

基于代谢物组麻杏石甘汤止喘量效关系的实验研究

李冰涛¹, 徐国良², 张启云², 李文宏³, 李 洋², 刘红宁²(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 江西中医药大学中医基础理论分化发展中心, 江西 南昌 330004; 3. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 应用代谢物组整体效应评价麻杏石甘汤对哮喘动物治疗作用的量效关系。**方法** 取 110 只豚鼠随机分为空白组, 模型组, 麻杏石甘汤剂量 1~9 组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组用 2% 氯化乙酰胆碱 + 0.4% 磷酸组胺复制哮喘模型, 造模前麻杏石甘汤各剂量组分别给予 0.90, 1.33, 2.00, 3.00, 4.50, 6.75, 10.13, 15.19, 22.78 g·kg⁻¹ 的麻杏石甘汤, 空白组和模型组给予等量蒸馏水。造模 30 min 后, 心脏采血, 血浆预处理后, HPLC/MS/MS 检测血浆中物质, PCA 分析麻杏石甘汤的整体效应, Prism 5.0 拟合其量效关系函数。**结果** 基于代谢物组整体效应麻杏石甘汤量效函数 $Y = -5.32 + 17.96 / (1 + 10^{((0.15 - X) \times -8.8)})$, 拟合度 0.86, 中位剂量 $[D]_{0.5} = 1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。量效剂量范围: $[D]_{0.2} \sim [D]_{0.8} = 1.132 \sim 1.551 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 阈剂量: $1.132 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。**结论** 代谢物组可作为中药复方整体效应评价指标, 为研究中药复方量效关系提供一种新的思路。

关键词: 麻杏石甘汤; 代谢物组; 哮喘; 量效关系

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0717-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.017

Experimental Study of Dose-effect Relationship of *Mxing Shigan* Decoction in Relieving Asthma Based on Metabonomics Overall Effect

LI Bingtao¹, XU Guoliang², ZHANG Qiyun², LI Wenhong³, LI Yang², LIU Hongning²(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China; 2. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 3. Department of Pharmacology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the dose-effect relationship of *Mxing Shigan* Decoction (MSD) in relieving guinea pig asthma on the basis of metabonomics overall effect. **Methods** One hundred and ten guinea pigs were evenly randomized into 11 groups, namely normal control group, model group and MSD groups 1~9. Guinea pigs except for the normal control group were given atomization inhalation of 2% acetylcholine chloride + 0.4% histamine phosphate to induce asthma. Before modeling, the guinea pigs of MSD groups 1~9 were given 0.90, 1.33, 2.00, 3.00, 4.50, 6.75, 10.13, 15.19, 22.78 g·kg⁻¹ of MSD, and those in the normal control group and model group were given distilled water. Thirty minutes after modeling, blood was sampled from the heart, and endogenous compounds in the blood were analyzed by HPLC-MS-MS after plasma pretreatment, the overall effect of MSD was analyzed by PCA, and the dose-effect curve was fitted by prism 5.0. **Results** The dose-effect function of MSD based on overall effect of metabonomics was $Y = -5.32 + 17.96 / (1 + 10^{((0.15 - X) \times -8.8)})$, $R^2 = 0.86$, and the median dosage $[D]_{0.5}$ was $1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The related parameters were as follows: Effective dose range $[D]_{0.2} \sim [D]_{0.8}$ being $1.132 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 1.551 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and threshold dose $[D]_{0.2}$ being $1.132 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion** The metabonomics could be used as an evaluation index for the

收稿日期: 2014-06-14

作者简介: 李冰涛, 男, 博士研究生, 研究方向: 方剂配伍规律研究。Email: ljw10@126.com。通讯作者: 刘红宁, 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 方剂配伍规律研究。Email: lhongning@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家重点基础研究 973 计划(2010CB530603)。

overall effect of traditional Chinese medicine(TCM) and will provide a novel way to study the dose–effect relationship of TCM.

Keywords: *Maxing Shigan* Decoction; Metabonomics; Ashama; Dose–effect relationship

麻杏石甘汤出自《伤寒论》，具有辛凉宣肺、清热平喘之功效，主治外感风邪，邪热壅肺证^[1]，具有镇咳平喘功效，用于治疗支气管哮喘等^[2]。代谢组学通过分析生物体内源性代谢产物变化，研究生物体整体状况和基因功能调节^[3]。研究方法具有整体、动态的特点^[4]，代谢组学整体效应评价可用于量效关系研究^[5]。前期应用代谢组学方法^[6]研究高、中、低剂量麻杏石甘汤给药对发热模型动物血浆内源性物质状态的影响。本实验应用代谢组方法表征麻杏石甘汤整体效应，分析其量效关系参数，为中药复方量效关系理论研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 健康豚鼠 110 只，体质量 250 ~ 300 g，雄性，湖南省长沙市东创实验动物科技服务部提供，动物合格证号：SCXK(湘)2006-0001。饲养于室温(24±2)℃，昼夜自然明暗交替照明动物房，给予标准饲料和饮用水喂养，适应性饲养 1 周后实验。

1.2 药物与试剂 麻黄、苦杏仁、生石膏、甘草，购自江西本草天工科技有限公司，经本校饶毅教授鉴定均为正品。麻黄：杏仁：石膏：甘草按 3：3：12：3 比例，临床方法制备麻杏石甘汤水提液，过滤后滤液浓缩至 6.75 g·mL⁻¹。-20℃分装冻存。氯化乙酰胆碱和磷酸组胺，上海晶纯试剂有限公司，批号分别为 21205、22270；甲酸为色谱纯，美国 Fluka 公司；乙腈，美国 TEDIA 天地试剂公司；甲醇，色谱醇，山东禹王；其他试剂均为分析纯。

1.3 试剂及仪器 Sigma3-18k 低温高速离心机，德国 Sartorius 公司；Agilent1200 6410 Triple Quadrupole 质谱仪，美国安捷伦公司；MD 3000 生物信号采集分析系统、ZH-100 呼吸换能器，淮北正华生物仪器设备有限公司；402A1 超声雾化器，江苏巨跃医疗设备股份有限公司。

1.4 药物剂量设计、分组、模型复制及给药 依据临床剂量及药物量效关系实验对数据点的要求，采用等比数列(1.5 倍)分别在临床剂量的基础上向低、高剂量延伸 4 个剂量，设计药物剂量分别为 0.90，1.33，2.00，3.00，4.50，6.75，10.13，15.19，22.78 g·kg⁻¹ 共 9 个。

取健康豚鼠 110 只，按照体质量随机分为 11 组，

即空白组，模型组，剂量 1~9 组，每组 10 只。除空白组外其余各组复制哮喘模型。豚鼠适应环境后，剂量 1~ 剂量 9 组分别给予相应剂量麻杏石甘汤，每天 1 次，连续 5 d，空白组和模型组给予等容量(2 mL/只)蒸馏水，末次给药 1 h 后，将豚鼠胸廓绑定呼吸换能器，置连于超声雾化器的密闭玻璃钟罩内，以 2 % 氯化乙酰胆碱+0.4 %磷酸组胺等体积混合液 10 s/次喷雾，30 min 后采集血液样本。

1.5 样品采集及样品前处理 实验结束，以 3.0 %戊巴比妥钠麻醉豚鼠，心脏取血 1.2 mL，血液置于含 0.15 mg 肝素钠的 1.5 mL EP 管中，摇匀，静置 2 h 离心，3000 r·min⁻¹，离心 10 min，取上清液(血浆)，-20℃保存备用。

血浆样本前处理：冻存血浆室温解冻，取 50 μL 血浆于 1.5 mL EP 管，加甲醇 150 μL。涡旋混匀 1 min，4℃恒温静置 3 h，15000 r·min⁻¹，10℃离心 10 min，后取上清液与 1.5 mL EP 管，30℃氮气吹干，加水-甲醇溶液(水：甲醇=80：20)100 μL 定容，涡旋混匀 1 min，18000 r·min⁻¹，10℃离心 15 min，取上清液于样品瓶，进样。

1.6 色谱及质谱方法

1.6.1 色谱条件 色谱柱：Agilent Zorbax Eclipse SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：乙腈(A)、0.1 %甲酸(B)；流速：0.4 mL·min⁻¹；进样量：10 μL；柱温：35℃。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 The condition of gradient elution		
时间 /min	乙腈(A)/%	0.1 %甲酸(B)/%
0.00	2	98
23.00	95	5
25.00	100	0
26.00	98	2

1.6.2 质谱条件 ESI 正离子模式，载气流速 10 L·min⁻¹，干燥气体温度 350℃，毛细管压力为 4000 V，雾化器压力 1.79×10⁶ kPa，扫描范围 100~1000 da。

1.6.3 数据处理及分析方法 采用 Agilent Masshunter 软件(Agilent Technologies, Waldbronn, 德国)采集血浆中质荷比(m/z)在 100~1000 da 内源性小分子及相

应丰度值(abund);数据匹配使用 SQL 2000 软件;数据匹配后,删除空白组与模型组之间无显著变化变量,重新构建数据集。数据处理软件:Simca-p12.0 软件包(UmetricsAB,瑞典),SQL Server(Microsoft,美国),Graphpad Prism5.0(Graphpad,美国)。

主成分分析(PCA)是多变量数据降维的通用方法,也是代谢组学研究的主要数据分析工具^[7]。通过主成分分析对代谢物组数据降维,获得样本在主成分上的得分值,绘制药物整体效应的量效曲线,计算药物的量效参数。

1.7 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差(ANOVA)分析,两组间比较采用 t 检验,采用 Prism 5.0 统计软件进行分析。麻杏石甘汤量效关系拟合使用 Prism 5.0 软件程序。

2 结果

2.1 豚鼠空白血浆总离子流图 见图 1。

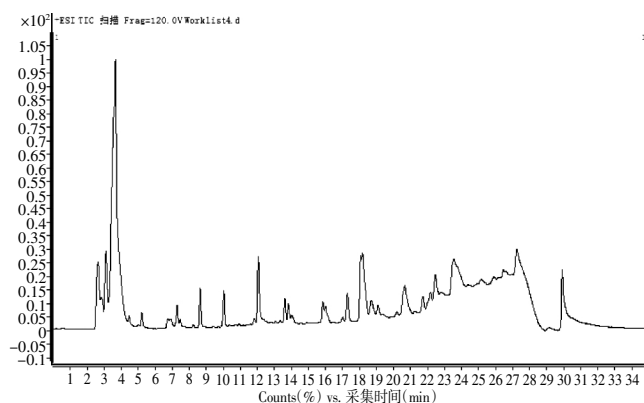


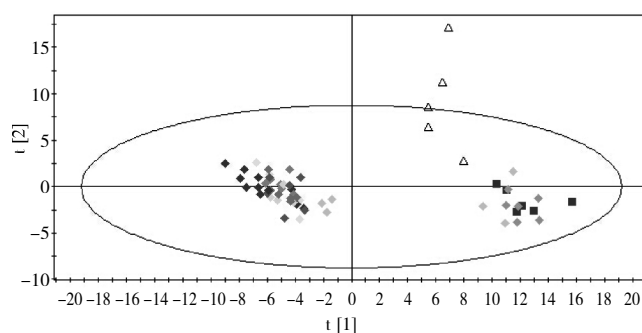
图 1 豚鼠空白血浆总离子流图

Figure 1 The total ion chromatography of plasma from control group

2.2 麻杏石甘汤量效代谢组学数据分析 数据经匹配,删除空白组与模型组无差异变量后,获得由 107 个变量,62 个观察值组成的数据集。数据经单位方差(UV)标准化处理后,进行主成分分析,得到麻杏石甘汤对哮喘动物模型影响的主成分的分散点图,见图 2。

图 2 中空白组两个样本点在椭圆区域外,考虑到删除这两个样本点后空白组样本不满足统计学要求,不删除这两个样本。从 $t[1]$ 上观察,模型组分布在空白组右侧,麻杏石甘汤不同剂量给药组与空白组同分布在模型组左侧,说明在第一主成分麻杏石甘汤能够使模型动物整体状态向正常方向回归,即向左侧变化方向是药物的效应方向。

2.3 基于代谢组整体效应麻杏石甘汤对哮喘作用及其



(Δ : 空白组 $\blacksquare$: 模型组 $\blacklozenge$: 剂量 1 $\blacklozenge$: 剂量 2 $\blacklozenge$: 剂量 3 $\blacklozenge$: 剂量 4 $\blacklozenge$: 剂量 5 $\blacklozenge$: 剂量 6 $\blacklozenge$: 剂量 7 $\blacklozenge$: 剂量 8 $\blacklozenge$: 剂量 9)

图 2 各组对哮喘模型大鼠影响的主成分得分散点图

Table 2 The PCA score scatter plot of each group

量效关系分析 以不同剂量给药组在第一主成分的主成分(整体效应)得分绘制麻杏石甘汤的量效曲线,见图 3。图中随着麻杏石甘汤给药剂量的增加,药物对哮喘模型动物整体状态的影响逐渐变大,在剂量 1 与剂量 3 之间,麻杏石甘汤代谢轨迹变化较大,量效曲线整体趋势成倒 S 形。

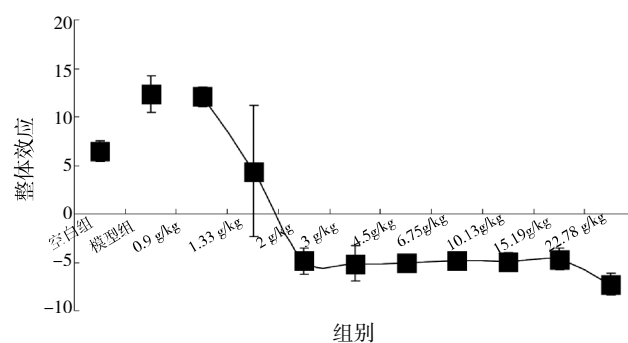


图 3 各组对哮喘模型整体效应量效曲线

Table 3 The dose-effect curve based of metabonomic data of each group

给药剂量数据经对数变换后,拟合量效关系抑制模型,得到量效关系模型拟合曲线,见图 4。量效关系函数: $Y = -5.32 + 17.96 / (1 + 10^{((0.15 - X) \times -8.8)})$, 拟合度(R^2)0.86, 中位剂量 ($D_{0.5}$)1.33 $g \cdot kg^{-1}$ 。量效剂量范围: $[D]_{0.2} \sim [D]_{0.8} = 1.132 g \cdot kg^{-1} \sim 1.551 g \cdot kg^{-1}$, 阈剂量: 1.132 $g \cdot kg^{-1}$ 。

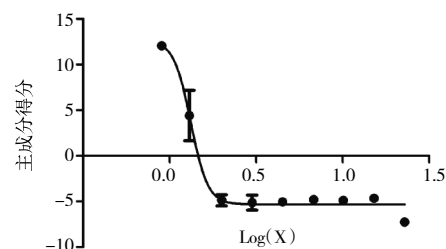


图 4 麻杏石甘汤对哮喘治疗作用的量效关系曲线

Table 4 The fitting curve of dose-effect relationship data from MSD

3 讨论

作用复杂的中药复方的量效关系参数可以用剂量阈表述,包括半饱和剂量,或中位剂量($[D]_{0.5}$),最佳剂量阈范围($[D]_{0.8} \sim [D]_{0.2}$),剂量阈($[D]_{0.2}$)。当病、证、方、药确定后,中药复方的药效仍然是个复杂性问题。中药复方效应有整体效、器官效、分子效等,并有其相应的剂量阈^[8]。

方药量效关系代谢组学研究中,对于同一种疾病模型,不同剂量方药的代谢轨迹也不同,代谢轨迹反映药物对疾病的作用。代谢轨迹在主成分的分散点图上即是在样本的主成分上得分,因此,可以应用样本点在主成分上的得分量化药物的代谢组整体效应,绘制药物整体效应的量效曲线,计算药物的量效参数进而评价方药的量效关系。

本实验基于代谢组学研究麻杏石甘汤治疗哮喘量效关系,结果麻杏石甘汤的量效曲线呈反向 S 型。通过拟合、求解其量效关系函数,得到麻杏石甘汤止喘作用的中位剂量 $[D]_{0.5}$ 为 $1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其量效关系范围 $[D]_{0.2} \sim [D]_{0.8} = 1.132 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 1.551 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,阈剂量: $1.132 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照人体质量为 60 kg ,与大鼠换算常数为 6.0 换算,得到临床麻杏石甘汤的阈剂量(20 %有效剂量)为 11.32 g ,80 %有效剂量为 15.51 g ,中位剂量($[D]_{50}$) 13.3 g 。与临床中剂量(45 g),实验半数有效量结果远低于临床用量,原因可能与本实验使用模型为单纯性哮喘模型,而临床哮喘疾病多伴随咳嗽,发热等症状。

本文代谢组学与文献^[9]平喘实验为同一实验。对比分析本文实验结果与文献^[9]实验结果,基于代谢物组整体效应量效曲线与药物哮喘持续时间相似。在剂

量 1~3 阶段,麻杏石甘汤代谢轨迹变化较大,其对哮喘持续时间再此阶段显著降低。与模型组比较,临床中剂量能显著降低哮喘持续时间,而中剂量代谢物组得分显著低于模型组。

实验以代谢物组表征麻杏石甘汤的量效曲线,计算其量效曲线和量效参数,结果表明,中药复方量效关系可以应用代谢组方法来表征,基于代谢物组的整体效应评价可以为中药复方量效关系研究提供新的研究思路和方法。

参考文献:

- [1] 邓中甲. 方剂学[M]. 2003 版. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 46-47.
- [2] 陈娜, 梁仁. 麻杏石甘汤的现代药理研究及其临床应用[J]. 广东药学院学报, 2004, 5(20): 545-546.
- [3] Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, et al. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis[J]. Biomarkers, 2004, 9(1): 1-31.
- [4] 齐炼文, 李萍, 赵静. 代谢组学与中医药现代研究[J]. 世界科学技术, 2006, 8(6): 79-86.
- [5] 邓海山, 段金廛, 尚尔鑫, 等. 代谢组学的研究现状及其在方剂量效关系中的应用[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(3): 198-203.
- [6] 张启云, 李冰涛, 屈飞, 等. 麻杏石甘汤对大肠杆菌内毒素致热大鼠作用的血浆代谢组学研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(6): 1233-1235.
- [7] Johan T, Elaine H, Torbjorn L, et al. Chemometrics in metabonomics[J]. Protenome, 2007, 6: 696-479.
- [8] 徐国良, 余日跃, 李冰涛, 等. 中药复方量效关系剂量阈研究方法探讨[J]. 世界中医药, 2014, 9(1): 11-13.
- [9] 李文宏, 徐国良, 王跃生, 等. 麻杏石甘汤平喘作用量-效关系研究[J]. 实验方剂学, 2013, 20(9): 171-174.

(编辑: 宋威)

· 简讯 ·

《中药新药与临床药理》杂志为中药新药研发、中药临床药理学学科重要的学术交流平台,学科影响指标、影响因子以及学科排序在全国同类期刊中位居前列,并全面进入国内重要的核心期刊评价系统,是中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊,2013 年经过中国科学引文数据库(简称 CSCD)的定量遴选、学科专家评审和中国科学引文数据库来源期刊遴选委员会的评议,本刊再次入选为 2013~2014 年度中国科学引文数据库来源期刊。在 2012 年出版的《中国学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术)》中本刊影响因子数据:复合影响因子 JIF 为 1.271,他引 JIF 为 1.140;期刊综合影响因子 JIF 为 0.841,他引 JIF 为 0.797;基金论文比为 0.81,在中医学与中药学类 119 种期刊中列第 5 位,成为中医药行业具有较高学术地位和重要影响的期刊之一。

(《中药新药与临床药理》编辑部辑)