

小青龙汤化学成分分析及其对慢性阻塞性肺疾病急性发作期小鼠的作用

陈科伶¹, 付正丰², 黄青松¹, 高培阳³, 张传涛^{1*}, 方应权², 赵科妮¹, 杨洪静¹, 范刚⁴, 肖玮¹

(1. 成都中医药大学附属医院呼吸科, 四川 成都 610072; 2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 万州 404120; 3. 成都中医药大学附属医院重症监护室, 四川 成都 610072; 4. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 分析小青龙汤的化学成分, 观察小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病急性发作期 (AECOPD) 小鼠的作用。**方法** 采用高效液相色谱法分析小青龙汤的化学成分。采用“烟雾+肺炎克雷伯菌”复制 AECOPD 模型, 设空白组、模型组、小青龙汤组 (12.6 g/kg)、克拉霉素组 (70 mg/kg), 给药干预后, 通过肺功能测试仪检测小鼠肺功能吸气峰流量 (PIF)、呼气峰流量 (PEF)、每分钟通气量 (MV), HE 染色观察小鼠肺组织病理变化, ELISA 法观察小鼠血清炎症因子 COX-2、IL-6、TNF- α 水平。**结果** 小青龙汤化学成分为芍药苷、甘草苷、桂皮醛、甘草酸和五味子醇甲。与空白组比较, 模型组小鼠出现支气管上皮细胞脱落, 肺动脉壁增厚, 肺泡扩张、破裂和融合以及炎性细胞浸润等典型病变, 血清 COX-2、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 小青龙汤组和克拉霉素组小鼠 AECOPD 典型病理特征均得到缓解, 肺泡间隔的破坏减少, 肺泡保留了相对正常的结构, AECOPD 小鼠肺功能 PEF、PIF 和 MV 得到改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清 COX-2、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 小青龙汤可以有效治疗 AECOPD, 其作用机制可能与抑制炎症反应有关。

关键词: 小青龙汤; 慢性阻塞性肺疾病急性发作期 (AECOPD); 高效液相色谱; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-4037-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.051

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种常见的以持续性呼吸道症状和气流受限为特征的可以预防和治疗的疾病, 该病不仅会导致患者生活质量降低, 还会导致骨骼肌退化, 加重缺血性心脏病、心衰、骨质疏松、贫血、糖尿病、代谢综合征等。COPD 是全球发病率和死亡率最高的疾病之一, 仅 2015 年全球该病死亡人数有 320 万, 比较 1990 年增加了 11.6%^[1], 由于持续危险因素暴露和人口老龄化, 预计 2030 年将成为全国第 7 大疾病负担^[2-4], 成为全球重大公共健康卫生挑战。

中医药治疗呼吸系统疾病具有悠久的历史, 积累了丰富的经验。小青龙汤源自《伤寒论》, 治疗咳嗽、咯痰、喘息等症状有良好疗效^[5-7], 国内学者对小青龙汤有效物质基础、作用机制开展研究, 鉴定了小青龙汤的部分重要单体^[8-9], 但其成分及作用机制较为复杂, 仍需要进一步研

究。本研究拟通过高效液相色谱 (HPLC) 法初步揭示小青龙汤的重要活性成分, 并从环氧化酶-2 (COX-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 等炎症因子角度揭示小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病急性发作期 (AECOPD) 小鼠的作用机制。

1 材料

1.1 动物 32 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 体质量 (20 \pm 2) g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (川) 2015-030。

1.2 药物 小青龙汤由蜜麻黄 10 g、桂枝 10 g、赤芍 10 g、五味子 15 g、干姜 10 g、细辛 6 g、法半夏 15 g、蜜甘草 10 g 组成, 购自成都中医药大学附属医院, 由成都中医药大学范刚副教授鉴定为正品, 药材加水煎煮提取, 制成干粉 (每 1 g 药粉相当于 5 g 生药), 冷冻保存备用, 根据人

收稿日期: 2021-05-02

基金项目: 全国中医药创新骨干人才培养项目 (国中医药办人教函 [2019] 91 号); 四川省科技计划项目 (2020JDRC0114, 2020YFH0164); 成都中医药大学“杏林学者”人才计划 (XSGG2019016, XGZX2003, JSZX005); 成都中医药大学附属医院科技发展基金 (18ZL05, 19SX01, 19YY10, 19LW11); 成都中医药大学附属医院“百人计划”人才项目 (院办发 [2020] 42)

作者简介: 陈科伶 (1981—), 女, 主治医师, 研究方向为呼吸与老年病研究。Tel: 13982228521, E-mail: 1079767304@qq.com

* **通信作者:** 张传涛 (1981—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向为呼吸与老年病研究。Tel: 18908046008, E-mail: zct801012@126.com

与小鼠给药剂量换算,小青龙汤的剂量为12.6 g/kg。

1.3 试剂 甘草酸铵、桂皮醛(批号0731-9704、110710-201016,纯度大于98%)对照品购自中国食品药品检定研究院;甘草苷(批号G-009-121124,纯度大于98%)对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司;芍药苷(批号wkq16062205,纯度大于98%)对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司;细辛脂素、五味子醇甲(批号PS0611-0020、PS0373-0025,纯度大于98%)对照品购自成都普思生物科技股份有限公司。COX-2、IL-6、TNF- α ELISA试剂盒(货号ZC-38249、ZC-37988、ZC-39024,上海茁彩生物科技有限公司)。

1.4 仪器 Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Multiskan Mk3型酶标仪(美国赛默飞世尔公司);DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);AniRes 2005型动物肺功能测试仪(北京贝兰博科技有限公司)。

2 方法

2.1 小青龙汤化学成分分析

2.1.1 供试品溶液制备 取小青龙汤干燥药粉约500 mg,加入50%甲醇30 mL,称定质量,超声处理30 min,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,滤过,经0.45 μ m微孔滤膜过滤,即得。

2.1.2 对照品溶液制备 取甘草酸铵、甘草苷、芍药苷、五味子醇甲、桂皮醛对照品适量,精密称定,加甲醇制成0.2 mg/mL的混合对照品溶液,即得。

2.1.3 色谱条件 Inertsil[®] ODS-3 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相0.2%磷酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~15% B; 10~20 min, 15%~35% B; 20~28 min, 35%~40% B; 28~35 min, 40% B; 35~45 min, 40%~50% B; 45~55 min, 50%~70% B; 55~65 min, 70%~90% B);体积流量1.0 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长230 nm;进样量10 μ L。

2.2 小青龙汤对AECOPD小鼠的干预作用

2.2.1 造模 小鼠鼻内滴注0.1 mL肺炎克雷伯菌(6×10^8 cfu/mL),每天1次,1周给予5 d,连续8周,接着置于体积约70 cm \times 50 cm \times 30 cm的密闭木箱中吸烟约30 min,每天2次,每次燃烧10根烟^[10],连续8周。

2.2.2 分组及给药 小鼠按“2.2.1”项下方法造模后,随机分为模型组、小青龙汤组(12.6 g/kg)、克拉霉素组(70 mg/kg),另取正常小鼠为空白组,每组8只。小青龙汤组和克拉霉素组灌胃给予相应剂量药物,空白组和模型组灌胃给予等量生理盐水,连续给药2周。

2.2.3 小鼠肺功能检测 末次给药24 h后,将小鼠放在动物肺功能测试仪盒子中,连接传感器和电脑,适应5 min后检测肺功能,包括呼气峰流量(PEF)、吸气峰流量(PIF)和分钟容积(MV)。

2.2.4 HE染色观察肺组织病理变化 肺功能检测完毕后,取小鼠肺叶,10%甲醛溶液固定,常规脱水、石蜡、包埋、

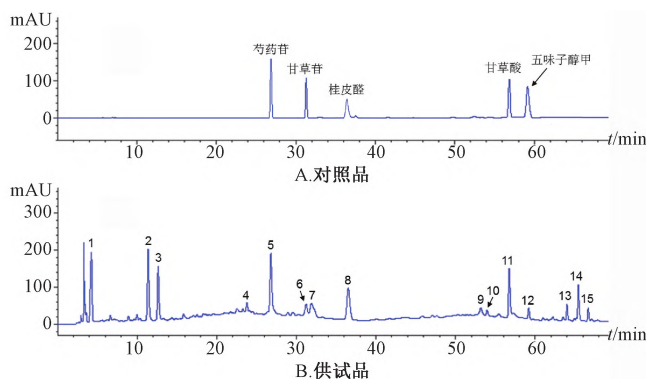
切片,HE染色后于400倍光镜下观察。

2.2.5 ELISA法检测血清炎症性细胞因子水平 肺功能检测完毕后,取小鼠静脉血,离心后取血清,按照试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪于450 nm波长处检测吸光度,计算血清COX-2、IL-6、TNF- α 水平。

2.2.6 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立t检验或方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小青龙汤化学成分分析 通过HPLC检测,发现小青龙汤主要有15个色谱峰,其中5号峰为芍药苷、6号峰为甘草苷、8号峰为桂皮醛、11号峰为甘草酸、12号峰为五味子醇甲,见图1。现代研究表明,芍药苷为赤芍药材的主要活性成分,甘草苷和甘草酸为甘草药材的活性成分,五味子醇甲为五味子药材的主要活性成分,而桂皮醛为桂枝药材的特征成分。因此,这些成分可能为小青龙汤治疗AECOPD的有效成分。



5. 芍药苷 6. 甘草苷 8. 桂皮醛 11. 甘草酸 12. 五味子醇甲

图1 小青龙汤 HPLC 色图

3.2 小青龙汤对AECOPD小鼠肺功能的影响 与空白组比较,模型组小鼠PEF、PIF和MV降低($P<0.01$);与模型组比较,小青龙汤组和克拉霉素组小鼠PEF、PIF和MV升高($P<0.05$, $P<0.01$),见表1。

表1 各组小鼠肺功能比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/ 只	PIF/ (mL \cdot s ⁻¹)	PEF/ (mL \cdot s ⁻¹)	MV/ (mL \cdot s ⁻¹)
空白组	8	5.20 \pm 0.62	3.23 \pm 0.17	39.27 \pm 1.24
模型组	6	2.63 \pm 0.78**	1.73 \pm 0.09**	27.15 \pm 1.66**
小青龙汤组	7	4.68 \pm 0.56##	2.73 \pm 0.09##	32.83 \pm 1.34##
克拉霉素组	7	4.14 \pm 0.40#	2.55 \pm 0.06##	31.83 \pm 1.12##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.3 小青龙汤对AECOPD小鼠肺组织病理损伤的影响 如图2所示,与空白组比较,在模型组小鼠中观察到支气管上皮细胞脱落,上皮细胞核破裂,肺动脉壁增厚,肺泡扩张、破裂和融合以及炎性细胞浸润。小青龙汤和克拉霉素可以缓解AECOPD的典型病理特征,在小青龙汤和克拉霉素组小鼠肺组织中可见少量炎症细胞浸润,肺泡间隔的

破坏减少,肺泡保留了相对正常的结构。

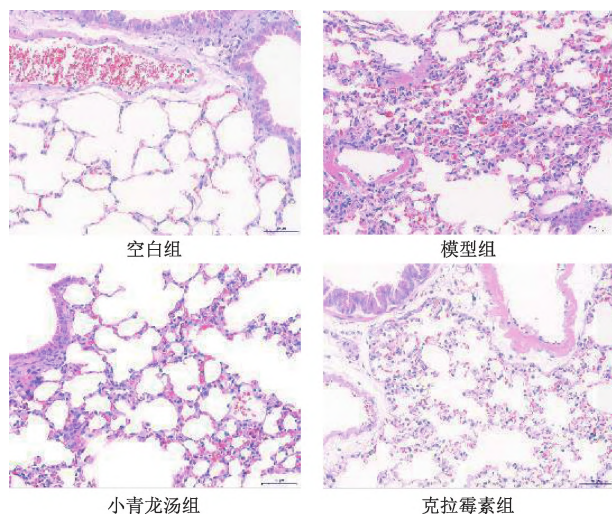


图2 各组小鼠肺组织 HE 染色 (×400)

3.4 小青龙汤对 AECOPD 小鼠炎性细胞因子水平的影 响 如表 2 所示,与空白组比较,模型组小鼠血清 COX-2、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,小青龙汤组和克拉霉素组小鼠血清 COX-2、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 各组小鼠血清炎性因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/ 只	COX-2/ (ng·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)
空白组	8	21.37±1.02	22.64±1.38	115.05±14.33
模型组	6	32.00±2.82**	28.19±1.45**	147.65±13.09**
小青龙汤组	7	25.08±2.02##	24.12±1.43#	117.96±7.35##
克拉霉素组	7	23.89±1.53##	24.32±1.10#	125.66±7.70#

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

4 讨论

COPD 是以气流不可逆受限为特征的慢性气道炎症疾病,持续的炎症损伤与异常修复,从而造成气道重塑,导致不可逆性气流受限,炎症是该病发病的核心机制,也是其反复发作的病理基础,更是导致疾病进展恶化、肺功能持续下降的根本原因。炎性细胞因子的异常表达是导致持续炎症的直接因素,IL-6、TNF- α 、COX-2 等水平对 COPD 病情发展及预后具有影响。IL-6 能够激活中性粒细胞,诱导 B 细胞活化,导致患者小气道和肺泡组织结构功能异常,外周血中 IL-6 水平与慢阻肺严重程度、死亡率及肺功能下降等显著相关,是 COPD 患者病情及预后的重要参考^[11]。TNF- α 能够加速炎症因子释放,与 IL-6 之间可通过级联反应导致多种炎症因子升高,加速炎症发生发展,参与患者气道急性炎症反应发生及发展^[12],TNF- α 与 COPD 患者肺功能呈负相关^[13]。COX-2 是由炎症介质或细胞因子刺激而产生,参与了 COPD 的慢性炎症过程,并可能是加重气流阻塞程度的因素之一^[14-16]。

小青龙汤具有解表散寒、温肺化饮功效,是治疗慢性支气管炎、支气管哮喘等呼吸系统疾病的名方。现代药理

研究证实,小青龙汤主要成分具有抑制支气管平滑肌增殖^[17]、广谱抗菌^[18]、抗病毒^[19]、止咳平喘^[20-21]等作用,可有效治疗 COPD,还可以提高西药治疗 COPD 的临床疗效^[22-23]。但是对于小青龙汤的活性成分及作用机制仍不明确,因此,本研究首先借助高效液相色谱法初步确定了芍药苷、甘草苷、桂皮醛、甘草酸、五味子醇甲为小青龙汤重要组成成分。COPD 急性发作期多是由感染、理化因素等原因导致病情急性加重,出现咳、痰、喘等加重超过日常^[24]。本研究采用“烟雾+肺炎克雷伯菌”法进行造模,发现小鼠出现支气管上皮细胞脱落,肺动脉壁增厚,肺泡扩张、破裂和融合以及炎性细胞浸润等典型病变,证实造模成功。小青龙汤可以缓解小鼠 AECOPD 典型病理特征,改善小鼠肺功能 (PEF、PIF、MV),降低小鼠血清炎症因子 (COX-2、IL-6、TNF- α) 水平,初步证实小青龙汤可以有效治疗 AECOPD,这与调控小鼠炎症反应有关。

参考文献:

- [1] GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. *Lancet Respir Med*, 2017, 5(9): 691-706.
- [2] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [3] Yang G H, Wang Y, Zeng Y X, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 381 (9882): 1987-2015.
- [4] Mathers C D, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. *PLoS Med*, 2006, 3 (11): e442.
- [5] 李兴才. 小青龙汤治疗哮喘急性发作临床观察[J]. *新中医*, 2014, 46(11): 79-81.
- [6] 刘健芳, 陈达宏, 李发茂. 小青龙汤治疗风寒袭肺型急性咳嗽 32 例临床分析[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(34): 103-104.
- [7] 吴建军, 李欣, 秦阳, 等. 小青龙汤在慢性阻塞性肺疾病中的应用[J]. *中医杂志*, 2016, 57(22): 1925-1928.
- [8] 李思洋, 朱芝娴, 董杰. 小青龙汤治疗咳嗽的有效成分预测[J]. *世界科学技术 (中医药现代化)*, 2018, 20(2): 239-246.
- [9] 范荣荣, 罗子清, 唐丽娟, 等. 基于网络药理学的小青龙汤治疗支气管哮喘作用机制分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(1): 52-59.
- [10] Li J S, Li Y, Lu X F, et al. Dynamic characteristics of sequential acute exacerbations and risk windows in AECOPD rats induced by cigarette-smoke and exposure to *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41 (10):

- 1543-1553.
- [11] 王化强, 吕沈源. 慢性阻塞性肺病患者血清 IL-6 与 FEV1 相关性研究[J]. 中国医药科学, 2011, 1(11): 114-115.
- [12] 杜海莲, 岳红梅. 慢性阻塞性肺病患者血清 IL-17、IL-6、IL-8、CRP、TNF- α 的变化及其相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(9): 95-97.
- [13] 张淑利. 慢性阻塞性肺病患者 PCT、hs-CRP 及 TNF- α 表达水平与肺功能的相关性研究[J]. 世界临床医学, 2016(18): 25.
- [14] 邓礼洪. 乌司他丁对重症肺炎患者肺表面活性蛋白、基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的影响[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(3): 243-244; 247.
- [15] Taha R, Olivenstein R, Utsumi T, et al. Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2 Pt 1): 636-640.
- [16] 刘印红, 陈明伟, 张 扬, 等. 乌司他丁对慢性阻塞性肺病患者血清 COX-2、PLA-2 及肺功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(31): 6069-6071; 6059.
- [17] 景红娟, 汪长东, 宋 苏, 等. 麻黄碱对支气管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 生物学杂志, 2008, 25(3): 27-29.
- [18] 文洪林, 桂 红, 贺 红. 丹皮、白芍对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌的体外抑菌活性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(18): 1469; 1471.
- [19] 刘 蓉, 何 婷, 曾 南, 等. 桂枝挥发油及桂皮醛抗流感病毒的机制研究[J]. 中草药, 2013, 44(11): 1460-1464.
- [20] 叶 冰, 却 翎, 包·照日格图, 等. 干姜-细辛-五味子药对的止咳、抗炎作用研究[J]. 四川中医, 2010, 28(11): 61-62.
- [21] 刘 晶, 孟 莉, 袁子民, 等. 细辛止咳平喘药效物质基础初步研究[J]. 医药导报, 2012, 31(11): 1412-1415.
- [22] 陈 花, 许光兰. 小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期临床疗效的 Meta 分析[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(12): 141-143; 173.
- [23] 吴亦文, 刘 涛, 刘四平. 小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病急性发作期患者肺功能及血清细胞因子的影响[J]. 中国医学创新, 2015, 12(1): 109-111.
- [24] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4): 255-264; 3.

二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的干预作用

刘冬梅, 罗 劲*, 孔晋亮, 王 可, 刘丽华
(广西医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 广西南宁 530021)

摘要: **目的** 通过建立体外白色念珠菌生物被膜模型, 研究二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的干预作用及机制。**方法** 采用肉汤稀释法测定二氢槲皮素、两性霉素 B 对白色念珠菌浮游菌最低抑菌浓度 (MIC), 结晶紫定量法测定二氢槲皮素联合两性霉素 B 对白色念珠菌生物被膜的清除作用, 荧光显微镜下观察二氢槲皮素、两性霉素 B 及两药联合对白色念珠菌生物被膜结构的影响, 通过测定生物被膜细胞表面疏水性探讨药物作用机制。**结果** 二氢槲皮素、两性霉素 B 对白色念珠菌浮游菌的 MIC 分别为 >1.024 、 $16 \mu\text{g/mL}$, 两药联合对白色念珠菌浮游菌的 MIC 为 512 、 $8 \mu\text{g/mL}$, 分级抑菌浓度指数 (FICI) 值为 1 。两药联用组与阳性对照组比较, 生物被膜胞外基质明显减少, 活菌比例下降, 细胞表面疏水性降低, 菌丝粘附于载体数减少。**结论** 二氢槲皮素联合两性霉素 B 可以促进白色念珠菌生物被膜的清除, 二氢槲皮素通过减少白色念珠菌生物被膜粘附及其胞外基质甘露糖以增强两性霉素 B 的杀菌作用。

关键词: 二氢槲皮素; 两性霉素 B; 白色念珠菌; 生物被膜; 疏水性

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-4040-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.052

收稿日期: 2021-11-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760743, 82104499, 82160783); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题资助 (Z20200825); 广西壮族自治区卫生健康委员会重点实验室项目 (ZZH2020004) 及其子课题 (GXHCFM2021002); 广西卫生适宜技术推广铜绿假单胞菌慢性感染与群体感应系统及毒力基因多样性相关研究 (S2019090); 广西医科大学第一附属医院重点实验室培育项目 (YYZS2020006)

作者简介: 刘冬梅 (1995—), 女, 研究生, 研究方向为呼吸系统感染。E-mail: 938533356@qq.com

* **通信作者:** 罗 劲 (1989—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向为呼吸系统感染性疾病发病机制。E-mail: 66875350@qq.com