

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.002

## 辛芩减方对豚鼠变应性鼻炎的药效学研究\*

唐 勤,邢 茂,胡长鹏,黄景彬,张 蓉<sup>△</sup>

(第三军医大学新桥医院药剂科,重庆 400037)

**[摘要]** 目的 评价中药辛芩方去掉细辛后的安全性及有效性。方法 采用高效液相色谱法(HPLC)检测药效成分黄芩苷及毒性成分马兜铃酸的含量,建立豚鼠变应性鼻炎模型研究辛芩全方及减方对豚鼠变应性鼻炎的作用。结果 辛芩全方及减方浸膏中黄芩苷含量分别为(13.16±0.05)、(14.33±0.45) μg/mg,差异无统计学意义( $P>0.05$ );辛芩全方马兜铃酸的含量为0.000 1%,辛芩减方中未检测到马兜铃酸;辛芩全方及减方均可显著性地减少豚鼠鼻部症状如抓鼻( $P<0.01$ )、打喷嚏的次数( $P<0.05$ ),降低血清中组胺的含量( $P<0.05$ ),减少鼻黏膜中嗜酸性粒细胞数量( $P<0.001$ ),并且可改善鼻黏膜形态,且两方各项指标之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 辛芩减方可在避免细辛中马兜铃酸给机体带来潜在毒副作用的同时,达到对变应性鼻炎的治疗作用。

**[关键词]** 变应性鼻炎;辛芩;减方;黄芩苷;马兜铃酸

**[中图分类号]** R96;R285

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3748-04

The effect of XinQin modified formula on the allergic rhinitis of guinea pig<sup>\*</sup>Tang Qin, Xing Mao, Hu Changpeng, Huang Jingbin, Zhang Rong<sup>△</sup>

(Department of Pharmacy, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China.)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the safety and the effectivity of XinQin formula and XinQin modified formula. **Methods** The effective ingredients of baicalin and toxic ingredient of aristolochic acid in two formula were detected by HPLC, and compared the effect of XinQin formula and the XinQin modified formula on the allergic rhinitis of guinea pig. **Results** The content of the baicalin in XinQin and Xinqin modified formula were (13.16±0.05) and (14.33±0.45) μg/mg, respectively. The content of aristolochic acid was 0.000 1% in XinQin formula, and the aristolochic acid was not detected in XinQin modified formula. The number of the rub( $P<0.01$ ) and sneeze( $P<0.05$ ) were significantly lower than that of the model group, the histamine in serum were significantly lower than that of the model group( $P<0.05$ ), the number of eosnophils in nasal mucosa were significantly lower than that of the model group( $P<0.001$ ), the morphology of nasal mucosa were improved. Moreover, there was no significance between the XinQin formula and the XinQin modified formula( $P>0.05$ ). **Conclusion** XinQin modified formula, can avoid the potential side effect of aristolochic acid and have good effect on allergic rhinitis.

**[Key words]** allergic rhinitis; XinQin; modified formula; baicalin; aristolochic acid

变应性鼻炎(allergic rhinitis)是鼻炎中常见的类型,临床上常伴有鼻痒、打喷嚏、流鼻涕等症状<sup>[1]</sup>,给患者的生活带来很大的不便。近年来变应性鼻炎全球发病率为17%,但近30%的人都受到变应性鼻炎(AR)的影响<sup>[2-4]</sup>,严重威胁着人们的生存和生活质量。中药辛芩方是由细辛、黄芩、荆芥、防风、白芷、苍耳子、黄芪、白术、桂枝、石菖蒲10味药组成,能益气固表,祛风通窍。以该方为基础的中药制剂在治疗变应性鼻炎方面均有很好的疗效<sup>[5-7]</sup>。但辛芩方中含有微量马兜铃酸,自马兜铃酸事件后,该物质对肾脏的毒性在世界范围内取得共识。因此本实验欲去掉辛芩方中毒性药材细辛,研究辛芩减方对变应性鼻炎的治疗作用,旨在保证中药治疗作用的同时减少其潜在毒副作用。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验试剂** 甲苯-2,4-二异氰酸酯(TDI, sigma, 批号:SHBD198V);豚鼠组胺试剂盒(武汉优尔生,批号:L140312255);氯雷他定(上海先灵葆雅制药有限公司,批号:11JRXF1039);黄芩苷对照品(中国食品药品检定所,批号:110715-201117);马兜铃酸对照品(中国食品药品检定所,批号:110748-201309);甲醇(Honeywell, 色谱纯,批号:N2TG1H);羟甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有

限公司,批号:F20060125);多聚甲醛(天津市光复精细化工研究所,批号:50116)。

**1.1.2 实验仪器** 美国 Agilent1200 系列高效液相色谱法(HPLC)(G1322A 在线真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1329A 自动温控进样器, G1316A 柱温箱, G1314B 紫外检测器);ME235 型电子分析天平(德国赛多利斯);LB30S 显微镜(德国莱卡)。

**1.1.3 实验动物** 豚鼠(300±50)g,雄性,50只,动物饲养于清洁级,动物饲养许可证号:豚鼠SYXK(渝)2012-0011。

## 1.2 方法

**1.2.1 辛芩全方及减方浸膏的制备** 按照辛芩处方和减方各药的比例,称取各药50g,加入8倍量的水浸泡0.5h。煎煮2次,第1次1.5h,第2次1.0h,煎液滤过,滤液合并,浓缩至一定体积,真空干燥,得干浸膏,置于干燥器中备用<sup>[6]</sup>。全方和减方的浸膏回收率分别为(22.32±0.45)%和(21.73±1.34)%。

## 1.2.2 辛芩全方及减方中黄芩苷的含量测定

**1.2.2.1 浸膏提取物的前处理**<sup>[8]</sup> 取浸膏约0.5g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%的乙醇50mL,密塞,称定质量。超声处理30min,放冷,称定质量,70%的乙醇补足损失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**1.2.2.2 黄芩苷 HPLC 定量检测方法** 色谱条件:Phenome-

nex Luna C18 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长为 278 nm;进样量 10 μL;柱温 30 °C;以甲醇为流动相 A, 0.2%的磷酸为流动相 B;梯度洗脱条件:0~10 min(51%A), 10~13 min(51%→70%A), 13~18 min(70%A), 18~20 min(70%→51%A), 20~22 min(51%A)。

1.2.3 辛芩全方及减方中马兜铃酸含量测定

1.2.3.1 浸膏提取物的前处理<sup>[8]</sup> 取浸膏约 5.0 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 70%的甲醇 25 mL,密塞,称定质量。超声处理 30 min,放冷,称定质量,70%的甲醇补足损失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.3.2 马兜铃酸 HPLC 检测方法<sup>[9]</sup> 色谱条件:Phenomenex Luna C18 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长为 250 nm;进样量 20 μL;流动相甲醇-1%冰醋酸(70:30);流速 1 mL/min;柱温 30 °C。

1.2.4 变应性鼻炎模型的建立 参照《中药药理实验方法学》中动物病理模型的建立方法<sup>[10-11]</sup>,豚鼠 35 只,适应性饲养 3 d。除健康对照组(7 只)外,其余动物每日经双侧鼻腔滴入 10%甲苯-2,4-二异氰酸酯(TDI)橄榄油溶液,每侧 5 μL,每日 1 次,连续 7 d,空白组每日滴入同体积的橄榄油。于第 7 天滴鼻后,观察经激发后 15.0 min 内豚鼠鼻部局部症状,并记录豚鼠抓鼻、喷嚏和流清涕的次数与严重程度。抓鼻:轻抓鼻 1~2 次为 1 分,剧烈抓鼻四周为 2 分;喷嚏:1~3 个为 1 分,4~10 个为 2 分,11 个以上为 3 分;涕流:流到前鼻孔为 1 分,超过前鼻孔为 2 分,涕流满面为 3 分。评分结果大于 5 分者,造模成功。

1.2.5 分组与给药 取造模成功的豚鼠 28 只,随机分为模型组、氯雷他定组(1 mg/kg)、辛芩减方组(1.8 g/kg)和辛芩全方

组(2.1 g/kg)。各组豚鼠灌胃给药,每日 1 次,连续 14 d,模型组和空白组给予等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。给药期间,甲苯二异氰酸酯(TDI)改为给药后 1.0 h 滴鼻,隔日刺激。

1.2.6 鼻部过敏症状记录 灌胃给药结束后,采用盲评法记录 TDI 刺激后 15.0 min 内抓鼻、喷嚏的次数,并与给药前抓鼻和喷嚏次数相比较,研究对鼻部过敏症状的改善情况。

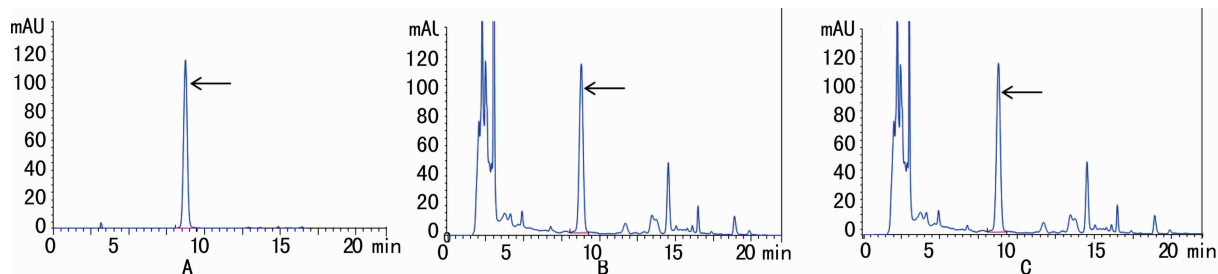
1.2.7 血清中组胺的检测 灌胃给药后,将豚鼠用 10%的水合氯醛麻醉,股动脉取血。静置 2.0 h,3 000 r/min 离心 10 min,取血清,分装后置于-80 °C 超低温冰箱中。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测血清中组胺的含量。

1.2.8 鼻黏膜形态学观察 灌胃给药结束麻醉后,剥除上颌骨部皮肤并将上颌骨从颅骨中游离出来,沿鼻中线切开,暴露鼻中隔及双侧鼻腔,将鼻中隔前中段剪下,取鼻中隔两侧的鼻黏膜组织固定在 10%的多聚甲醛中,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜观察鼻黏膜的形态及嗜酸性粒细胞数量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩苷含量 按以上色谱条件分别检测黄芩苷对照品(62.48 μg/mL)、辛芩全方浸膏、辛芩减方浸膏的色谱行为。在该条件下,黄芩苷色谱峰如箭头所示,保留时间为 8.7 min,理论塔板数 5 700,分离度为 4.8。该条件符合辛芩方中黄芩苷的检测,其色谱图见图 1。



A:黄芩苷对照品;B:辛芩全方;C:辛芩减方。箭头所指为黄芩苷色谱峰。

图 1 HPLC 检测黄芩苷含量系统适应性实验图谱

按照方法学考察要求,对线性、回收率,以及重复性实验进行考察,均符合要求,表明该方法分离度好、稳定,可用于方中黄芩苷的检测。按照浸膏前处理的方法,采用 HPLC 法检测浸膏中黄芩苷的含量,在三批次样品中辛芩全方及减方中黄芩苷的平均含量分别为(13.16±0.05)和(14.33±0.45)μg/mg, 两方之间的黄芩苷含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 辛芩全方及减方浸膏中黄芩苷的含量( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$ )

批次	辛芩全方	辛芩减方
1	12.67±0.08	13.90±0.44
2	13.14±0.13	14.29±0.47
3	13.68±0.02	14.80±0.20
平均值	13.16±0.05	14.33±0.45

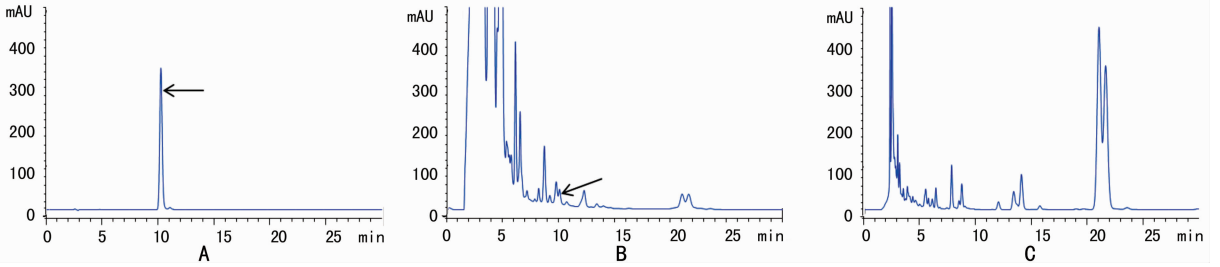
2.2 马兜铃酸的含量 按照 1.2.3 项下的前处理方法及色谱条件分别检测马兜铃酸对照品(16.4 μg/mL)、辛芩全方浸膏以及减方浸膏的色谱行为,该方法的理论塔板数 10 188。该条

件下各样品色谱图见图 2。

从色谱图中可以看到,马兜铃酸的保留时间为 10.2 min (A),辛芩全方在 10.2 min 有马兜铃酸的峰(B),减方中未检测到马兜铃酸(C)。初步含量测定结果表明,辛芩方浸膏中的马兜铃酸的含量为 0.000 1%,低于药典规定的 0.001 0%。

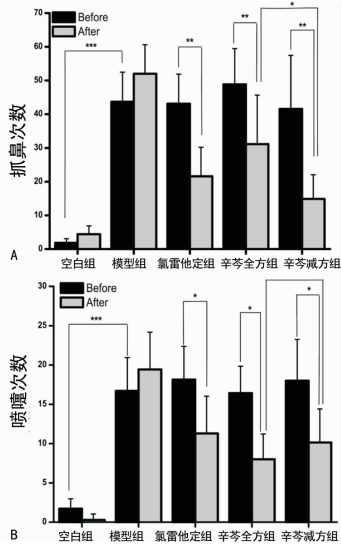
2.3 豚鼠鼻部症状的改善 记录豚鼠给药前后 15.0 min 内抓鼻和喷嚏的次数。豚鼠在给予 TDI 刺激 15.0 min 内,均有明显的抓鼻及打喷嚏现象,且鼻内湿润流涕。按照 1.2.4 项下的评分原则进行评分,各豚鼠总分数均大于 5 分,表明造模成功。在分组给药后,与模型组相比,各药物组抓鼻次数和喷嚏次数均明显降低。与辛芩全方相比,黄芩减方在改善豚鼠抓鼻次数方面具有显著性的优势,但在改善豚鼠喷嚏次数方面差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3。

2.4 血清中组胺的含量 按照试剂盒说明书,检测豚鼠血清中组胺的含量,其结果如图 4 所示。与空白组相比,模型组中组胺的含量显著高于空白组,表明造模成功;各给药组与模型组相比,组胺的含量显著降低;但辛芩方和减方给药后血清中组胺的含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。



A: 马兜铃酸对照品; B: 辛芩全方; C: 辛芩减方。箭头所指为色谱峰。

图2 马兜铃酸含量系统适应性实验图谱

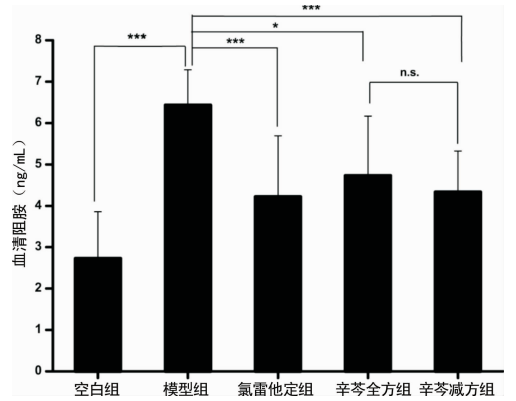


\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

图3 豚鼠给药前后抓鼻(A)和喷嚏(B)次数( $n=7$ )

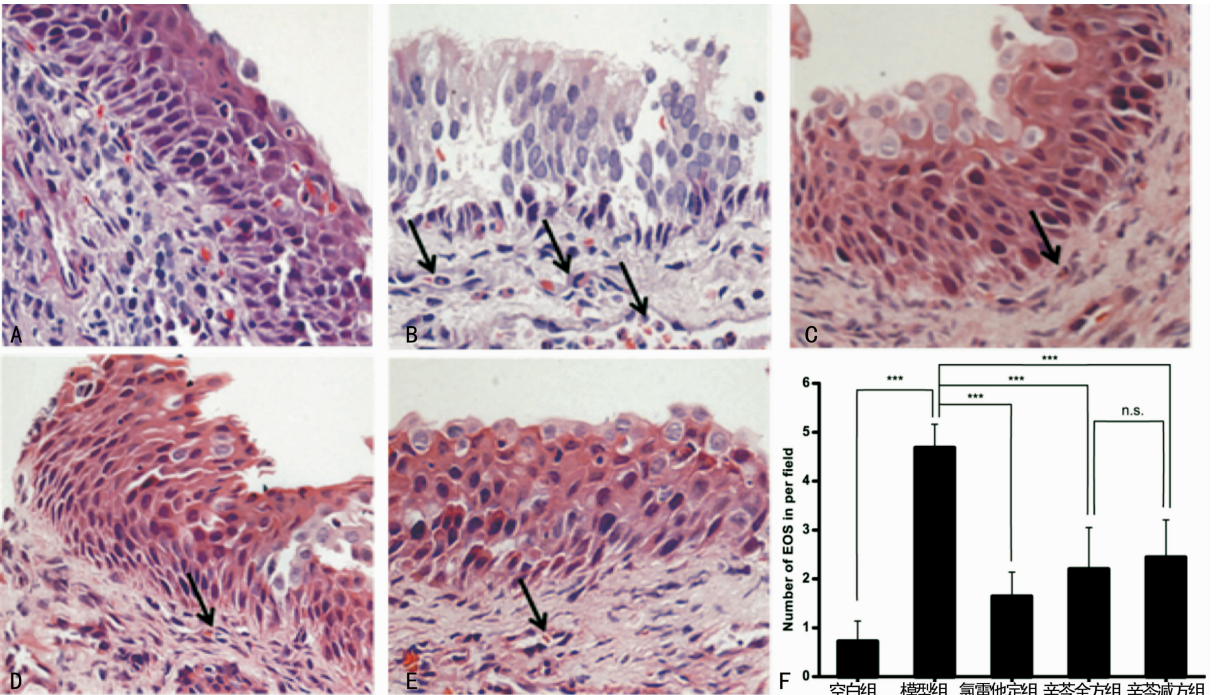
2.5 鼻黏膜形态学变化 各组鼻黏膜 HE 染色的结果显示, 在高倍镜下随机挑选豚鼠鼻黏膜切片 5 个视野, 计算每组每个视野下嗜酸性粒细胞的数量。鼻黏膜形态观察(图 5A~

E): 空白组上皮细胞排列完整、紧密、无破坏; 模型组鼻黏膜上皮层排列紊乱, 边缘不清; 各给药组与模型组比较, 药物组复层纤毛柱状上皮排列整齐紧密, 鼻黏膜形态要优于模型组。嗜酸性粒细胞: 模型组空白组比较, 鼻黏膜中可观察到大量的嗜酸性粒细胞浸润(箭头所指); 各给药组与模型组相比, 嗜酸性粒细胞数量均有显著的下降; 辛芩减方组与辛芩全方组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见图 5F。



\*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

图4 豚鼠血清中组胺的含量( $n=7$ )



A: 空白组; B: 模型组; C: 氯雷他定组; D: 辛芩全方组; E: 辛芩减方组。F: 嗜酸性粒细胞数量( $n=5, 400\times$ )。\*\*\*:  $P < 0.001$ ; n. s.:  $P > 0.05$ 。箭头所指为鼻黏膜中观察到大量嗜酸性粒细胞浸润。

图5 豚鼠鼻黏膜 HE 染色

### 3 讨 论

黄芩作为辛芩方中的君药,黄芩苷的含量高达 9.000 0% 以上,且黄芩苷具有抗过敏作用<sup>[9]</sup>,因此检测该成分的含量对控制处方的质量具有重要意义。《中国药典》2010 版第 1 部关于辛芩颗粒中黄芩苷的含量检测采用等度洗脱的方法,但由于辛芩方成分复杂,导致该方法洗脱时间长。因此,本文采用梯度洗脱的方法建立黄芩苷的含量检测方法,旨在保证含量检测的同时,减少分析时间,降低检测成本<sup>[12-13]</sup>。

细辛,具有祛风散寒、止痛、通窍等功效,可用于治疗鼻塞、鼻渊等。但细辛中含有微量的马兜铃酸,而马兜铃酸对肾脏的毒性已得到共识。在我国,自“龙胆泻肝丸”事件后,中国出台了《关于加强广防己等 6 种药材及其制剂监督管理的通知》,对含有马兜铃、寻骨风、天仙藤和朱砂莲的中药制剂必须凭医生处方方可调配<sup>[14-15]</sup>。《中国药典》2010 版在细辛药材检测项下,规定细辛中马兜铃酸的含量应不得大 0.001 0%。而在香港,已停止审核、批准,并不再销售含马兜铃酸的中成药,可见含马兜铃酸的中药安全性应引起足够的重视。

因此,本文通过减掉辛芩方中潜在毒性药材细辛,降低中药辛芩方治疗变应性鼻炎的潜在不良反应。动物药效学实验表明辛芩全方及减方在鼻部症状的改善、血清中组胺的含量、鼻黏膜形态及嗜酸性粒细胞数量方面均无明显差异,在避免细辛中马兜铃酸带来的潜在毒副作用的同时,可达到该药对变应性鼻炎的治疗作用,为中药更加安全合理地应用于临床提供依据。

### 参考文献

- [1] 张宏誉译. 过敏反应及临床免疫学纲要[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,2005:55.
- [2] Licari A, Ciprandi G, Marseglia A, et al. Current recommendations and emerging options for the treatment of allergic rhinitis[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(10):1337-1347.
- [3] Hoyte FC, Meltzer EO, Ostrom NK, et al. Recommendations for the pharmacologic management of allergic rhini-

tis[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2015, 35(Suppl 1):S20-S27.

- [4] Mandhane SN, Shah JH, Thennati R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11):1646-1662.
- [5] 王丽英. 辛芩口服液治疗变应性鼻炎 70 例疗效观察[J]. *中国中医药科技*, 2013, 6:662.
- [6] 高峰, 吕志华. 辛芩冲剂治疗变应性鼻炎的研究[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(9):65-66.
- [7] 张蓉, 余彦, 杜俊蓉, 等. 辛芩片对豚鼠超敏反应的影响[J]. 2005, 30(10):785-788
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:777.
- [9] 刘新, 林於. 细辛中马兜铃酸的 HPLC 限量测定方法探讨[J]. *中成药*, 2008, 30(6):896-899.
- [10] 李仪奎. 中药药理学实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:923-926.
- [11] Won Jung H, Jung JK, Weon Cho C, et al. Antiallergic effect of KOB03, a polyherbal medicine, on mast cell-mediated allergic responses in ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse and human mast cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3):684-693.
- [12] Sun J, Li L, Wu J, et al. Effects of baicalin on airway remodeling in asthmatic mice[J]. *Planta Med*, 2013, 79(3/4):199-206.
- [13] Yang J, Yang XE, Li M. Baicalin, a natural compound, promotes regulatory T cell differentiation[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12(1):64.
- [14] 王晓丽, 金礼吉, 续繁星, 等. 中草药细辛研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2013, 9(7):68-71.
- [15] 王德平, 毛晓春. 中药马兜铃酸的研究进展[J]. *北方药学*, 2014, 11(11):97-98.

(收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-05-24)

(上接第 3747 页)

- [4] Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, et al. The MicroRNA spectrum in 12 body fluids[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(11):1733-1741.
- [5] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Urinary sediment miRNA levels in adult nephrotic syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 418:5-11.
- [6] Erener S, Mojibian M, Fox JK, et al. Circulating miR-375 as a biomarker of  $\beta$ -cell death and diabetes in mice[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(2):603-608.
- [7] Lv LL, Cao YH, Ni HF, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(8):F1220-F1227.
- [8] Weening JJ, D'agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(2):521-530.
- [9] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5):843-854.
- [10] Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases[J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(3/

4):189-194.

- [11] Lu LF, Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system[J]. *Immunology*, 2009, 127(3):291-298.
- [12] Liang TJ, Qin CY. The emerging role of microRNAs in immune cell development and differentiation[J]. *APMIS*, 2009, 117(9):635-643.
- [13] Xiao X, Huang C, Zhao C, et al. Regulation of myofibroblast differentiation by miR-424 during epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 566:49-57.
- [14] 孙士鹏, 李金明. 循环 microRNA 的研究现状与展望[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2010, 2(6):361-366.
- [15] Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, et al. Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(5):1324-1334.
- [16] Wang G, Tam LS, Kwan BC, et al. Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Rheumatol*, 2012, 31(3):435-440.

(收稿日期:2015-03-07 修回日期:2015-06-03)