

麻黄-苦杏仁药对减轻大鼠气道损伤的物质基础及作用机制分析

周开放¹, 黄刚², 肖雄¹, 张颖¹, 敖波¹, 李文宏^{1*}

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 泉州医学高等专科学校, 福建泉州 362100)

[摘要] **目的:**探究麻黄-苦杏仁药对减轻大鼠气道损伤的物质基础,初步探讨其作用机制。**方法:**雄性SD大鼠适应性饲养3 d,筛选合格后随机分为9组[正常组、模型组、地塞米松组、麻黄-苦杏仁药对不同配比组(N1~N6组)]。上午9:00开始灌胃相应药物,灌胃1 h后立即用2%氯化乙酰胆碱+0.4%磷酸组胺引喘并记录引喘潜伏期,连续给药7 d。末次引喘后立即麻醉,取出主气管,一部分气管用10%甲醛固定,苏木精-伊红(HE)染色观察各组气道病理学特征,另一部分气管匀浆处理,运用酶联免疫吸附法测定表皮生长因子(EGF),诱导型一氧化氮合酶(iNOS),内皮素-1(ET-1)的质量浓度。同批6只大鼠适应性饲养后分离出空肠、回肠肠段,制备含药肠吸收液,运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液中主要差异性成分及其含量。采用多元线性回归分析效应指标与主要差异性成分的相关性。**结果:**N1~N6组肠吸收液的差异性成分为麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱和苦杏仁苷;效应指标分别为引喘潜伏期,ET-1,iNOS,EGF质量浓度以及气道病理学总评分。**结论:**麻黄-苦杏仁药对延长引喘潜伏期和修复气道损伤的物质基础为麻黄碱、伪麻黄碱、甲基麻黄碱和苦杏仁苷,其减少iNOS和ET-1含量、抑制EGF生成及维持较低水平NO/ET的主要有效成分为甲基麻黄碱,说明麻黄为主要药味,苦杏仁辅助其修复气道损伤,其中N3组治疗效果最佳。

[关键词] 麻黄-苦杏仁; 药对; 引喘潜伏期; 甲基麻黄碱; 诱导型一氧化氮合酶; 内皮素-1; 表皮生长因子

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0172-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181992

Analysis of Material Basis of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum on Airway Injury in Rats and Its Mechanism

ZHOU Kai-fang¹, HUANG Gang², XIAO Xiong¹, ZHANG Ying¹, AO Bo¹, LI Wen-hong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Quanzhou Medical College, Quanzhou 362100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the material basis of couplet medicines of Ephedrae Herba and Armeniacae Semen Amarum in reducing airway damage in rats, and to explore its mechanism of action. **Method:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were adaptively reared for 3 days. After screening, they were randomly divided into 9 groups [normal group, model group, dexamethasone group, and Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum with different ratio groups (N1-N6 groups)]. At 9:00 am, the corresponding drugs were intragastrically administered. Immediately after 1 hour of intragastric administration, 2% acetylcholine chloride + 0.4% histamine phosphate was used to induce asthma and the incubation period was recorded for 7 days. Immediately after the last asthmatic anesthesia, the main trachea was taken out, some of the trachea were fixed with 10% formaldehyde, and hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological features of

[收稿日期] 20180529(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460610);江西自然科学基金计划项目(20151BAB205066)

[第一作者] 周开放,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:812629849@qq.com

[通信作者] *李文宏,博士,副教授,从事中药药理学研究,E-mail:liwhong0311@163.com

each group. Another part of the tracheal homogenate was treated by enzyme-linked immunosorbent assay for the concentration of epidermal growth factor (EGF), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelin-1 (ET-1). After the adaptive feeding of 6 rats in the same batch, the jejunum and ileum intestine were separated to prepare the drug-containing intestinal absorption liquid. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to analyze the major differential components and their content in the drug-containing intestinal absorption liquid of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum. Multiple linear regression analysis was used to analyze the correlation between the effect indicators and the main differential components. **Result:** The differential components in the intestinal absorption liquid of N1-N6 groups were ephedrine, pseudoephedrine, methylephedrine and amygdalin; the effect indicators were asthmatic latency, ET-1, iNOS, EGF mass concentrations and total score of airway pathology. **Conclusion:** The main material basis of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum for prolonging the incubation period and repairing airway damage are ephedrine, pseudoephedrine, methylephedrine and amygdalin. The main active ingredient that reduces iNOS and ET-1 levels, inhibits EGF production, and maintains lower levels of NO/ET is methylephedrine. It indicates that Ephedrae Herba was the main medicinal taste, and Armeniacae Semen Amarum assists repairing airway damage. The N3 group has the best therapeutic effect.

[Key words] Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum; couplet medicines; incubation period for asthma; methylephedrine; inducible nitric oxide synthase; endothelin-1; epidermal growth factor

哮喘是一种严重的呼吸道慢性炎症疾病,中药治疗哮喘历史悠久,积累了丰富的临床经验^[1]。张欢等^[2]采用数据挖掘的方法发现所有哮喘方中支持度最高的药对为麻黄-苦杏仁。麻黄、苦杏仁同入肺经,麻黄辛散苦泄,宣发肺气;苦杏仁味苦微温,降利肺气;两者配伍,相辅相成,增强定喘之功^[3]。药对的组成虽简单,但体现了中药药性理论,是中医临床遣方用药的特色之一,具有紧扣病机、功用专一、药简力宏、疗效确切等特点^[4],开展药对的物质基础和作用机制研究,不仅可以诠释药对的药效物质及其分子网络机制,还可为进一步优化方剂的组合和临床合理运用提供科学依据。

近年来,麻黄-苦杏仁的研究主要集中在含量测定^[5]、药物动力学^[6]等方面,有报道采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)研究麻黄-苦杏仁的药物代谢^[7]和平喘作用^[8],也有研究表明该药对促进气道上皮组织修复与表皮生长因子受体(EGFR)介导的修复功能紧密相关^[9-10],鲜有研究报道麻黄-苦杏仁药对主要差异性成分与效应指标的相关性。临床上,组方配比的不同可能会产生不同的治疗作用^[11-13]。为诠释麻黄-苦杏仁配伍的科学内涵,本实验采用 U₆(6⁴)均匀设计,运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析含药肠吸收液中主要差异性成分的变化,观察该药对各配比组对引喘潜伏期、气管病理学及炎症因子等效应指

标的影响,经相关性分析,探索该药对主要差异性有效成分与效应指标的内在联系,初步阐释麻黄-苦杏仁药对延长引喘潜伏期、修复气道损伤的物质基础及作用机制,以期为该药对的临床应用提供参考。

1 材料

LC-20AD XR 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),TripleTOF 5600⁺型高分辨飞行时间质谱联用仪(美国 AB Sciex 公司),Tissuelyser-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信科技有限公司),HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),LX-400 型迷你离心机和 VORTEX-5 型旋涡振荡器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司),MDF-392 型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司),J21793G 型微量移液枪(德国 Eppendorf 公司),AUW220D 型电子分析天平(日本岛津公司),MaxQ 4000 型恒温摇床(美国赛默飞世尔公司),402AI 型超声雾化器(上海鱼跃医疗设备有限公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司),SpectraMax[®] i3x 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),YB-6LF 型生物组织石蜡包埋机(亚光医用电子技术有限公司),RM2016 型轮转式切片机(德国徕卡公司),KD-TS3A 型自动脱水机(北京佳源兴业科技有限公司),CX31 型显微镜和 NFINITY 1-5C 型图像采集分析系统[奥林巴斯(中国)有限公司],GZX-GF101-3BS-II 型电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗医

疗器械制造有限公司)。

麻黄(产地甘肃,批号20180315)和苦杏仁(产地河北,批号20180325)饮片均购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院付小梅副教授鉴定,分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的干燥草质茎和蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* var. *ansu* 的干燥成熟种子; Krebs-Ringer's 营养液(KR液,自制,称取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g, CaCl₂ 0.37 g, 加水定容至 1 L, 即得), 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、盐酸甲基麻黄碱、苦杏仁苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 171241-201508, 171237-201510, 171247-200301, 110820-201607, 纯度 99.8%, 99.8%, 99.8%, 98%), 磷酸组胺(美国 Sigma 公司,批号 101516525), 氯化乙酰胆碱和伊红染液(Solarbio 公司,批号分别为 313G011, 20170908), 乌来糖(上海展云化工有限公司,批号 171101), 地塞米松磷酸钠注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号 1709012), 磷酸盐缓冲液(PBS,北京全式金生物技术有限公司,批号 K80721), 大鼠表皮生长因子(EGF)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分别为 CBS-E08029r, CSB-E08325r), 大鼠内皮素-1(ET-1)ELISA 试剂盒(武汉优尔生科技股份有限公司,批号 CEA460Ge), 中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,批号 20171009), 苏木素染液(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 20180130), 水为屈臣氏纯净水,乙腈、甲醇为质谱级,甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2016-0002,24 °C 饲养,自由摄食饮水,实验前 24 h 禁食不禁水。实验动物使用经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 JZLLSC2015006。

2 方法

2.1 主要指标成分含量差异的检测

2.1.1 溶液的制备 参照文献[14-15]的方法制备麻黄-苦杏仁药对水煎液和含药肠吸收液。精密吸取麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液 200 μL 于 2 mL 离心管中,加入甲醇 600 μL,涡旋 3 min,于 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,离心 2 次,精密量取上清液 200 μL 加至内插管中,得麻黄-苦杏仁药对含

药肠吸收液的样品溶液,待测。

2.1.2 检测条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,流动相 0.02% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 2% ~ 17% B; 6 ~ 12 min, 17% ~ 80% B; 12 ~ 15 min, 80% ~ 85% B; 15 ~ 18 min, 85% ~ 95% B; 18 ~ 21 min, 95% ~ 2% B),平衡至 25 min 后再采集下一样本。离子化模式为电喷雾正离子模式(ESI⁺),正离子源电压 5.5 kV,离子源温度 550 °C,裂解电压 100 V,碰撞能量 40 eV,扩展碰撞能量 10 eV。雾化气体为氮气(N₂),雾化气和辅助气压力均设定为 345 kPa,气帘气压力 241.5 kPa。一级质谱母离子扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 000,子离子扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 000,数据采集时间 30 min;扫描方式为母离子触发的子离子扫描。

2.1.3 数据分析 采用 MarkerView 1.2.1 软件对正离子模式总离子流图进行处理,结合 *m/z*,相对保留时间和分子式匹配软件 Elemental compositionTM,化合物结构匹配软件 Mass FragmentTM 及 UNIFITM 数据处理系统对各主要分子离子峰进行归属。同时对正离子模式麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液质谱峰进行分析,不同配伍麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液经正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)探索化合物之间的差异,通过数据以及变量重要性投影(VIP)值分析,筛选 VIP 值 > 1.5 的色谱峰作为差异成分。

2.2 麻黄-苦杏仁药对对大鼠气管的影响

2.2.1 哮喘大鼠引喘潜伏期 SD 雄性大鼠适应性饲养 3 d 后进行筛选与分组。正常组和模型组按剂量 5 g·kg⁻¹ 灌胃生理盐水,地塞米松组按剂量 0.5 mg·kg⁻¹ 灌胃地塞米松磷酸钠注射液,麻黄-苦杏仁不同配比组(N1 ~ N6 组)灌胃不同配比的麻黄-苦杏仁水煎液(给药剂量分别为 2.21, 3.33, 2.77, 3.89, 3.33, 4.45 g·kg⁻¹)。灌胃 1 h 后即刻将大鼠逐一放入透明有机玻璃容器中,模型组、地塞米松组和 N1 ~ N6 组使用超声雾化器喷入 2% 氯化乙酰胆碱 + 0.4% 磷酸组胺等体积混合液^[16],流速 0.5 mL·min⁻¹,喷雾 30 s,连续 7 d,记录引喘潜伏期, > 300 s 按 300 s 计。正常组喷入生理盐水。

2.2.2 气管中 ET-1, iNOS, EGF 的含量 末次引喘后立即腹腔注射 20% 乌来糖麻醉(剂量 6 mL·kg⁻¹),分离主气管, PBS 反复冲洗 2 遍,洗尽血液,称重,解剖剪碎,放入 2 mL 相应编号的尖头离心管中,加入 9 倍量 PBS,放入全自动样品快速研

磨仪中于 2 ℃ 匀浆, 14 000 r·min⁻¹ 离心 2 次, 每次 5 min, 分装上清液, -20 ℃ 过夜。严格参照试剂盒说明书检测气管匀浆上清液中 ET-1, iNOS, EGF 的含量。

2.2.3 大鼠气道病理学 采用 2.2.2 项下方法取主气管, 用 PBS 洗净血液, 放入预冷的 10% 甲醛溶液于 4 ℃ 固定 48 h 以上, 分别放入包埋盒中, 流水冲 1 h, 依次进行脱水、包埋、切片、脱蜡、水化、染色、封片、拍照。每张片选取 4 个不同视野, 采用综合评分法^[17-18], 选取 5 个评分项(黏膜上皮脱落程度、上皮杯状细胞化生、腺体腔粘液分布、毛细血管有无充血、有无炎症细胞浸润)。每个评分项最低 0 分, 最高 4 分, 无病变者 0 分; 轻度病变者 1 分; 中度病变者 2 分; 重度病变者 3 分; 严重损伤者 4 分, 将各评分项的累计分作为气道病理学总评分^[19]。

2.3 数据统计 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 21.0 软件处理, 采用单因素方差分析法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。运用多元线性回归方程分析, 探寻麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液中主要差异性成分与各效应指标之间的关系。

3 结果

3.1 差异性成分分析 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析各配比麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液, 得正离子模式总离子流图, 见图 1。对离子保留时间、质荷比及绝对离子峰强度进行归属, 数据标准化后进行主成分分析(PCA), 见图 2。结果显示各配比麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液无样本点重合, 说明其所含成分存在明显差异^[20]。通过将差异性化合物数据库和麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液中有效化合物数据库进行匹配, 利用 OPLS-DA 分析化合物之间的差异^[21-22], 最终确定了 4 种显著性差异成分, 见表 1。

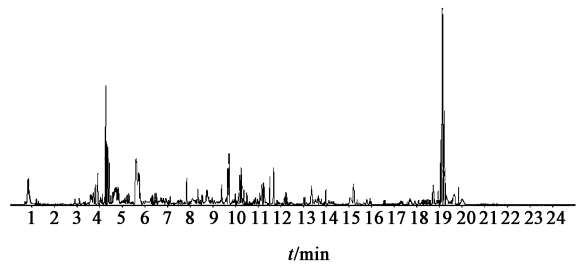


图 1 麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液的总离子流色谱
Fig.1 Total ion flow chromatogram of drug-containing intestinal absorption fluid of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum

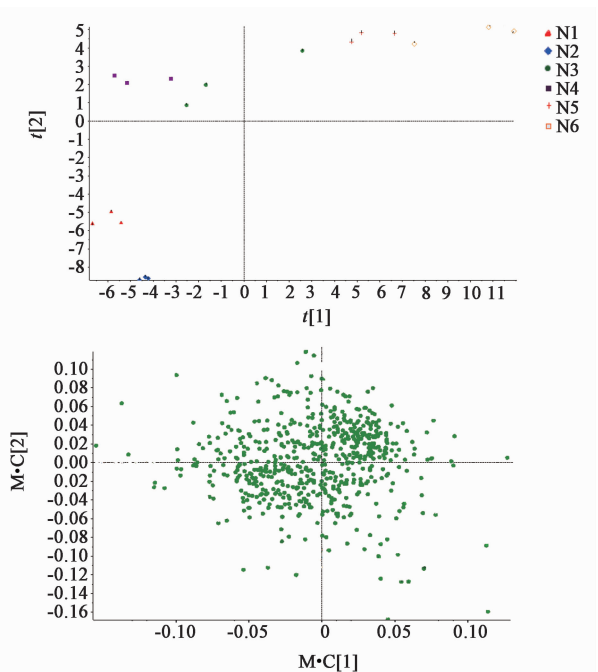


图 2 麻黄-苦杏仁药对各配比组合含药肠吸收液的 PCA 得分 (a) 和载荷散点 (b)
Fig.2 PCA score (a) and loading plots (b) of drug-containing intestinal absorption fluid of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum with different ratio

表 1 麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液显著差异有效成分的质量浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Contents of active ingredients with significant difference of drug-containing intestinal absorption fluid of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	麻黄/g	苦杏仁/g	麻黄碱 (X_1)	伪麻黄碱 (X_2)	甲基麻黄碱 (X_3)	苦杏仁苷 (X_4)
N1	24.1	75.9	0.006 9 ± 0.000 8	0.008 9 ± 0.001 2	0.000 6 ± 0.000 1	0.514 8 ± 0.054 7
N2	28.0	72.0	0.005 1 ± 0.000 5	0.019 6 ± 0.004 6	0.000 6 ± 0.000 1	0.467 9 ± 0.145 8
N3	48.1	51.9	0.014 1 ± 0.005 7	0.010 7 ± 0.006 2	0.001 3 ± 0.000 3	0.463 7 ± 0.113 9
N4	44.5	55.5	0.006 3 ± 0.001 4	0.019 2 ± 0.002 1	0.001 0 ± 0.000 1	0.410 7 ± 0.088 7
N5	64.0	36.0	0.009 5 ± 0.003 0	0.015 6 ± 0.003 6	0.000 9 ± 0.000 6	0.258 1 ± 0.006 8
N6	56.9	43.1	0.011 8 ± 0.002 3	0.018 2 ± 0.005 7	0.001 2 ± 0.000 3	0.272 0 ± 0.047 8

3.2 对引喘潜伏期, 气道病理学及 ET-1, iNOS, EGF 含量的影响 与模型组比较, 麻黄-苦杏仁药对

各配比组均具有延长哮喘大鼠引喘潜伏期的作用, 其中 N3 组最为显著 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 模

型组 ET-1, iNOS, EGF 及气道病理学总评分均有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组比较, 麻黄-苦杏仁药对各配比组均显著降低了 ET-1 的质量浓度 ($P < 0.01$); N3 组和 N4 组显著性降低了 iNOS 的质量浓度 ($P < 0.01$)。比较 iNOS 与 ET-1 的变化趋势, 发现 NO/ET 维持着一个平衡关系, 地塞米松组, N3 组和 N4 组维持着相对低水平的 NO/ET。与模型组比较, 地塞米松组和 N3 组对哮喘大

鼠气管中 EGF 表达具有显著抑制作用 ($P < 0.01$); 麻黄-苦杏仁药对各配比组均能显著性降低哮喘大鼠气道病理学总评分 ($P < 0.01$)。综上所述, 初步表明麻黄-苦杏仁药对各配比组中接近原方 1:1 的 N3 组维持低水平 NO/ET, 降低 EGF 含量及延长引喘潜伏期的效果最佳, 同时 N4 组降低气道病理学总评分的效果最佳, 且均与地塞米松组效果相当。见表 2 和图 3。

表 2 各组大鼠引喘潜伏期、气道病理学总评分及 ET-1, iNOS, EGF 质量浓度的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of incubation period for asthma, total score of airway pathology and contents of ET-1, iNOS and EGF of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

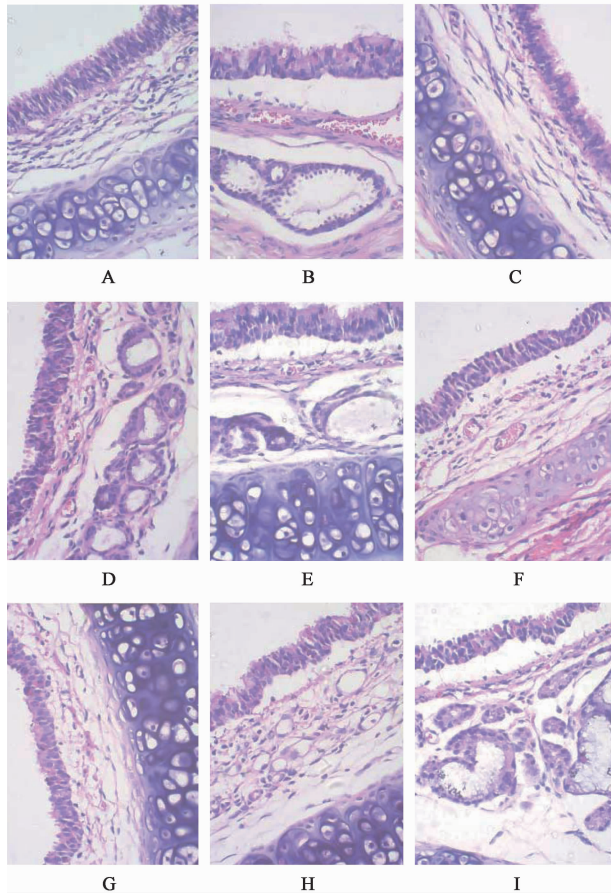
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	引喘潜伏期 /s	ET-1 /μg·L ⁻¹	iNOS /mg·L ⁻¹	EGF /ng·L ⁻¹	气道病理学 总评分
正常	5	-	163.24 ± 58.52	13.81 ± 3.73	9.61 ± 2.14	0.75 ± 0.46
模型	5	137.25 ± 36.71	287.36 ± 98.34 ²⁾	45.44 ± 10.33 ²⁾	142.81 ± 83.24 ²⁾	14.38 ± 0.92 ²⁾
地塞米松	0.000 5	214.67 ± 57.98 ⁴⁾	182.04 ± 80.16 ⁴⁾	23.98 ± 8.37 ⁴⁾	104.64 ± 86.98 ⁴⁾	2.38 ± 0.52 ⁴⁾
N1	2.21	190.13 ± 26.15 ³⁾	108.83 ± 53.40 ⁴⁾	42.02 ± 7.87	145.25 ± 77.97	7.75 ± 1.03 ⁴⁾
N2	3.33	188.17 ± 73.26 ³⁾	170.93 ± 106.24 ⁴⁾	42.66 ± 9.70	139.51 ± 41.50	8.88 ± 1.13 ⁴⁾
N3	2.77	219.38 ± 42.78 ⁴⁾	188.62 ± 103.05 ⁴⁾	26.83 ± 8.64 ⁴⁾	107.71 ± 65.47 ⁴⁾	7.25 ± 1.38 ⁴⁾
N4	3.89	198.38 ± 44.53 ³⁾	182.39 ± 99.67 ⁴⁾	26.12 ± 7.99 ⁴⁾	114.88 ± 87.02 ³⁾	4.13 ± 1.13 ⁴⁾
N5	3.33	185.00 ± 52.92 ³⁾	55.31 ± 29.76 ⁴⁾	30.30 ± 8.96 ³⁾	146.40 ± 64.90	5.38 ± 0.74 ⁴⁾
N6	4.45	168.10 ± 31.33	181.58 ± 20.71 ⁴⁾	29.17 ± 4.97 ³⁾	112.85 ± 45.40 ³⁾	9.13 ± 0.64 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

由图 3 可知, 正常组气管黏膜结构清晰, 外膜完整; 模型组气管黏膜脱落, 黏膜下层可见大量腺体, 腺腔黏液增多, 黏膜及黏膜下层血管充血扩张; 地塞米松组气管黏膜结构完整, 上皮无明显损伤, 黏膜下层腺体少见, 血管无明显充血。N1 组和 N2 组气管黏膜可见较多杯状细胞, 黏膜上层部分脱落, 黏膜下有较多腺体, 少量腺腔扩张; N3 组黏膜上皮略有脱落, 黏膜下层血管扩张, 毛细血管增多; N4 组和 N5 组气管黏膜结构完整, 上皮无明显损伤, 黏膜下层腺体少见, 血管无明显充血; N6 组气管黏膜上皮略有脱落, 黏膜下有较多腺体, 部分腺腔黏液增多。

3.3 主要差异性成分与效应指标的相关性分析
通过 SPSS 21.0 软件分析各自变量对因变量引喘潜伏期 (Y_1), ET-1 质量浓度 (Y_2), iNOS 质量浓度 (Y_3), EGF 质量浓度 (Y_4) 和气道病理学总评分 (Y_5) 的影响, 进行多元线性回归分析。得回归方程分别为 $Y_1 = -16.805X_1 - 10.227X_2 + 482.557X_3 + 1.090X_4 + 1.339$ ($r = 0.816$), 说明各自变量对 Y_1 的影响程度排序为甲基麻黄碱 > 麻黄碱 > 伪麻黄碱 > 苦杏仁苷; 其中甲基麻黄碱和苦杏仁苷含量变化与大鼠引喘潜伏期呈正相关, 而麻黄碱和伪麻黄碱的

含量与大鼠引喘潜伏期呈负相关。得 $Y_2 = 86.625X_2 + 506.652X_3 + 1.543X_4 - 3.242$ ($r = 0.938$), 各自变量的影响程度排序为甲基麻黄碱 > 伪麻黄碱 > 苦杏仁苷 > 麻黄碱, 其中甲基麻黄碱、伪麻黄碱和苦杏仁苷含量与 ET-1 质量浓度呈正相关。得回归方程 $Y_3 = 11.777X_1 - 330.889X_3 + 11.261X_4 + 0.487$ ($r = 0.950$), 各自变量的影响程度排序为甲基麻黄碱 > 麻黄碱 > 苦杏仁苷 > 伪麻黄碱, 其中麻黄碱和苦杏仁苷含量与 iNOS 质量浓度呈正相关, 而甲基麻黄碱含量则与 iNOS 质量浓度呈负相关。得回归方程 $Y_4 = -15.002X_2 - 659.801X_3 - 0.920X_4 + 2.490$ ($r = 0.978$), 各自变量的影响程度排序为甲基麻黄碱 > 伪麻黄碱 > 苦杏仁苷 > 麻黄碱, 其中甲基麻黄碱、伪麻黄碱和苦杏仁苷含量与 EGF 质量浓度呈负相关。得回归方程 $Y_5 = 1522.132X_1 + 536.198X_2 - 14363.366X_3 + 13.249X_4 - 6.645$ ($r = 0.829$), 各自变量的影响程度排序为甲基麻黄碱 > 麻黄碱 > 伪麻黄碱 > 苦杏仁苷, 其中甲基麻黄碱含量与气道病理学总评分呈负相关, 麻黄碱、伪麻黄碱和苦杏仁苷含量则与气道病理学总评分呈正相关。



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D~I. N1~N6 组
图 3 麻黄-苦杏仁药对大鼠气道病理学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of Ephedrae Herba-Armeniacae Semen Amarum on airway pathology in rats (HE, $\times 400$)

4 讨论

本文研究表明,麻黄-苦杏仁药对可在一定程度上可延长引喘潜伏期,有效缓解哮喘症状。与文献报道麻黄、苦杏仁单独使用或配伍使用均能起到平喘作用,延长大鼠引喘潜伏期一致^[23]。由相关性分析可知,该药对起作用的主要成分为麻黄类成分,且主要是甲基麻黄碱,这与文献报道甲基麻黄碱具有起效较慢、药效维持时间长一致^[24]。且麻黄类成分对引喘潜伏期呈现双向调节作用,其中甲基麻黄碱可延长引喘潜伏期,而伪麻黄碱、麻黄碱与甲基麻黄碱的作用正好相反。苦杏仁中的苦杏仁苷对该药对延长引喘潜伏期起到了增强作用,可能是由于苦杏仁在苦杏仁酶的作用下产生微量氢氰酸,对呼吸中枢有抑制作用,从而达到镇咳平喘的作用^[25-26]。麻黄与苦杏仁配伍使用,能通过不同作用机制发挥平喘作用,且平喘作用优于单独使用^[8]。

气道上皮损伤与功能失调是哮喘发病的始动因素,并且在气道炎症、气道高反应性、气道重塑及气

道黏液高分泌中有重要作用^[9,27];EGF 是人体内存在的一种生长因子,支气管上皮细胞在 EGF 中的暴露时间延长可诱导黏液细胞化生^[28];研究显示 EGF 通过促进平滑肌细胞的增殖、迁移,细胞外基质的合成以及促进成纤维细胞增殖参与哮喘气道重塑,且增高程度与哮喘的严重性相关^[29-31]。抑制 EGF 生成,可以减弱炎症反应,降低气道高反应性,从而修复气道损伤,麻黄-苦杏仁药对大多数配比组均具有抑制 EGF 生成的作用。研究发现 ET 导致呼吸道黏膜充血水肿,促进嗜酸性粒细胞(EOS)的浸润,促进平滑肌细胞和成纤维细胞增殖、黏膜下腺体分泌^[32];哮喘气道炎症刺激可产生大量的 iNOS 而诱导 NO,可加重气道充血、渗出、水肿,诱发或加重气道高反应性,使炎症反应放大^[33];同时调节气道 NO/ET 比值可以恢复气道的舒缩功能,降低气道高反应性^[34]。本文研究表明麻黄-苦杏仁药对降低了模型大鼠 ET-1 和 iNOS 的质量浓度,且维持低水平的 NO/ET。综上所述,麻黄-苦杏仁药对可能通过降低哮喘大鼠 iNOS 和 ET-1 含量、抑制 EGF 生成及维持较低水平 NO/ET 起到保护气道的作用。

急性毒性研究表明,麻黄与苦杏仁配伍比例为 1:1 和 1:2 时,可降低苦杏仁的毒性,麻黄宣肺气,苦杏仁降肺气,一宣一降,相辅相成,符合肺之气机,可加强定喘之功^[23]。本文研究表明麻黄-苦杏仁药对各配比组中接近原方 1:1 的 N3 组维持低水平 NO/ET,降低 EGF 含量及延长引喘潜伏期的效果最佳;N4 组降低气道病理学总评分的效果最佳。由相关性分析可知,甲基麻黄碱对各项效应指标影响程度最大;由差异性成分的含量分析可知,麻黄-苦杏仁药对含药肠吸收液接近原方 1:1 的 N3 组中甲基麻黄碱含量最高;二者相互印证。

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测了麻黄-苦杏仁含药肠吸收液的主要差异性成分,因化合物匹配数据库和软件资源的匮乏,使得对有些离子峰无法进行定性与定量分析;在进行差异性有效成分筛选时,因 VIP 值设置的原因,差异性成分较少。麻黄-苦杏仁药对配伍成分复杂,且治疗哮喘的作用机制存在多靶点、多通路的特点^[35],后续将从自然药观方面研究该药对配伍的科学性,拟构建其配伍-成分-效应联动变化体系。

[参考文献]

- [1] 陈志刚. 经方辨治哮喘经验[J]. 上海中医药杂志, 2016,50(3):33-35.
- [2] 张欢,范欣生,王崇骏,等. 古今哮喘方用药规律对比

- 的关联规则研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(3): 94-96.
- [3] 刘贵军, 李然, 李全. 麻黄常用药对的配伍方法[J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 13-14.
- [4] 唐于平, 束晓云, 李伟霞, 等. 药对研究(I)——药对的形成与发展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4185-4190.
- [5] 谢颖, 汤庆发, 徐文杰, 等. 不同配伍比例对麻黄-杏仁药对有效成分含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2686-2688.
- [6] 宋帅, 梁德东, 任孟月, 等. 麻黄-杏仁药对有效成分在大鼠体内组织分布的定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 92-97.
- [7] 谢颖. 麻黄-杏仁药对配伍的主要化学成分及尿液代谢物的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [8] 谭晓梅, 郭阳, 余林中, 等. 麻黄-杏仁药对配伍及不同对比对急性毒性及平喘作用的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 82-84.
- [9] Wadsworth S J, Nijmeh H S, Hall I P. Glucocorticoids increase repair potential in a novel *in vitro* human airway epithelial wounding model[J]. J Clin Immunol, 2006, 26(4): 376-387.
- [10] Le Cras T D, Acciani T H, Mushaben E M, et al. Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 300(3): L414-L421.
- [11] 李伟霞, 唐于平, 刘立, 等. 药对研究(III)——药对的功效物质基础[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(24): 4196-4202.
- [12] 郭思宇, 刘明平, 周赛妮, 等. 川芎-天麻不同对比对血瘀型偏头痛大鼠药效学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 127-132.
- [13] 吴溪, 高家荣, 吴德林, 等. 酸枣仁-五味子药对不同配伍的中医应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 273-276.
- [14] 杨丽, 李莹, 王清娟, 等. 麻黄-杏仁药对对比与有效成分含量变化规律研究[J]. 中国当代医药, 2017, 24(5): 4-7.
- [15] 李文宏, 徐国良, 彭彩霞, 等. 基于含药肠吸收液法的复方丹参片对大鼠离体胸主动脉环的作用及机制初步研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(3): 28-31.
- [16] 张启云, 李冰涛, 李文宏, 等. 麻杏石甘汤对哮喘豚鼠的血浆代谢组学研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 12-15.
- [17] Murray J F, Matthay M A, Luce J M, et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 138(3): 720-723.
- [18] Takao Y, Mikawa K, Nishina K, et al. Attenuation of acute lung injury with propofol in endotoxemia [J]. Anesth Analg, 2005, 100(3): 810-816.
- [19] 汪路明. LTB4 相关通路及上皮-间质转化对肺移植后闭塞性细支气管炎的作用 [D]. 杭州: 浙江大
学, 2017.
- [20] 陈爱娟, 吴芳, 陈伟. 基于 UPLC-QTOF-MS/MS 对 2 型糖尿病中医证型的代谢组学研究[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(17): 2572-2574.
- [21] 朱海林. 基于 NMR 和 UPLC-QTOF-MS/MS 技术的林下山参化学成分研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [22] 许照, 肖雄, 黄刚, 等. 基于含药肠吸收液的麻黄-杏仁药对物质基础与作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 1-6.
- [23] 谭晓梅, 郭阳, 余林中, 等. 麻黄-杏仁药对配伍及不同对比对急性毒性及平喘作用的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 82-84.
- [24] 姚琳, 邓康颖, 罗佳波. 麻黄总生物碱与麻黄碱镇咳平喘作用比较研究[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 18-19.
- [25] Holgate S T. Innate and adaptive immune responses in asthma[J]. Nat Med, 2012, 18(5): 673-683.
- [26] Fischer R, Tome D, Mc Ghee J R, et al. Th1 and Th2 cells are required for both eosinophil and neutrophil-associated airway inflammatory responses in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(1): 44-49.
- [27] Holgate S T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis [J]. Immunol Rev, 2011, 242(1): 205-219.
- [28] Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, et al. Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(5): 913-920.
- [29] Cerutis D R, Nogami M, Anderson J L, et al. Lysophosphatidic acid and EGF stimulate mitogenesis in human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol, 1997, 273(1): 10-15.
- [30] 李晓辉. 表皮生长因子受体对哮喘小鼠气道重塑的影响及机制[D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [31] Amishima M, Munakata M, Nasuhara Y, et al. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(1): 1907-1912.
- [32] Avenier C, Ilenoosh C, Asheyn O, et al. Kinds of endothelin and its effect on bronchial contraction [J]. Br J Pharmacol, 1990, 100(5): 168-172.
- [33] 刘仁慧, 郑君芳, 袁颖, 等. 淫羊藿/女贞子配伍调节哮喘大鼠 NO/ET 及 HPA 轴作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1590-1593.
- [34] 高健翔, 张伟华, 刘仁慧. 淫羊藿/女贞子配伍激素对哮喘大鼠 ET/NO 平衡的影响作用[J]. 中国中医急症, 2012, 21(11): 1763-1764.
- [35] 张雄飞, 黄娟萍, 李碧云, 等. 中药治疗哮喘作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 344-347.

[责任编辑 刘德文]