肺气虚损，血滞成瘀；久咳伤阴，阴虚火旺，灼血为瘀；久咳损阳，虚寒内生，寒凝血瘀；宿痰伏肺，痰阻气机，血滞成瘀。”CVA 病程冗长，迁延不愈，符合中医“久病入络为血瘀”“久咳必瘀”的一般认识：咳嗽日久，则肺气不利、肺体损伤，继而肺虚治节失职，血行涩滞，血瘀肺脉。《血证论·咳嗽》[25]云：“盖人身气道，不可有塞滞，内有瘀血，则阻碍气道，不得升降，是以壅为咳”“瘀血乘肺，咳逆喘促”，指出瘀血也为咳嗽的致病因素。桃仁以活血见长，实验结果表明，与模型对照组比较，桃仁各给药组均可不同程度改善 CVA 模型大鼠的瘀血状态，且存在明显的量效关系，因此，本研究结果在一定程度上支持古人的认识。

CVA 的发病机制与典型哮喘相似，其主要病理特点是以嗜酸性粒细胞(Eos)浸润为特征的气道炎症性疾病[26]，由多种炎性细胞和炎症介质参与，其中 T 淋巴细胞免疫调节失衡(Th 1 功能不足，Th 2 功能亢进)是 CVA 发生、发展的关键环节[27]。INF－γ 主要由 Th1 细胞分泌，可抑制 Th2 细胞增殖、分化，阻断血清免疫球蛋白 E(IgE)合成，遏制 Eos 在肺组织的聚集，被认为是对抗炎症反应起保护作用的 Th1 细胞因子[28]。IL－4 主要由 Th1 细胞分泌，并能诱导 Th2 细胞分化，产生 IgE，加重炎性细胞浸润，被认为是变应性炎症发展过程中起主导作用的 Th2 细胞因子[29-30]。IL－5 也是与嗜酸性粒细胞炎症相关的重要细胞因子，它可诱导骨髓产生 Eos，导致组织 Eos 增多并诱导气道重塑[31]。本实验以 INF－γ/IL－4 水平表征 Th1/Th2 平衡情况，结果表明模型对照组较空白对照组大鼠 BALF 中 INF－γ/IL－4 水平显著降低($P < 0.01$)、IL－5 浓度显著升高($P < 0.05$)，桃仁各剂量组均可显著升高 INF－γ/IL－4 水平($P < 0.01$)、显著降低 IL－5 浓度($P < 0.05$，$P < 0.01$)，提示桃仁能纠正 CVA 模型大鼠 Th1/Th2 失衡状态。

AHR 是指气道对多种刺激因素呈现的高度敏感状态，气道平滑肌(ASM)增厚被认为是导致 AHR 的病理生理学原因，ASM 中含有多种收缩功能蛋白，当受到变应原或炎症因子刺激后，ASM 收缩致使气道狭窄，AHR 增强[5,32]。IL－13 是与 AHR 高度相关的细胞因子，主要由 Th2 细胞产生，通过一种或多种可能途径引起气道杯状细胞增生，促进黏液的过度分泌，在多种细胞因子共同作用下诱发 AHR[33]。实验结果表明，与空白对照组比较，CVA 模型组大鼠 Wat/Pbm、Wam/Pbm 显著增加($P < 0.01$)，IL－13 浓度显著升高($P < 0.05$)，与孙洮玉等[34]、张宁宁等[35]的研究结果一致。与模型对照组比较，桃仁各剂量组均可不同程度降低大鼠 BALF 中 IL－13 浓度($P < 0.05$，$P < 0.01$)，1.2、2.4 g/kg 组则可显著降低 Wat/Pbm、Wam/Pbm($P < 0.05$，$P < 0.01$)，提示桃仁可降低 CVA 模型大鼠 AHR。

CVA 产生的气道炎症导致气道损伤，进而出现气道修复与重塑，气道重塑主要的病理形态学改变是以胶原为主的细胞外基质沉积，同时存在上皮完整性缺失，杯状细胞增生，基底膜增厚，平滑肌增生、肥大等病理损伤，重塑通常是不可逆的，最终会导致气道狭窄、气流受限及气道高反应性等病理特征[14,32,36]。本实验中，模型对照组镜下气道上皮可见较厚的胶原沉积层，胶原面积及 CVF 较正常对照组明显增加($P < 0.01$)，给药后，各给药组胶原面积及 CVF 均有下降，尤以孟鲁司特钠组及桃仁 2.4 g/kg 剂量组最为显著($P < 0.01$)。气道平滑肌增厚是气道重塑的另一重要特征，α－SMA 是气道平滑肌的特征性标志物，可以反映气道平滑肌细胞的数量及其收缩

能力的改变,是气道平滑肌收缩的结构基础[37]。实验结果表明,桃仁可通过下调 α-SMA 表达从而减轻 CVA 模型对大鼠气道重塑的影响,桃仁 2.4 g/kg 剂量组最为显著($P<0.01$)。NGF 是联系免疫细胞与神经细胞之间的双向信号分子,能诱导人类肺成纤维细胞、血管平滑肌细胞收缩和迁移,还能导致内皮细胞增生,NGF 可能通过自分泌作用调节这些细胞而参与呼吸道重塑[38]。本次研究中,CVA 模型组大鼠 BALF 中 NGF 水平显著升高($P<0.05$),与范春辉等[39]的研究结果相符。给药后,孟鲁司特钠组较模型对照组 NGF 水平显著下降($P<0.05$),而桃仁各剂量组"不降反升",提示该途径可能并非为桃仁修复 CVA 模型大鼠气道重塑的作用机制。

总之,CVA 发病机制复杂,是气道炎症、气道高反应性、气道重塑等多种因素相互影响、共同作用的结果。桃仁可改善 CVA 模型大鼠的咳喘症状,具有止咳平喘作用,其机制可能与①纠正 Th1/Th2 失衡状态,减轻 Eos 浸润从而减轻气道炎症;②降低 IL-13 浓度,减少 Wat/Pbm、Wam/Pbm 从而抑制 AHR;③下调 α-SMA 表达,抑制气道平滑肌增厚及胶原沉积从而减缓气道重塑等因素有关。

参考文献

[1] 曹灿,冯静,李玲玲,等. 基于"以效识性"观点的中药药性再认识[J]. 中华中医药杂志,2021,36(2):648-653.
[2] 李玲玲,王晓尧,王季俊,等. 桃仁归肺经遗失的文献研究[J]. 中华中医药杂志,2023,38(9):4445-4451.
[3] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2021)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2022,45(1):13-46.
[4] LAI K F,CHEN R C,LIN J T,et al. A prospective,multicenter survey on causes of chronic cough in China[J]. Chest,2013,143(3):613-620.
[5] 孙婧怡,马礼兵. 咳嗽变异性哮喘的发病机制及研究进展[J]. 实用医学杂志,2018,34(16):2803-2806.
[6] 甘雨,乔敏,丁春晓,等. 固本止咳平喘颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠肺组织病理及 Th1/Th2 类细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊,2019,37(11):2614-2617.
[7] 张宁宁,吴力群,霍婧伟,等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠气道重塑病理形态学的影响[J]. 北京中医药大学学报,2020,43(1):50-55.
[8] 刘菊华,辜建伟,胡泉,等. 黄龙止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠气道高反应、气道炎症及气道重塑的干预效应[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(5):749-755.
[9] 候丹,黄帅阳,吕明圣,等. 桑梅止咳颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠气道炎症反应的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(2):62-66.
[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:290-291.
[11] 葛洪. 王均宁,点校. 肘后备急方[M]. 天津:天津科学技术出版社,2021.
[12] 朱橚. 普济方(第 4 册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:1745.
[13] 蔡黎,毕小利,王忆勤,等. 咳嗽变异性哮喘豚鼠模型的构建[J]. 山西医科大学学报,2007,38(12):1070-1073.
[14] 张宁宁,吴力群,霍婧伟,等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘大鼠模型气道重塑的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2020,15(2):288-291.
[15] 易腾达,秦梦琳,王莎莎,等. 桃仁的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(8):142-150.
[16] 陈直. 邹铉,增续. 刘丹彤,张小勇,主编. 寿亲养老新书[M]. 北京:中国医药科技出版社,2017:81,83.
[17] 唐慎微. 陆拯,校注. 重修政和经史证类备用本草[M]. 北京:中国中医药出版社,2013:1314.
[18] 忽思慧. 刘光华,校注. 饮膳正要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:46-47.
[19] 李梴,著. 何永,韩文霞,校注. 医学入门[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:201,281.
[20] 许筱凰,李婷,王一涛,等. 桃仁的研究进展[J]. 中草药,2015,46(17):2649-2655.
[21] 王仁芳,范令刚,高文远,等. 桃仁化学成分与药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床,2010,25(6):426-429.
[22] 缪希雍. 神农本草经疏[M]. 北京:中医古籍出版社,2017:676-677.
[23] 吴仪洛. 本草从新[M]. 陆拯,赵法新,陈明显,校点. 北京:中国中医药出版社,2013:163.
[24] 斯建中. 从瘀论治小儿咳嗽变异性哮喘[J]. 浙江中医学院学报,2004,28(4):10-11.
[25] 唐容川,著. 谷建军,校注. 血证论[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011.
[26] LIU M X,LIU K X,ZHU N,et al. Inflammatory mediators in induced sputum and airway hyperresponsiveness in cough variant asthma during long-term inhaled corticosteroid treatment[J]. Mediators Inflamm,2012,2012:403868.
[27] TODA T,YOSHINO S. Enhancement of ovalbumin-specific Th1,Th2,and Th17 immune responses by amorphous silica nanoparticles[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2016,29(3):408-420.
[28] MAHMOUDI M J,HARSINI S,FARHADI E,et al. Interleukin-2 and Interferon-gamma single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with chronic heart failure[J]. Avicenna J Med Biotechnol,2018,10(3):173-177.
[29] WENZEL S E. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes. type-2 immunity and beyond[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2016,55(1):1-4.
[30] 罗波,尧雪洲,廖敏,等. 黄芪甲苷Ⅳ对卵清蛋白诱导的哮喘小鼠 CD_4^+ T 细胞亚型 Th1、Th2 免疫活性的抑制作用[J]. 中华中医药杂志,2018,33(9):4071-4074.
[31] LAMBRECHT B N,HAMMAD H. The immunology of asthma[J]. Nat Immunol,2015,16:45-56.
[32] AL-MUHSEN S,JOHNSON J R,HAMID Q. Remodeling in asthma[J]. J Allergy Clin Immunol,2011,128(3):451-462.
[33] 辛琪,李浩嫙. IL-13 与气道高反应的作用机制及研究进展[J]. 中国医药指南,2012,10(17):88-89.
[34] 孙洮玉,徐荣谦,方顺顺,等. 加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌组织表型转化的干预作用研究[J]. 中国中医急症,2020,29(1):1-4,8.
[35] 张宁宁,吴力群,陈海鹏,等. 加味六安煎对咳嗽变异性哮喘豚鼠血清 IL-2、IL-12 及 IL-13 水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(10):21-24.
[36] 杨斌,徐荣谦,杨冬妹,等. 加味芎蝎散对咳嗽变异性哮喘大鼠气道平滑肌中自噬蛋白表达的干预作用[J]. 中国中医急症,2018,27(9):1505-1507,1513.
[37] SCHMIDT M,SUN G,STACEY M A,et al. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma[J]. J Immunol,2003,171(1):380-389.
[38] 彭秋凤,孔灵菲. 神经生长因子与咳嗽变异性哮喘[J]. 国际呼吸杂志,2010,30(7):441-444.
[39] 范春辉,程兆忠,韩伟忠,等. NGF 对支气管哮喘大鼠气道重塑影响及其机制[J]. 齐鲁医学杂志,2015,30(2):173-175,178.

桃仁止咳平喘药效及作用机制研究

（正文见 46－51 页）

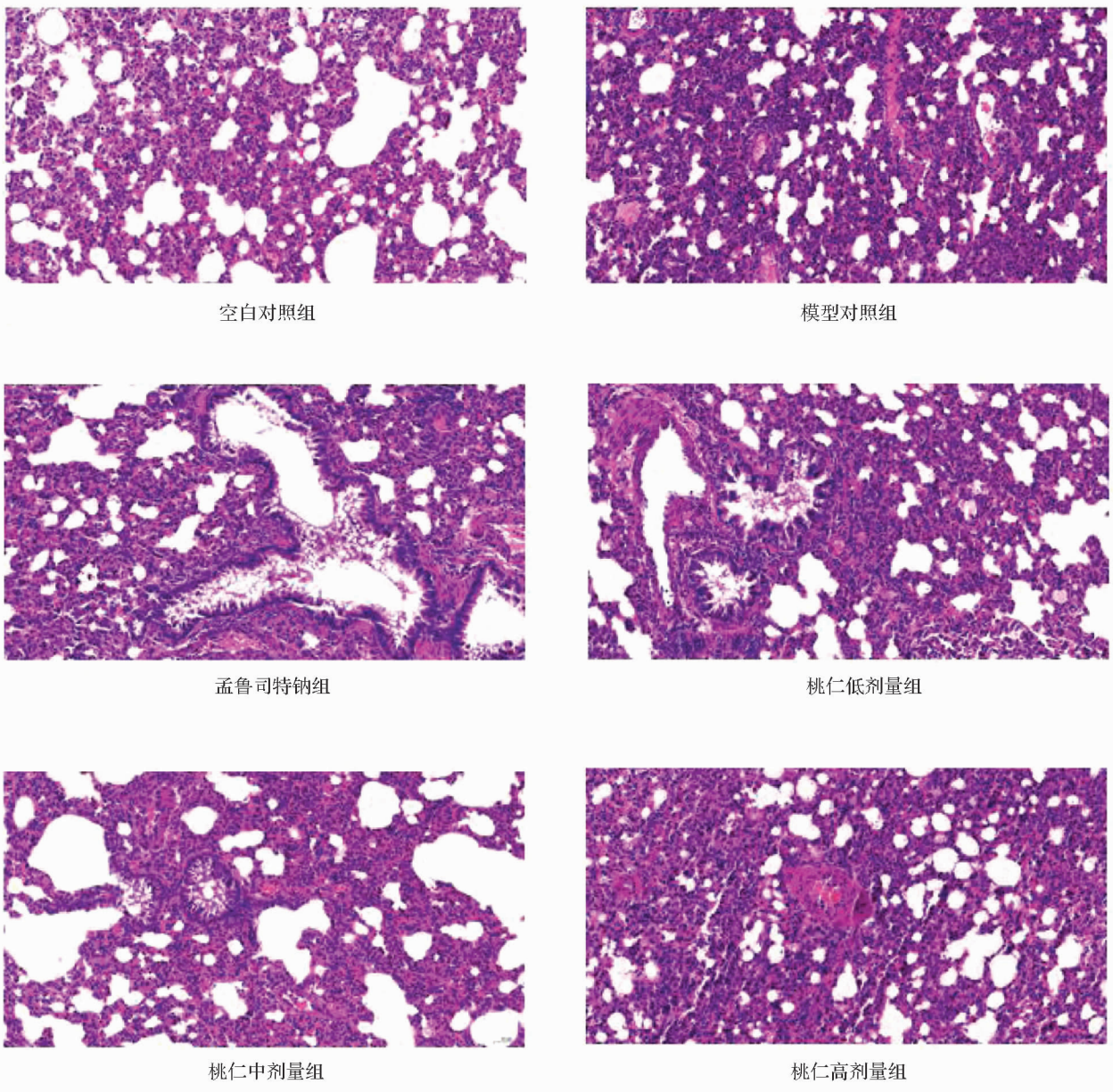


图 1　桃仁对 CVA 大鼠肺组织病理形态的影响（HE ×200）

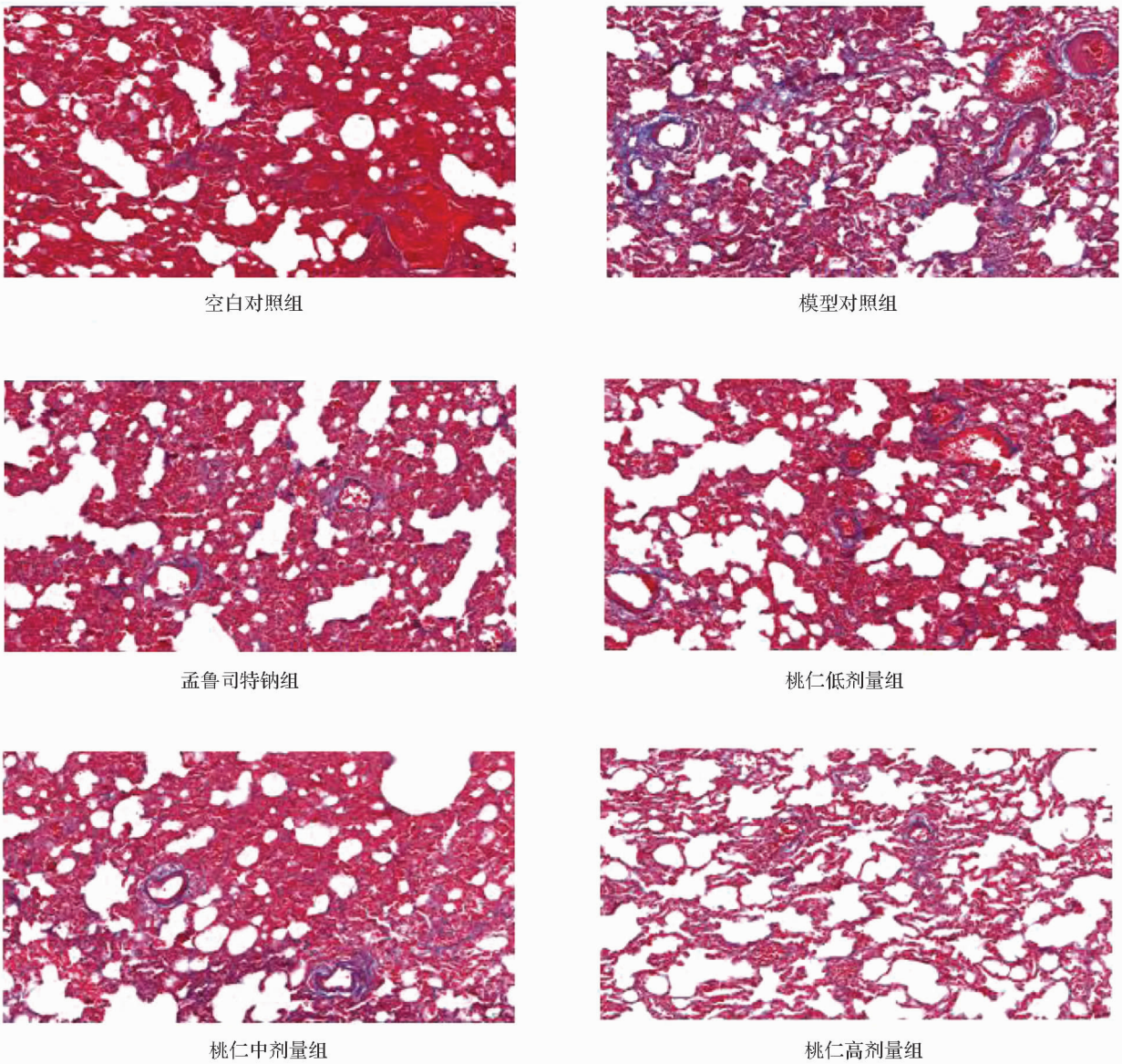
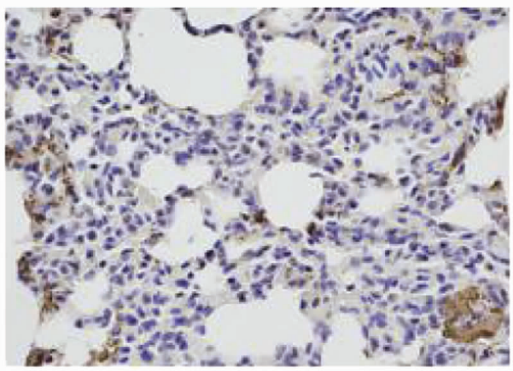
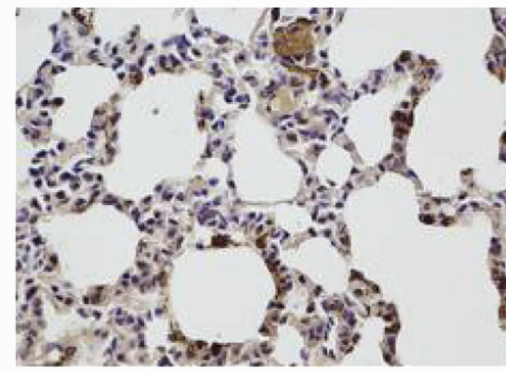


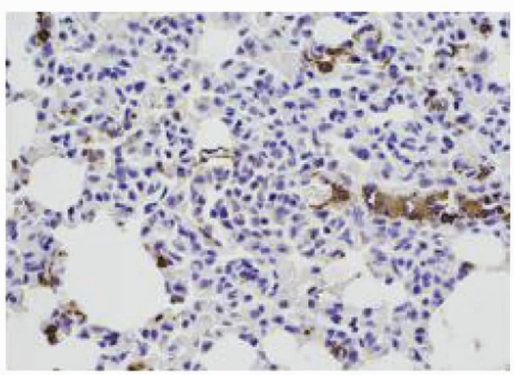
图 2 桃仁对 CVA 大鼠肺组织胶原沉积情况比较(Masson ×200)



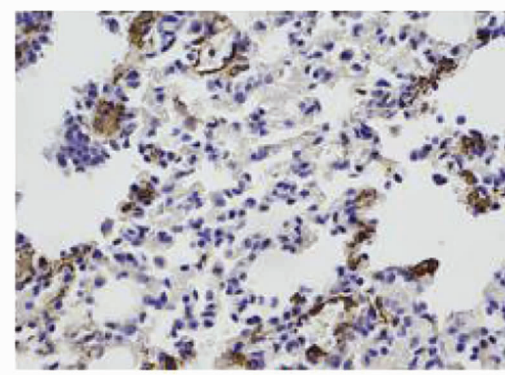
空白对照组



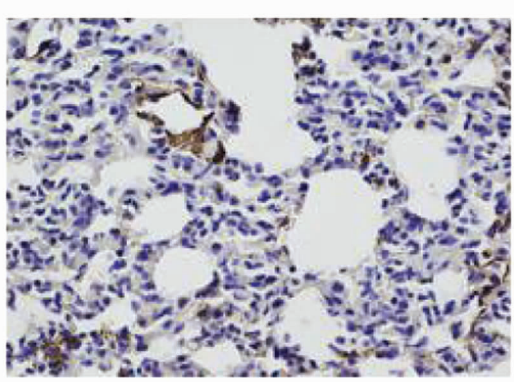
模型对照组



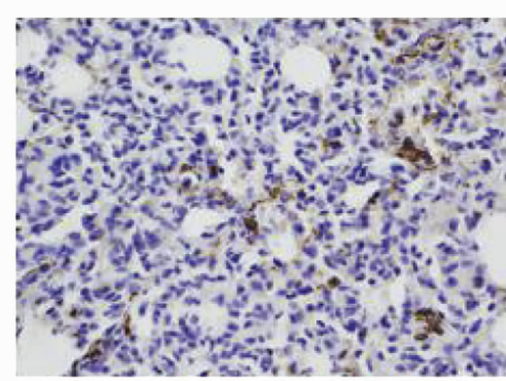
孟鲁司特钠组



桃仁低剂量组



桃仁中剂量组



桃仁高剂量组

图 3　桃仁对 CVA 大鼠肺组织 α－SMA 表达的影响（×200）