

基于豚鼠支气管哮喘模型优选疏风定喘颗粒的主体工艺路线

米慧娟, 王永香, 王秀海, 李璐, 吴云, 王振中*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] 目的: 优选疏风定喘颗粒的主体工艺路线, 为该制剂的后续研究提供基础数据。方法: 采用卵清蛋白致豚鼠支气管哮喘模型。随机分为空白组, 模型组, 氨茶碱组, 咳喘宁组和疏风定喘颗粒工艺 1, 2, 3, 4 组, 自造模第 15 天起, 将豚鼠置引喘仪内, 空白组恒压喷入生理盐水, 其他组恒压喷入 10% 卵蛋白, 任动物自行吸入 15 min, 每天 2 次, 连续 7 d。豚鼠灌胃给药与诱喘同步进行, 每组于当天 2 次诱喘间隔时间内灌胃给药, 每日 1 次, 连续 7 d, 空白组与模型组均灌胃给予等量生理盐水。以豚鼠引喘潜伏期, 哮喘发作期, 血清白介素-4 (IL-4), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 免疫球蛋白 E (IgE) 含量为指标, 优选疏风定喘颗粒的主体工艺路线。结果: 与模型组相比, 工艺 1~4 组样品均可降低哮喘豚鼠血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量, 延长豚鼠引喘潜伏期和哮喘发作期, 且均有显著性差异 ($P < 0.01$); 与咳喘宁组相比, 工艺 4 样品可延长豚鼠引喘潜伏期和哮喘发作期, 且有显著性差异 ($P < 0.05$); 与氨茶碱组相比, 工艺 4 样品可延长豚鼠引喘潜伏期, 且有显著性差异 ($P < 0.05$)。与工艺 2 组相比, 工艺 4 组样品可显著延长引喘潜伏期 ($P < 0.05$)。结论: 选择工艺 4 为主体工艺路线, 后续可进行工艺参数优化以开发疏风定喘颗粒。

[关键词] 疏风定喘颗粒; 工艺路线; 哮喘; 白细胞介素-4; 肿瘤坏死因子- α ; 免疫球蛋白 E; 氨茶碱; 咳喘宁口服液

[中图分类号] R283.6; R285.5; R284.2; R944.2+7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0007-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180007

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0905.010.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:05

Optimization of Main Preparation Technology of Shufeng Dingchuan Granules Based on Bronchial Asthma Model of Guinea Pigs

MI Hui-juan, WANG Yong-xiang, WANG Xiu-hai, LI Lu, WU Yun, WANG Zhen-zhong*

(State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize main preparation technology of Shufeng Dingchuan granules.

Method: Ovalbumin was used to prepare bronchial asthma model in guinea pigs. The guinea pigs were randomly divided into normal group, model group, aminophylline group, Kechuanning group, Shufeng Dingchuan granules routing 1, 2, 3 and 4 groups. From the 15th day, the guinea pigs were placed in the apparatus which can cause asthma. The normal group were spray with saline, the other groups sprayed with 10% ovalbumin for consecutively 7 days, 2 times a day, 15 min at a time. At the same time, the normal group and model group were orally given normal saline, and the other groups were orally given the drug during the middle time of 2 times induced asthma for consecutively 7 days. With the length of asthma incubation time and asthma episodes time, the contents of interleukin-4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and immunoglobulin E (IgE) as indexes to determine the main preparation technology of Shufeng Dingchuan granules. **Result:** Compared with the model group, routing 1, 2, 3 and 4 groups could reduce the contents of IL-4, TNF- α and IgE in asthma guinea pigs ($P < 0.01$), and delay the asthma incubation period and asthma episodes period ($P < 0.01$). Compared with Kechuanning group,

[收稿日期] 20170417(015)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09101043-003)

[第一作者] 米慧娟, 硕士, 中级工程师, 从事中药新药及制药新技术研究, Tel: 0518-81152325, E-mail: mihuijuan87@163.com

[通讯作者] * 王振中, 博士, 高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-81152326, E-mail: wzzh-nj@163.com

the routing 4 samples could delay the asthma incubation period and asthma episodes period ($P < 0.05$). Compared with aminophylline group, the routing 4 samples could delay the asthma incubation period ($P < 0.05$). Compared with the routing 2 group, the routing 4 group could delay the asthma incubation period ($P < 0.05$). **Conclusion:** Routing 4 is selected as the main preparation technology of Shufeng Dingchuan granules to further optimize the technological parameters.

[Key words] Shufeng Dingchuan granules; process route; asthma; interleukin-4; tumor necrosis factor- α ; immunoglobulin E; aminophylline; Kechuanning oral liquid

支气管哮喘简称哮喘, 西医认为哮喘是由嗜酸粒细胞、肥大细胞和 T 淋巴细胞等多种细胞及其分泌的细胞因子参与的气道慢性炎症性疾病, 同时也是一种外周免疫耐受机制发生缺陷的疾病^[1], 是临床常见的呼吸道疾病, 常伴有气道对多种刺激因子反应性增高及广泛、可逆性气流阻塞症状发生^[2-3]。中医则将其纳入“喘病”、“哮病”范畴, 其病位主要在肺, 肺气不宣为其关键, 发作时痰瘀互结, 风盛挛急是其主要病机特点, 从而逐步提出“宣肺平喘、祛痰行瘀、疏风解痉”的治疗方法。疏风定喘颗粒即基于此法组方而得, 主要由炙麻黄、苦杏仁、黄芩、前胡、射干、款冬花、桑白皮、地龙等 12 味药组成, 经 10 余年的临床应用和基础实验研究证实该处方对哮喘的治疗效果及安全性较好。为了克服汤剂使用时煎煮不便、服用量大、易霉败变质等缺点, 同时提高携带、储藏、运输等的便利性, 拟应用现代科学技术进行提取、浓缩、纯化、干燥、制粒等工序将其制备成颗粒剂。

支气管哮喘发病机制非常复杂, 其发病机制与炎症、感染、免疫功能异常和 1 型辅助性 T 淋巴细胞亚群/2 型辅助性 T 淋巴细胞亚群 (Th1/Th2) 失衡等有关^[4]。梁秀云等^[5-6]研究发现支气管哮喘患者血清白细胞介素-4 (IL-4), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 免疫球蛋白 E (IgE) 水平显著升高, 且急性发作期患者血清 IL-4, TNF- α 和 IgE 水平均显著高于缓解期患者, 因此检测哮喘患者血清 IL-4, TNF- α 和 IgE 水平对患者疾病预测及治疗具有重要的临床意义。刘贵颖等^[7]研究表明卵清蛋白特异性致敏能成功构建大鼠支气管哮喘模型。本实验拟基于卵清蛋白致豚鼠支气管哮喘模型, 考察药物对豚鼠引喘潜伏期和哮喘发作期的影响, 分析疏风定喘颗粒对哮喘豚鼠血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量的影响, 优选该制剂的主体工艺路线。

1 材料

MP12001 型电子天平 (上海恒平科学仪器有限公司), AL204 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公

司), YLS-8A 型多功能诱咳引喘仪 (山东医学科学院设备站), RT-6000 型酶标仪 (深圳市雷杜生命科学股份有限公司)。氨茶碱片 (上海衡山药业有限公司, 批号 140602), 咳喘宁口服液 (南京先声东元制药有限公司, 批号 40-140812), 卵蛋白 (美国 Sigma 公司, 批号 A5503-25G); 白细胞介素-4 (IL-4), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和免疫球蛋白 E (IgE) 试剂盒均购自美国 R&D 公司, 批号分别为 201405, 201407, 201407。

清洁级豚鼠购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 雄性, 体重 300 ~ 350 g, 许可证号 SYXK (苏) 2010-0010。本实验所涉及的动物相关操作均在江苏康缘药业股份有限公司动物伦理委员会的批准下进行, 批准号 DWLL20140011。

2 方法

2.1 样品的制备 通过对疏风定喘颗粒组方各药味化学成分及药理作用的文献研究, 结合定喘汤的临床煎煮方法, 设计了以下 4 条工艺路线。工艺 1: 全方加 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 减压浓缩后干燥, 得黄色粉末 135 g。工艺 2: 全方加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 减压浓缩后干燥, 得黄色粉末 58 g。工艺 3: 全方加 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 减压浓缩至相对密度 1.10 ~ 1.13 (50 °C), 加入乙醇, 使含醇量达 60%, 室温下静置 24 h, 滤过, 收集滤液, 减压浓缩后干燥, 得黄色粉末 79.5 g。工艺 4: 炙麻黄组药材加 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 减压浓缩至相对密度 1.10 ~ 1.13 (50 °C), 冷却至室温, 加入乙醇适量, 使乙醇体积分数达 60%, 室温静置 24 h, 滤过, 取上清液, 回收乙醇, 得醇沉浓缩液, 备用; 黄芩组药材加 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液合并, 回收乙醇, 得醇提浓缩液, 备用; 地龙组药材加 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 得水提取液, 备用; 将醇沉浓缩液、醇提浓缩液、水提取液合并, 减压浓缩后干燥, 得黄色粉末 96 g。

2.2 造模与给药 取豚鼠 80 只,随机分为 8 组,即空白组,模型组,氨茶碱组($0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),哮喘宁组($2 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),工艺 1 组($3.38 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),工艺 2 组($1.45 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),工艺 3 组($1.99 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),工艺 4 组($2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)(工艺 1,2,3,4 组的给药剂量均为按同一生药量折算的提取物质量),每组 10 只。除空白组外,各组豚鼠采用腹腔注射 10% 卵蛋白 1 mL 致敏,自注射第 15 天起诱喘,即将豚鼠置于引喘仪内,实验组恒压喷入 10% 卵蛋白,空白组喷入等量生理盐水,任动物自行吸入 15 min,每天 2 次,连续 7 d。豚鼠灌胃给药与诱喘同步进行,每组于当天 2 次诱喘间隔时间内灌胃给药,每日 1 次,连续 7 d,空白组与模型组均灌胃给予等量生理盐水。

2.3 样本采集 末次给药后 2 h,将豚鼠分别置于引喘仪中,恒压喷入 10% 卵蛋白,记录引喘潜伏期及哮喘发作期(从喷雾开始至哮喘发作,出现呼吸急促,点头,身体颤抖,跌倒;不跌倒者潜伏期以 180 s 计算)^[8],而后腹主动脉取血 5 mL,常温自然凝固 1 h,于 $3\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离血清,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用以测定血清中 IL-4, TNF- α 和 IgE 的含量。

2.4 指标检测^[9] 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)

检测血清中 IL-4, TNF- α 和 IgE 的含量,严格按照仪器操作规程及试剂盒说明书进行操作检测。

2.5 统计学分析 所有数据资料均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析(one-way ANOVA)进行处理,组间比较采用 *t* 检验;利用 Pearson 相关系数作指标参数间的相关性分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组豚鼠药效学试验 结果见表 1。与模型组相比,氨茶碱组,哮喘宁组,工艺 1~4 组的豚鼠引喘潜伏期和哮喘发作期均延长,且具有显著性差异($P < 0.01$);血清 IL-4, TNF- α , IgE 的含量均降低,且有显著性差异($P < 0.01$)。与氨茶碱组比较,工艺 4 组的引喘潜伏期延长,且差异有统计学意义($P < 0.05$);哮喘宁和工艺 1,3 组的哮喘发作期均缩短,且差异有统计学意义($P < 0.05$);工艺 3 组的 IL-4 含量升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$);工艺 1,3 组的 IgE 升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与哮喘宁组相比,工艺 4 组的引喘潜伏期和哮喘发作期均提高,且差异有统计学意义($P < 0.05$),工艺 1,3 组的 IgE 升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示疏风定喘颗粒的工艺 2,4 优于工艺 1,3。

表 1 各组豚鼠引喘潜伏期、哮喘发作期及血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of asthma incubation period, asthma episodes period and contents of IL-4, TNF- α , IgE among groups($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	<i>n</i>	引喘潜伏期/s	哮喘发作期/s	IL-4/ng·L ⁻¹	TNF- α / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IgE/U·mL ⁻¹
空白	-	9	58.05 \pm 8.82	110.74 \pm 13.49	7.28 \pm 1.31	0.41 \pm 0.10	60.96 \pm 10.28
模型	-	10	30.82 \pm 6.20	56.47 \pm 12.90	18.75 \pm 2.23	1.31 \pm 0.19	252.26 \pm 18.19
氨茶碱	$0.05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	8	47.53 \pm 8.78 ²⁾	95.94 \pm 14.32 ²⁾	7.90 \pm 1.08 ²⁾	0.72 \pm 0.17 ²⁾	65.01 \pm 11.22 ²⁾
哮喘宁	$2.00 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	9	46.87 \pm 8.28 ²⁾	74.04 \pm 17.02 ^{2,3)}	8.32 \pm 1.56 ²⁾	0.67 \pm 0.16 ²⁾	74.93 \pm 9.68 ²⁾
工艺 1	$3.38 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	8	43.39 \pm 6.85 ²⁾	72.74 \pm 12.52 ^{2,3)}	9.48 \pm 1.97 ²⁾	0.72 \pm 0.14 ²⁾	95.28 \pm 9.68 ^{2,4,6)}
工艺 2	$1.45 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	9	48.42 \pm 7.23 ²⁾	85.87 \pm 10.73 ²⁾	8.64 \pm 1.57 ²⁾	0.67 \pm 0.13 ²⁾	75.94 \pm 10.60 ²⁾
工艺 3	$1.99 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	10	43.98 \pm 7.96 ²⁾	71.04 \pm 10.76 ^{2,3)}	9.81 \pm 1.59 ^{2,3)}	0.75 \pm 0.12 ²⁾	97.51 \pm 11.74 ^{2,4,6)}
工艺 4	$2.40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	10	55.38 \pm 6.82 ^{2,3,5)}	87.44 \pm 10.10 ^{2,5)}	8.28 \pm 1.70 ²⁾	0.66 \pm 0.16 ²⁾	74.15 \pm 12.80 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与氨茶碱组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与哮喘宁组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 工艺 2 和工艺 4 的组间比较 见表 2。结果发现疏风定喘颗粒工艺 2 和 4 制备的样品对豚鼠引喘潜伏期的影响具有显著性差异($P < 0.05$),而对豚鼠哮喘发作期及哮喘豚鼠血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量的影响无显著性差异。结合 3.1 项下的分析结果,说明工艺 4 优于工艺 2。

3.3 相关性分析^[10] 见表 3。结果发现 IL-4 与 TNF- α , TNF- α 与 IgE 之间呈较强的线性关系($|r| > 0.8, P < 0.05$);而哮喘潜伏期与哮喘发作期,IL-4, TNF- α 之间,哮喘发作期与 IgE 之间的相关性较弱($|r| < 0.3, P > 0.05$)。

4 讨论

疏风定喘颗粒是在中医理论指导下组方而成,本文以西医诊断治疗哮喘的临床依据为指标,研究疏风定喘颗粒的主体工艺路线。结果表明 4 个工艺组、氨茶碱组、哮喘宁组的豚鼠引喘潜伏期和哮喘发作期均显著高于模型组,哮喘豚鼠血清 IL-4, TNF- α 和 IgE 的含量均显著低于模型组,说明疏风定喘颗粒 4 个工艺组样品均可显著地延长哮喘发作期、降低哮喘豚鼠血清 IL-4, TNF- α 和 IgE 的含量。工艺 2 和工艺 4 样品可显著延长模型动物的哮喘发作期,其疗效优于哮喘宁,且与氨茶碱接近。将工艺 2 和

表 2 疏风定喘颗粒工艺 2 和 4 的组间比较

Table 2 Comparison between routing 2 and routing 4 groups of Shufeng Dingchuan granules

检测指标	方差方程的 Levene 检验		均值方程的 <i>t</i> 检验	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>P</i>
引喘潜伏期	0.075	0.787	-2.161	0.045
哮喘发作期	0.015	0.904	-0.329	0.746
IL-4 含量	0.123	0.730	0.474	0.642
TNF- α 含量	0.526	0.478	0.154	0.879
IgE 含量	0.161	0.694	0.329	0.746

表 3 引喘潜伏期,哮喘发作期,血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量的相关系数矩阵

Table 3 Correlation coefficient matrix between asthma incubation period, asthma episodes period, contents of IL-4, TNF- α and IgE

检测指标	参数	哮喘潜伏期	哮喘发作期	IL-4 含量	TNF- α 含量	IgE 含量
哮喘潜伏期	<i>r</i>	1	0.256	0.080	0.139	-0.498
	<i>P</i>	-	0.320	0.761	0.595	0.042
哮喘发作期	<i>r</i>	0.256	1	-0.778	-0.744	0.257
	<i>P</i>	0.320	-	0	0.001	0.319
IL-4 含量	<i>r</i>	0.080	-0.778	1	0.966	-0.689
	<i>P</i>	0.761	0	-	0	0.002
TNF- α 含量	<i>r</i>	0.139	-0.744	0.966	1.000	-0.734
	<i>P</i>	0.595	0.001	0	-	0.001
IgE 含量	<i>r</i>	-0.498	0.257	-0.689	-0.734	1
	<i>P</i>	0.042	0.319	0.002	0.001	-

注:*r*为相关系数。

工艺 4 样品的作用效果进行组间比较,结果与工艺 2 组比较,工艺 4 组可显著延长哮喘豚鼠的引喘潜伏期($P < 0.05$),故选择工艺 4 为主体工艺路线,即炙麻黄组水提醇沉,麻黄的平喘有效成分为麻黄碱,苦杏仁苷是苦杏仁止咳平喘的有效成分,而麻黄碱和苦杏仁苷多用水提法^[11-12],提取液再通过醇沉以除去淀粉等杂质;黄芩组醇提,黄芩、射干、款冬花、桑白皮中的黄酮类成分和前胡中的香豆素类成分均为对应药味发挥清热、祛痰、止咳、平喘的主要成分,而这类成分多用醇提法;地龙组水提,地龙中的蛋白质类成分是其发挥平喘的主要成分,且地龙水提固含物得率不高,本着经济的原则,故将地龙进行单独水提。再将各自浓缩液混合浓缩、干燥,制粒以制备疏风定喘颗粒。本文仅筛选了疏风定喘颗粒的主体工艺路线,其各工序的具体工艺参数有待进一步优化,以期哮喘患者提供疗效显著、使用安全、质量稳定的药品。

此外,本研究对豚鼠引喘潜伏期,哮喘发作期和血清 IL-4, TNF- α , IgE 含量 5 个指标之间进行了两两相关性分析,结果显示 IL-4 与 TNF- α , TNF- α 与 IgE 之间呈较强的线性关系。因此,后续可根据血清 IgE, IL-4 和 TNF- α 的测定结果及其趋势,掌握哮喘病情的变化及其发病程度;同时,深入研究指标之间的相关性可为后续研究过程中减少测定指标、提高工作效率提供依据。

【参考文献】

[1] 陈灏珠.实用内科学.下册[M].11版.北京:人民卫

生出版社,2001:1556.

[2] 梁景强,梁燕芳.支气管哮喘患者外周血 IL-18 mRNA 及 IgE 的表达及其意义[J].海南医学,2010,21(4):100-102.

[3] 朱振刚,刘贵颖,乔亚珍.哮喘灵对实验性哮喘模型豚鼠支气管肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞凋亡的影响[J].中草药,2008,39(8):1224-1226.

[4] Barrett N A, Austen K F. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation[J]. Immunity, 2009, 31(3):425-437.

[5] 梁秀云,蒙春华,莫诚航,等.支气管哮喘患者血清 IL-4、TNF- α 及 IgE 水平变化及临床意义[J].现代生物医学进展,2012,12(20):3864-3867.

[6] 杜发旺,罗晓斌,赵勇,等.瑞舒伐他汀对哮喘小鼠 TLR-4、TNF- α 、IFN- γ 、IL-5、IL-4 表达的影响及作用机制[J].临床医药文献杂志,2016,3(49):9688-9690.

[7] 刘贵颖,张慧琪,朱振刚,等.卵清蛋白致敏大鼠支气管哮喘模型的制备[J].临床肺科杂志,2013,18(7):1167-1169.

[8] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1380.

[9] 张雄飞,黄娟萍,罗裕,等.喘平方对哮喘豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF- β 1 及 TNF- α 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):172-175.

[10] 薛薇.SPSS 统计分析方法与应用[M].2版.北京:电子工业出版社,2009:238.

[11] 李俐,陈坚.麻黄碱和伪麻黄碱的提取工艺及分析[J].中国医药工业杂志,2003,34(4):202-205.

[12] 李强,陈锦屏.苦杏仁中苦杏仁甙的水提取工艺及其含量的测定[J].食品科学,2006,27(9):140-143.

【责任编辑 刘德文】