

基于大鼠过敏性哮喘模型的哮喘方主体工艺优选

康小东, 常秀娟, 胡晗绯, 周恩丽, 付娟, 王星星, 李森, 吴云, 萧伟*

(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:**通过大鼠过敏性哮喘模型药效试验优选哮喘方的主体工艺,为该复方的后续研究与开发提供参考。**方法:**以过敏性哮喘模型大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数,血清中白细胞介素-4(IL-4),IL-5, γ -干扰素(IFN- γ),免疫球蛋白E(IgE)水平及肺组织形态学变化等药效指标结合药材中指标成分的转移率对哮喘方4条主体工艺进行评价。**结果:**设计的4条主体工艺均有升高模型大鼠BALF中细胞总数及减轻肺部炎症和肺气肿的作用;与模型组相比,样品4组大鼠血清中IL-4,IFN- γ 和IgE水平具有极显著性差异($P < 0.01$),IL-5水平具有显著性差异($P < 0.05$);样品4中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱、升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷、五味子醇甲、马钱苷的转移率分别为58.97%,63.88%,60.26%和62.79%,在设计4条工艺路线中各指标成分转移率均最高。**结论:**在药效筛选试验及指标成分转移率评价中均以工艺路线4为最好,建议可将其作为哮喘方的主体工艺路线。

[关键词] 哮喘方; 药效试验; 提取工艺; 指标成分; 哮喘; 支气管肺泡灌洗液; 白细胞介素

[中图分类号] R22;R283.6;R285.5;R945;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0021-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040021

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1533.036.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:33

Optimization of Main Extraction Process of Xiaochuan Prescription Based on Allergic Asthma Model of Rats

KANG Xiao-dong, CHANG Xiu-juan, HU Han-fei, ZHOU En-li, FU Juan, WANG Xing-xing,
LI Miao, WU Yun, XIAO Wei*

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

[Abstract] **Objective:** To optimize the main extraction process of Xiaochuan prescription based on allergic asthma model of rats. **Method:** The total number of cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), levels of interleukin-4 (IL-4), IL-5, interferon- γ (IFN- γ), immunoglobulin E (IgE) in serum, morphological changes of lung tissue and other pharmacodynamics indexes on model rats combined with transfer rates of index components in medicinal materials were used as evaluating indicators for four extraction processes of Xiaochuan prescription. **Result:** The four main processes all can increase the total number of cells in BALF and reduce the role of lung inflammation and emphysema in the model rats; compared with the model group, the levels of IL-4, IFN- γ and IgE in the fourth process were significantly different ($P < 0.01$), and the level of IL-5 was significantly different ($P < 0.05$); the total transfer rate of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride was 58.97%, the total transfer rate of prim-O-glucosylcimifugin and 5-O-methylvisammioside was 63.88%, the transfer rate of schisandrin was 60.26% and transfer rate of loganin was 62.79% in the fourth

[收稿日期] 20170601(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 康小东, 中级工程师, 从事中药新药研究及制药新技术研究, E-mail: kxd830209@163.com

[通信作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel: 0518-81152367, E-mail: kanionlunwen@163.com

process; the fourth process had the highest transfer rates of all index components. **Conclusion:** The fourth process group is the best by evaluating in the efficacy screening test and transfer rates of index components, and it can be used as the main extraction process of Xiaochuan prescription.

[Key words] Xiaochuan prescription; pharmacodynamic test; extraction process; index component; asthma; bronchoalveolar lavage fluid; interleukin

过敏性哮喘是机体对抗原性或非抗原性刺激诱发的一种气管、支气管反应性过度增高的疾病,全世界患者约有 3 亿,广泛分布于各个地区、各个年龄段的人群中。由于其病因与发病机制较为复杂,迄今为止尚未完全阐明,近年来发病率呈上升趋势,已成为严重影响人类健康的疾病之一^[1]。我国过敏性哮喘的发病形势尤为严峻,根据 2013 年全球哮喘认知和管理(AIM)调查中的亚太地区结果显示,中国的哮喘急性发作比例居亚太地区首位,而 4 周内哮喘控制比例远远落后于亚太地区其他国家。

中医证候诊断标准认为咳嗽以夜间与清晨为甚,呈阵发性或短时间持续,不伴喘鸣、气急,无痰或少痰,多伴有咽喉不适感,舌淡红苔薄白,脉弦滑;而西医的诊断标准则参考 2009 年版《咳嗽的诊断与治疗指南》,认为慢性咳嗽常伴有明显的夜间刺激性咳嗽,支气管激发试验阳性,或呼气峰流速日间变异率 >20%,或支气管舒张试验阳性^[2]。对于本病的病因病机,中医在总体上认为主要是由夙根内伏于肺,复因外邪、饮食、情志、劳逸等因素引触致气滞痰阻、气道痉挛而发病^[3]。哮喘方为国医大师晁恩祥教授的临床经验方,由防风、紫苏叶、蜜麻黄、五味子、白果、苦杏仁等 9 味药材组成,具有疏风缓急利窍、肃肺平喘的功效,临床用于风邪伤肺、肃降失常、气道挛急致突发或反复发作过敏性哮喘的治疗,效果显著,本课题组拟将其开发为颗粒剂。

以各药味药效成分及理化性质设计 4 条主体工艺路线^[4-5],选择卵清蛋白(OVA)作为模型的应变原,同时辅以佐剂氢氧化铝对模型大鼠进行致敏和激发,建立过敏性哮喘大鼠模型,选取模型大鼠肺组织形态学变化,支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞数及血清白细胞介素-4(IL-4),IL-5, γ -干扰素(IFN- γ),免疫球蛋白 E(IgE)水平^[6-8]等能够反映哮喘模型变化的典型指标对 4 条主体工艺路线进行药效筛选。在实验设计时增加质量控制指标以确保整个研究过程的质量可控,依据组方药材的分组及其在方中君臣佐使的不同功能,选取君药防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总转移率,臣药蜜麻黄中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的总转移率,佐药五

味子中五味子醇甲和山萸肉中马钱苷的转移率作为质量控制指标,其中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱具有明确的平喘作用^[9]。本实验采用 HPLC 测定指标成分的含量,计算各成分的转移率,并结合药效试验模型对主体工艺进行综合评价。

1 材料

7160 型全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术公司),403C 型压缩空气式雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司),Countess™ 型自动细胞计数仪(美国 Invitrogen 公司),1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),XP6 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

防风(批号 1410024,升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷质量分数总和 0.28%),紫苏叶(批号 1410027),辛夷(批号 1410015),蜜麻黄(批号 1410020,盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱质量分数总和 0.98%),苦杏仁(批号 1410018),五味子(批号 1410013,五味子醇甲质量分数 0.54%),山萸肉(批号 1410022,马钱苷质量分数 0.75%),白果(批号 1410019)和紫菀(批号 1410016)饮片均购自亳州市宏大中药饮片科技有限公司,由江苏康缘药业股份有限公司吴舟执业药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关要求;哮喘方 4 条主体工艺路线样品(江苏康缘药业股份有限公司,批号分别为 20141101,20141102,20141103,20141104),醋酸地塞米松片(辰欣药业股份有限公司,批号 130125201,规格 0.75 mg/片),卵白蛋白(美国 Sigma,货号 A55030);升麻素苷,5-O-甲基维斯阿米醇苷,盐酸麻黄碱,盐酸伪麻黄碱,五味子醇甲和马钱苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111522-201209,111523-201208,171241-201007,171237-201208,110857-201412,110640-201005,纯度依次为 93.7%,96.4%,99.7%,99.9%,99.4%,99.2%);免疫球蛋白 E(IgE),白细胞介素-4(IL-4),IL-5 和 γ -干扰素(IFN- γ)试剂盒(北京华英生物技术研究所,批号分别为 20150410,20150420,20150310,20150432)。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180 ~ 220 g,购自上

海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2013-0016。动物饲养于标准条件下,12 h 明暗交替,温度(22 ± 2) °C,自由摄食饮水。动物在上述环境中适应性饲养 1 周后开始实验。本文涉及的动物实验均符合实验动物福利和动物实验的伦理性要求。

2 方法与结果

2.1 受试药样品的制备 按哮喘方临床 20 个日服用生药量平行称取药材 4 份,每份共 1.48 kg,分别按以下 4 条工艺路线制备受试药。

2.1.1 样品 1 按照哮喘方临床应用对全方进行水提取,加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,提取液减压浓缩成浸膏后减压干燥得样品 1,折合生药量(浸膏/生药,下同)0.259 g·g⁻¹,批号 20141101。

2.1.2 样品 2 防风、蜜麻黄等药材加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,水提取液减压浓缩成浸膏后备用;山萸肉、白果等药材加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,醇提取液浓缩成浸膏后与水提取液浓缩浸膏合并,经减压干燥得样品 2,折合生药量 0.220 g·g⁻¹,批号 20141102。

2.1.3 样品 3 防风、蜜麻黄等药材加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,水提取液经减压浓缩成相对密度 1.10 ~ 1.15(50 °C)的浸膏,加 95% 乙醇至含醇量达 60%,静置 24 h,取上清液备用;山萸肉、白果等药材加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,醇提取液与醇沉上清液合并浓缩,稠膏经减压干燥后得样品 3,折合生药量计算 0.177 g·g⁻¹,批号 20141103。

2.1.4 样品 4 紫苏叶、辛夷加 10 倍量水进行水蒸气蒸馏提取挥发油,挥发油包合后备用;药渣与防风、蜜麻黄等药材合并后加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,水提取液经减压浓缩成相对密度 1.10 ~ 1.15(50 °C)的浸膏,加 95% 乙醇至含醇量达 60%,静置 24 h,取上清液备用;山萸肉、白果等药材加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,醇提取液与醇沉上清液合并浓缩,稠膏经减压干燥、粉碎后与挥发油包合物混合均匀,得样品 4,折合生药量计算质量分数为 0.188 g·g⁻¹,批号 20141104。

2.2 大鼠过敏性哮喘模型建立 哮喘模型组大鼠在第 1 天和第 7 天每只腹腔内注射抗原混悬液[取卵清蛋白(OVA)1 mg 和氢氧化铝 10 g 溶于 1 mL 生理盐水中配成混悬液]致敏^[10-11]。第 14 天开始用 1% OVA 超声雾化吸入而激发,每 2 d 进行 1 次,每次 30 min,共 2 周。正常组大鼠于第 1 天和第 7 天

腹腔内注射生理盐水 1 mL,第 14 天开始用生理盐水超声雾化吸入,每 2 d 进行 1 次,每次 30 min,共 2 周。醋酸地塞米松片组大鼠从第 14 天开始灌胃给药(质量浓度 0.081 g·L⁻¹,给药量 0.81 mg·kg⁻¹),共 2 周。哮喘方 4 组大鼠从第 14 天开始灌胃给药,给药量均为 7 g·kg⁻¹(以生药量计),共 2 周。

2.3 取材及指标检测

2.3.1 血清 IL-4,IL-5,IFN-γ 和 IgE 水平 各组大鼠最后 1 次激发 24 h 后,每只大鼠以 10% 水合氯醛按 35 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉后腹主动脉取血,置于 4 °C,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清^[12-13]。

2.3.2 BALF 中细胞总数的测定 各组大鼠最后 1 次激发 1 h,每只大鼠以 10% 水合氯醛按 35 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉后腹主动脉取血致死。消毒并打开胸腔,结扎右侧主支气管,用气管插管针插入气管,固定后行左侧肺肺泡灌洗术。缓慢注入生理盐水 5 mL,停留 10 s,缓慢回抽,重复 3 次;回收液(生理盐水灌洗肺泡后的灌洗液)约 4 mL。回收液立即注入离心管,作细胞计数^[14]。

2.3.3 肺组织病理观察 各组大鼠最后 1 次激发 1 h 后处死大鼠,取右肺中叶置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,电镜下观察支气管肺组织的病理特征^[15]。

2.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素多水平方差分析,组间 *t* 检验。

2.5 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量测定

2.5.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(0.05% 三乙胺)(4:96),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.5.2 对照品溶液的制备 取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品适量,精密称定,加水制成每 1 mL 含盐酸麻黄碱 25 μg 和盐酸伪麻黄碱 10 μg 的混合溶液,即得。

2.5.3 线性关系考察 精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品适量,加水制成混合对照品溶液(盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱质量浓度分别为 161.53,54.925 mg·L⁻¹)。分别吸取 0.1,0.2,0.5,1.0,1.5,2.0 mL 置于 5 mL 量瓶中,加水稀释并定容至刻度,摇匀,得 6 个混合对照品溶液,按 2.5.1 项下色谱条件测定,以峰面积平均值为纵坐标,质量浓度为横坐标,得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱回归方程分别为 $Y = 0.325 2X - 0.080 6$ ($r = 1.000$), $Y =$

0.323 3X - 0.085 ($r = 0.999 9$), 线性范围分别为 3.230 6 ~ 64.612, 1.098 5 ~ 21.970 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5.4 供试品溶液的制备 称取各工艺组样品 2.0 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.6 升麻素苷、马钱苷、五味子醇甲和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量测定

2.6.1 色谱条件 采用 Kromasil 100-3.5 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 25% A; 5 ~ 25 min, 25% ~ 56% A; 25 ~ 30 min, 56% ~ 80% A; 30 ~ 36 min, 80% ~ 100% A), 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 马钱苷检测波长 240 nm, 升麻素苷、五味子醇甲和 5-O-甲基维斯阿米醇苷检测波长均为 250 nm, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取适量升麻素苷, 5-O-甲基维斯阿米醇苷, 马钱苷和五味子醇甲对照品, 加 50% 甲醇制成质量浓度分别为 20, 20, 30, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.6.3 线性关系考察 精密称取马钱苷, 升麻素苷, 5-O-甲基维斯阿米醇苷和五味子醇甲对照品适

量, 加 50% 甲醇制成质量浓度分别为 304.68, 187.53, 210.43, 441.11 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。分别精密吸取 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 于 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得系列混合对照品溶液。按 2.6.1 项下色谱条件测定, 以峰面积平均值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程分别为 $Y = 7.783 5X + 0.414 5$ ($r = 1.000$), $Y = 10.022X + 0.603 2$ ($r = 1.000$), $Y = 11.367X + 0.662 4$ ($r = 0.999 9$), $Y = 10.016X + 1.747 4$ ($r = 1.000$), 线性范围分别为 6.09 ~ 121.87, 3.75 ~ 75.01, 4.21 ~ 84.17, 8.82 ~ 176.44 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.4 供试品溶液的制备 取各工艺组样品 1 g, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.7 大鼠 BALF 中细胞总数 见表 1。结果表明与正常组相比, 模型组大鼠 BALF 中细胞总数明显降低; 与模型组比较, 哮喘方 4 条工艺路线均有升高 BALF 细胞总数的作用, 其效果按照从高到低的顺序依次为样品 2 > 样品 4 > 样品 3 > 样品 1, 各组与模型组比较均差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 哮喘方不同工艺对 BALF 中细胞总数及血清 IL-4, IL-5, IFN- γ , IgE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of different processes of Xiaochuan prescription on total number of cells in BALF, levels of IL-4, IL-5, IFN- γ and IgE in serum ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	BALF 细胞总数 ($\times 10^5$)/个	IL-4 / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-5 / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IFN- γ / $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	IgE /IU $\cdot\text{mL}^{-1}$
正常	-	4.18 \pm 1.69	7.74 \pm 1.35	20.01 \pm 3.47	40.62 \pm 2.53	2.48 \pm 0.66
模型	-	2.41 \pm 0.75 ¹⁾	9.87 \pm 0.84 ²⁾	28.93 \pm 3.67 ²⁾	30.02 \pm 3.86 ²⁾	5.42 \pm 1.68 ²⁾
醋酸地塞米松	0.81 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	27.89 \pm 2.18 ⁴⁾	7.81 \pm 1.23 ⁴⁾	21.58 \pm 3.58 ⁴⁾	38.37 \pm 3.51 ⁴⁾	2.28 \pm 0.63 ⁴⁾
样品 1	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	3.79 \pm 1.34 ³⁾	8.14 \pm 1.07 ³⁾	24.37 \pm 5.08	35.73 \pm 4.88	3.1 \pm 1.12 ⁴⁾
样品 2	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6.32 \pm 5.28 ³⁾	8.98 \pm 1.00	23.63 \pm 5.89	32.39 \pm 6.01	3.95 \pm 1.64
样品 3	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5.45 \pm 4.37 ³⁾	8.33 \pm 1.05 ³⁾	25.67 \pm 4.83	33.79 \pm 5.13	3.98 \pm 1.62
样品 4	7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5.75 \pm 1.59 ³⁾	7.85 \pm 1.11 ⁴⁾	23.12 \pm 3.35 ³⁾	37.64 \pm 3.68 ⁴⁾	2.98 \pm 0.93 ⁴⁾

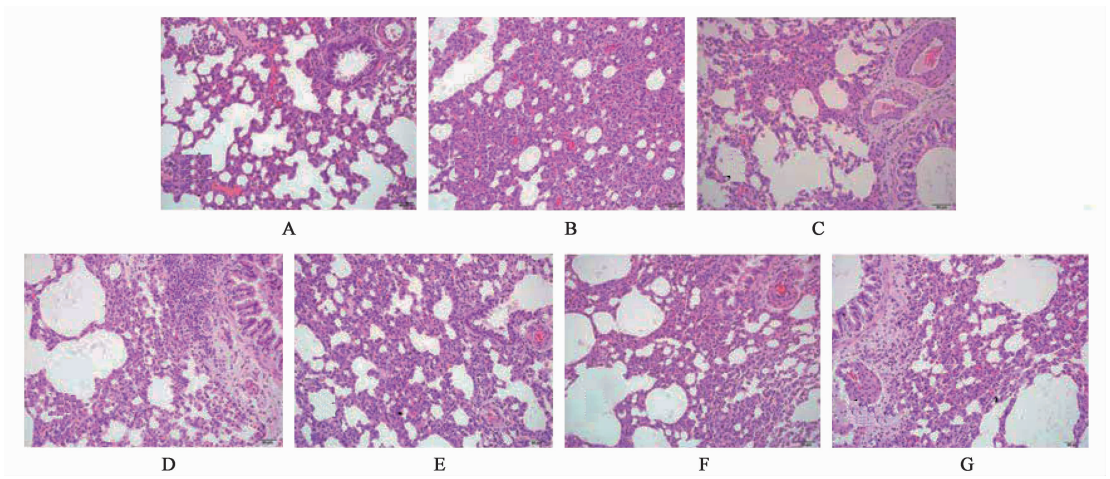
注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

2.8 血清中 IL-4, IL-5, IFN- γ , IgE 水平 见表 1。结果表明与正常组相比, 模型组大鼠血清中 IL-4, IL-5, IFN- γ , IgE 水平均有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 哮喘方工艺路线 1 血清中 IL-4, IgE 水平具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 工艺路线 3 血清中 IL-4 水平有显著性差异 ($P < 0.05$), 工艺路线 4 血清中 IL-4, IL-5, IFN- γ 和 IgE 水平具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.9 肺组织形态学变化 肺组织形态学病理切片见图 1。结果发现正常组大鼠的肺组织及支气管周

围无明显炎细胞浸润, 管壁正常, 肺泡形态规则; 模型组大鼠肺组织肺泡壁和间质充血, 并有炎性细胞浸润, 肺泡腔内无渗出物, 肺组织明显肺气肿, 肺泡壁变薄, 肺泡腔增大, 肺泡有明显的融合现象; 醋酸地塞米松组和哮喘方不同工艺组大鼠支气管及肺组织炎性细胞浸润和肺气肿现象减少, 说明醋酸地塞米松组和哮喘方不同工艺组应用于模型组后有减轻肺部炎症和肺气肿的作用。

2.10 指标成分转移率 按公式转移率 = 样品中质量/药材中质量 $\times 100\%$ 计算, 见表 2。结果盐酸麻



A. 正常组; B. 模型组; C. 醋酸地塞米松组; D. 样品 1 组; E. 样品 2 组; F. 样品 3 组; G. 样品 4 组

图 1 肺组织形态学变化病理切片对比 (HE, ×200)

Fig. 1 Comparison of pathological sections on morphological changes of lung tissue (HE, ×200)

黄碱与盐酸伪麻黄碱的总和及升麻素苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷的总和这 4 种指标成分在 4 条工艺路线中的转移率无明显差别, 其中以样品 4 中转移率最高; 样品 2, 3, 4 中马钱苷和五味子醇甲的转移

率明显高于样品 1, 说明将全方药材分为醇提组与水提组并选择 70% 乙醇为醇提组溶媒时, 可有效提高这 2 种有效成分的转移率, 其中样品 4 中转移率最高。

表 2 哮喘方不同工艺路线样品中指标成分质量分数及转移率

Table 2 Contents and transfer rates of index components in Xiaochuan prescription extracted by different processes

组别	盐酸麻黄碱 + 盐酸伪麻黄碱		升麻素苷 + 5-O-甲基维斯阿米醇苷		马钱苷		五味子醇甲	
	质量分数 /mg·g ⁻¹	转移率 /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	转移率 /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	转移率 /%	质量分数 /mg·g ⁻¹	转移率 /%
样品 1	2.190	56.95	1.130	60.24	1.623	51.23	1.423	52.51
样品 2	2.503	55.18	1.316	59.48	2.317	62.00	1.917	59.98
样品 3	3.079	54.55	1.660	60.29	2.854	61.38	2.354	59.19
样品 4	3.121	58.97	1.649	63.88	2.694	62.79	2.247	60.26

药效筛选结果表明, 设计的哮喘方 4 条主体工艺路线均能显著提高模型大鼠 BALF 细胞总数 ($P < 0.05$); 4 条主体工艺在肺组织形态学变化试验中都具有减轻肺部炎症和肺气肿的作用; 另外, 与模型组比较, 样品 4 组大鼠血清中 IL-4, IFN- γ 和 IgE 水平具有极显著性差异 ($P < 0.01$), IL-5 水平具有显著性差异 ($P < 0.05$), 其结果明显优于其他 3 条工艺路线。在指标成分转移率评价中, 样品 4 中各指标成分的转移率均最高, 结合药效筛选与指标成分转移率结果, 建议选择工艺路线 4 作为哮喘方的主体工艺路线。

3 讨论

过敏性哮喘模型常用的动物有豚鼠、小鼠、大鼠等, 通过不同的方法都能够建立哮喘模型。豚鼠个体差异性较大, 相同处理条件下可能出现不同的反

应; 而小鼠具有体积较小, 操作、取材不方便, 技术难度较高等缺点。采用 SD 大鼠建立的过敏性哮喘模型与人类哮喘有诸多类似之处, 能产生与人类哮喘相似的速发相及迟发相变态反应, 在各种哮喘模型中的应用越来越广, 因此本文采用来源广泛、品系纯正、对抗原反应较为一致的 SD 大鼠作为过敏性哮喘模型的实验用动物。在模型应变原选择方面, 本文选用常用的免疫性强、价格低廉、来源广泛的 OVA 作为应变原, 同时辅以佐剂氢氧化铝对模型大鼠进行致敏和激发, 建立过敏性哮喘大鼠模型, 并以模型大鼠肺组织形态学变化, BALF 中细胞总数及血清 IL-4, IL-5, IFN- γ , IgE 水平等能够反映哮喘模型变化的典型指标对药效筛选结果进行评价。选用的过敏性哮喘模型较为经典, 技术及方法成熟、稳定, 故而能够很好地对哮喘方主体工艺进行评价。

哮喘方共9味药材,化学成分复杂,作用机制尚不明确,本研究采用药效试验对4条主体工艺进行筛选,同时对选用的5种指标成分的转移率进行测定,以药效结果结合有效成分的转移率对哮喘方主体工艺进行评价,避免了采用单一的多指标成分含量及出膏率对中药质量进行评价不能很好地反映药效结果的弊端,在保证获得最佳药效的同时,具有质量可控性,结果显示4条主体工艺路线对过敏性哮喘都有一定程度的缓解作用,其中工艺路线4效果最佳,因此建议将工艺路线4作为哮喘方的主体工艺路线。本文通过药效筛选试验确定主体工艺路线,在后续的研究中将采用单因素试验、正交试验等经典方法对具体的工艺参数进行考察,以升麻素苷、马钱苷、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱等多种指标性成分的转移率、出膏率等为指标对制备工艺参数进行优化。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(2008)[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2011, 18(12): 28-36.

[2] 符子艺, 戴勇, 魏成功, 等. 中西医结合治疗咳嗽变异性哮喘疗效观察[J]. 实用中医药杂志, 2015, 31(4): 294-295.

[3] 熊婵, 何成诗, 王艳琼, 等. 中医临床治疗过敏性哮喘研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(5): 74-75.

[4] 荆鲁, 王停, 周刚. 中药复方优化研究的现状及思考[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(9): 1010-1013.

[5] 周刚. 中药复方新药研发中工艺研究需关注的问题[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(16): 1865-1867.

[6] 乔明, 刘兰英, 王和生. 慢性过敏性哮喘大鼠模型的建立与评价[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(1): 79-82.

[7] 崔殿波, 王艳宏. 过敏性哮喘的实验研究进展[J]. 哈尔滨医药, 2014, 34(4): 317-318.

[8] 张红, 顾猛. 过敏性哮喘患儿血浆 IFN- γ 与 IL-4 及粪便双歧杆菌检测及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(3): 367-368.

[9] 刘赓, 石倩, 杨洋, 等. 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果及机制比较研究[J]. 中草药, 2009, 40(5): 771-774.

[10] 胡琦, 钟世民, 汪金玉, 等. 皮下注射大剂量卵白蛋白诱导小鼠哮喘免疫耐受模型的建立及机制初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(12): 1404-1409.

[11] 米慧娟, 王永香, 王秀海, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 7-10.

[12] 孙必强, 周英, 刘卫东, 等. 不同剂型七味白术散对肠道菌群失调腹泻小鼠小肠黏膜上皮 IL-4, IL-10, IFN- α mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 84-88.

[13] 李锦亮, 韩文宁, 楚艳艳, 等. 丙酸氟替卡松联合孟鲁司特对咳嗽变异性哮喘患儿 IKL-4、IL-5 及 IgE 水平的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(2): 117-118.

[14] 陈海涛, 朱涛, 刘美, 等. 牛蒡子苷元抗哮喘小鼠气道炎症作用及机理研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 39-43.

[15] 刘亚尊, 虞坚尔, 徐万超, 等. 平喘方及拆方对哮喘模型小鼠肺组织病理及 TSLP 与 IL-6 水平的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2017, 31(2): 62-65.

[责任编辑 刘德文]