

甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制研究

李若洁¹, 石倩², 程彬峰², 侯媛媛^{2*}

1 南开大学 生命科学学院, 天津 300071

2 南开大学 药学院, 天津 300071

摘要 目的: 探讨甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制。方法: 利用基于 CHO 细胞的 β_2 肾上腺素受体 (β_2 -AR) 激动药活性评价体系, 豚鼠离体气管收缩和组胺引喘的活体动物模型观察甘草酸和麻黄碱联用的协同平喘效果。结果: 甘草酸自身不能引起离体气管平滑肌舒张, 平喘效果也不显著, 但与麻黄碱联用可以通过提高 β_2 -AR 的激动效果, 明显增强平喘效果。结论: 甘草酸通过调节 β_2 -AR 信号通路增强麻黄碱的作用效果, 两者联用有良好的协同作用。

关键词 麻黄碱; 甘草酸; β_2 肾上腺素受体激动药; 糖皮质激素

中图分类号: R974.3 R969.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0183-04

Investigation of the anti-asthmatic mechanism of combination of glycyrrhizic acid and ephedrine

LI Ruojie¹, SHI Qian¹, CHENG Bin-feng¹, HOU Yuan-yuan^{2*}

1 College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract **Objective:** To investigate the anti-asthmatic mechanism of combination of glycyrrhizic acid and ephedrine. **Methods:** With cell evaluating systems of β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR) agonists established by our laboratory, model of spasmolytic activities *in vitro* and antitussive activities *in vivo*, the effect of combination use of glycyrrhizic acid and ephedrine was observed. **Results:** In our study, glycyrrhizic acid alone showed little anti-asthmatic effect and could not relax the airway smooth muscles. However, it could enhance the anti-asthmatic activity of ephedrine when these two compounds were used together. **Conclusion:** Glycyrrhizic acid could increase bronchodilation activity of ephedrine through β_2 -AR signal pathway and has synergistic effect on anti-asthmatic treatment.

Key Words ephedrine; glycyrrhizic acid; β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR) agonists; glucocorticoid

麻黄为麻黄科植物草麻黄、木贼麻黄或中麻黄的草质茎, 味辛苦、性温, 入肺、膀胱经; 功能发汗、平喘、利水。草麻黄茎含生物碱 1%~2%, 其中 40%~90% 为麻黄碱 (ephedrine), 其次为伪麻黄碱及微量的 1-N-甲基麻黄碱、d-N-甲基伪麻黄碱、1-去甲基麻黄碱、d-去甲基伪麻黄碱、麻黄次碱等。麻黄碱的作用属于混合型, 大部分是由于同肾上腺素能受体结合而产生的直接作用, 小部分由于促进介质释放的间接因素。1927 年临床上就用口服麻黄碱治疗哮喘, 具有化学性质稳定、平喘作用维持时间长等特点^[1,2]。

甘草为豆科植物甘草的根及根状茎, 味甘、性

平, 入脾、胃、肺经; 功能和中缓急、润肺、解毒、调和诸药。甘草根及根茎含甘草甜素, 为甘草酸 (glycyrrhizic acid) 的钾、钙盐^[3], 具有类糖皮质激素样作用^[4], 如抗炎、抗病毒、解毒及增强免疫功能等^[5,6]。此外甘草制剂能发生去氧皮质酮样作用, 影响电解质平衡, 使血钠潴留, 血钾降低。图 1 为麻黄碱和甘草酸的化学结构式。

方剂是一个中药饮片经配伍组成的复杂体系, 但有效成分是方剂发挥疗效的根本, 是研究方剂配伍和作用机制的重要切入点之一。甘草配伍麻黄平喘为中药配伍的常见组合, 虽然针对支气管哮喘所展开的 β_2 受体激动药和糖皮质激素等对支气管细胞

收稿日期: 2010-02-28

* 通讯作者 侯媛媛 (1977—), 女, 吉林辽源人, 讲师。E-mail: houyy@nankai.edu.cn

分泌炎性介质以及作用机制的研究国外已经报道,但目前国内的中医药相关研究仍停留在临床研究上。本文从麻黄碱和甘草酸较简单的 2 种中药成分配伍入手,从细胞受体、离体平滑肌以及整体动物不同层次探讨其治疗支气管哮喘中的协同作用关系。

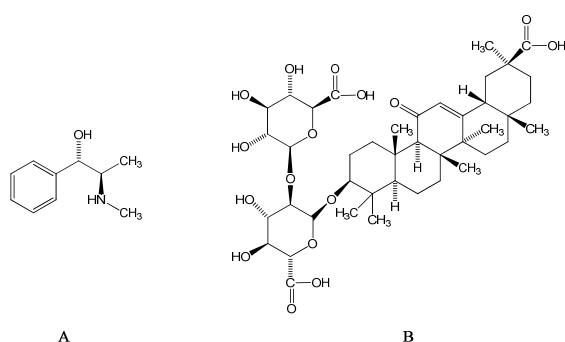


图 1 麻黄碱 (A) 和甘草酸 (B) 的结构式
Fig. 1 Chemical structures of ephedrine (A) and glycyrrhizic acid (B)

1 材料和仪器

1.1 实验动物

英国种豚鼠, 体质量 (150 ± 10) g, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京) 2008-0003]。

1.2 实验仪器

荧光倒置显微镜 (Olympus IX71, 日本), 恒温平滑肌槽、张力传感器以及生物信号采集系统 (盟泰生物技术公司), 超声波雾化器 (亚都科技有限公司)。

1.3 药品及试剂

麻黄碱和甘草酸购自中国药品生物制品检定所; 沙丁胺醇及乙酰胆碱购自 Alfa Aesar 公司; 盐酸普萘洛尔片为天津力生制药股份有限公司产品; 细胞培养基购自 GibcoBPL Life Technologies 公司; 其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 细胞活性检测^[7]

用含 10% 小牛血清的 1640 细胞培养基将待测样品溶液进行系列稀释后, 加入预先培养有稳定转染 β_2 -AR 基因和 GFP 报告基因的 CHO β_2 -AR-CRE-GFP 细胞系的 96 孔板中 (5×10^4 细胞/孔), 在 37°C 、5% CO_2 的条件下孵育 10 h 后, 置于荧光倒置显微镜下进行观察, 采用 Image Pro Plus 5.1 软件 (Media Cybernetics, Inc, USA) 进行荧光强度分析。结果用 CHO-CRE-GFP 对照细胞系进行

校正。绘制荧光强度-浓度依赖曲线。

2.2 豚鼠离体气管收缩实验^[8]

豚鼠击头致昏, 剥取气管, 剪成气管片 ($4 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$), 并固定于盛有 Krebs-Henseleit 缓冲液 (20 mL) 的 37°C 恒温管中, 持续通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体, 静息负荷 1 g 重物后, 加入乙酰胆碱 (Ach), 记录最大收缩效应, 作为空白对照。经 Krebs-Henseleit 缓冲液反复冲洗, 待肌张力恢复至基线后, 加入待测药物和系列稀释的 Ach, 分别测量收缩曲线, 计算收缩率。

收缩率 = (给药前曲线高度 - 给药后曲线高度) / 给药前曲线高度 $\times 100\%$ 。

2.3 磷酸组胺致敏的豚鼠哮喘实验^[9]

取 (150 ± 10) g 豚鼠, 雌雄各半, 置玻璃钟罩内, 以超声喷雾器喷入 (0.5 mL/min) 0.1% 磷酸组胺 + 2% 乙酰胆碱溶液 10 s, 逐个记录豚鼠产生哮喘的时间, 并将选出的哮喘豚鼠随机分为 10 组 ($n=6$), 分别为空白对照生理盐水组; 阳性对照沙丁胺醇组; 麻黄碱高、中、低 3 个剂量组; 甘草酸以及中、低浓度的麻黄碱和甘草酸的组合。按上述条件引喘, 记录豚鼠潜伏期。

3 结果

3.1 甘草酸对麻黄碱激动 β_2 -AR 的协同作用

甘草酸对麻黄碱激动 β_2 -AR 活性的影响结果如图 2 所示, $10 \mu\text{mol/L}$ 甘草酸可明显增强麻黄碱的激动活性, 使活性浓度依赖曲线向左移动, EC_{50} 值显著减小, 表明甘草酸与麻黄碱联用在激活 β_2 -AR 通路方面有协同作用。

3.2 甘草酸协同麻黄碱对豚鼠离体气管收缩的抑制作用

实验中配制了不同梯度浓度的麻黄碱和甘草酸

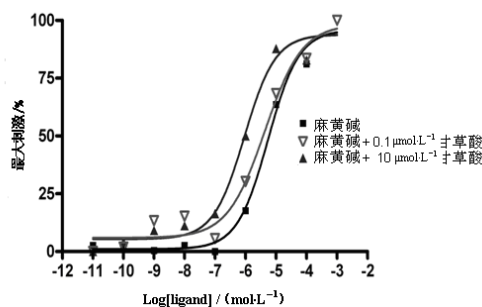


图 2 甘草酸对麻黄碱激动 β_2 -AR 活性的影响
Fig. 2 Effects of glycyrrhizic acid on the β_2 -AR activity activated by ephedrine

溶液。如图3所示,空白对照组的 EC_{50} 值为 8.09×10^{-6} mol/L;随着加入的麻黄碱溶液浓度(10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L)不断加大,量效曲线明显右移。当麻黄碱浓度为 10^{-5} mol/L时, EC_{50} 值为 6.69×10^{-5} mol/L,是空白对照组的8.36倍,表明麻黄碱对于豚鼠离体气管收缩的抑制作用呈剂量依赖关系。

实验中发现,不同浓度的甘草酸对于抑制豚鼠离体气管收缩基本没有效果, 10^{-9} mol/L 甘草酸的 EC_{50} 值为 9.45×10^{-6} mol/L,与空白对照无显著差异,即当甘草酸单独作用时,并不能对乙酰胆碱引起的肌肉收缩产生影响。而选择浓度为 10^{-9} mol/L 的甘草酸和 10^{-7} mol/L 的麻黄碱联用时,抑制离体气管收缩的效果($EC_{50}=5.06 \times 10^{-5}$ mol/L)与高浓度麻黄碱的抑制效果($EC_{50}=6.69 \times 10^{-5}$ mol/L)相近,说明两者具有良好的协同作用。

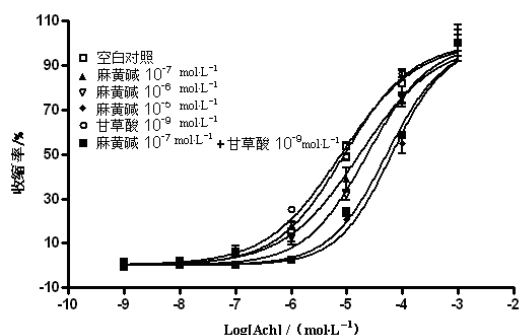


图3 麻黄碱和甘草酸联用对于豚鼠离体气管的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effects of combination of glycyrrhizic acid and ephedrine on the dose-response curves of Ach contracting tracheal of guinea pig ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 协同作用通路的实验研究 (β 受体阻断实验)

为了进一步研究甘草酸协同麻黄碱的作用机制,我们选用了非特异性的 β 受体阻断剂普萘洛尔,在加入药物前预处理20 min,用于阻断 β 受体激动药与受体的结合,考察此时的激动效果。结果: 10^{-6} mol/L 的麻黄碱 EC_{50} 值为 2.98×10^{-5} mol/L,经过阻断以后的 EC_{50} 值变为 7.02×10^{-6} mol/L,与空白组的 EC_{50} 值(8.09×10^{-6} mol/L)相近,说明该阻断体系良好。

10^{-9} mol/L 的甘草酸和 10^{-7} mol/L 的麻黄碱联用,经过普萘洛尔阻断剂处理后, EC_{50} 值有显著变化(阻断前 $EC_{50}=5.06 \times 10^{-5}$ mol/L,阻断后 $EC_{50}=$

7.62×10^{-6} mol/L)(图4)。说明甘草酸对于麻黄碱激动 β_2 -AR活性的提高的协同作用主要是通过 β_2 -AR相关通路来实现的。

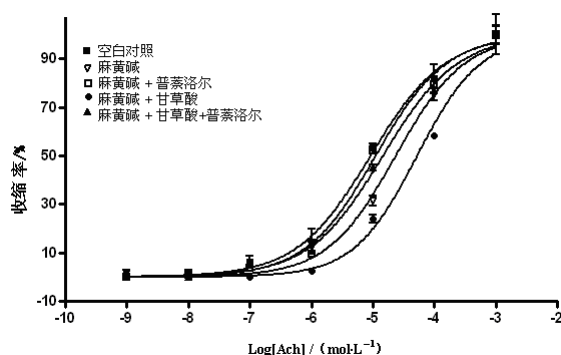


图4 普萘洛尔阻断 β 受体的离体气管收缩实验 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.4 Effects of combination of glycyrrhizic acid and ephedrine on the dose-response curves of Ach contracting tracheal of guinea pig with β adrenergic receptor blocking by Propranolol ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.4 甘草酸协同麻黄碱对组胺致敏豚鼠的抗哮喘作用

如表1所示,高、中、低不同剂量麻黄碱均能剂量依赖性地延长豚鼠的引喘潜伏期。甘草酸单独使用时,延喘时间和空白对照相比无显著差异,无平喘作用。根据离体平滑肌的实验结果,我们选择了中、低浓度的麻黄碱和甘草酸(10^{-9} mol/L)联用,可以显著提高豚鼠延喘时间。使用GraphPad Prism 5.0软件进行多样本配对 t 检验的统计学分析后,各组与空白对照组比较,都具有统计学意义。

4 讨论

本研究采用基于 $CHO\beta_2$ -AR-CRE-GFP细胞的 β_2 -AR激动药活性检测活性体系,首先在细胞水平上证明了甘草酸能有效提高麻黄碱激动 β_2 -AR的作用效果。进一步的豚鼠离体气管平滑肌实验模型和组胺引喘的活体动物实验也表明,甘草酸与麻黄碱联用能够增强麻黄碱舒张气管平滑肌的能力,提高平喘效果。当采用 β 受体阻断剂普萘洛尔阻断 β 受体通路后,发现协同作用消失,说明甘草酸协同麻黄碱的主要作用机制是通过 β_2 -AR通路来完成的。

目前,糖皮质激素常与 β_2 -AR激动药联用治疗哮喘,它可以调节 β_2 -AR的功能,对 β_2 -AR激动药的药效具有促进的作用。其机制主要包括:刺激 β_2 -

表 1 麻黄碱和甘草酸联用对乙酰胆碱和组胺致喘豚鼠的平喘作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effects of combination of ephedrine and glycyrrhizic acid on guinea pig asthma model induced by sprayed histamine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	给药剂量 ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	延喘时间 / %
空白对照	—	14.56 $\pm$ 0.03
沙丁胺醇	1.92	245.80 $\pm$ 29.46***
	1.92 $\times 10^{-2}$	192.60 $\pm$ 21.02***
	1.92 $\times 10^{-4}$	111.90 $\pm$ 8.08**
甘草酸	0.34	41.52 $\pm$ 10.58
麻黄碱	0.67	234.50 $\pm$ 14.85***
	6.7 $\times 10^{-2}$	177.70 $\pm$ 3.23***
	6.7 $\times 10^{-3}$	72.05 $\pm$ 11.80*
麻黄碱+甘草酸	6.7 $\times 10^{-2}$ +0.34	232.30 $\pm$ 12.24*** Δ
	6.7 $\times 10^{-3}$ +0.34	145.70 $\pm$ 31.51** Δ

与空白对照比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与同浓度麻黄碱比较: $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs ephedrine (same concentration)

AR 增加表达,提高受体与 G 蛋白偶联的效率,保护受体免于由炎症引起的下调和解偶联,保护受体免于脱敏及产生耐受等^[8]。实验证明甘草酸具有类似糖皮质激素的结构,将甘草酸与 β_2 -AR 激动药联合使用,比单独使用激动药可能取得更显著的疗效,部分解释了中医将甘草与具有 β_2 肾上腺素受体激动活性的麻黄等草药组合治疗哮喘的分子机制,但

更深入的甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 赵海燕, 潘莉, 冀雪, 等. 抗哮喘药物 β_2 受体激动剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14 (3): 187-192.

[2] 刘 龔, 石 倩, 杨 洋, 等. 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果与机制比较研究[J]. 中草药, 2009, 40(5):771-774.

[3] 李翠芹. 甘草有效成分甘草酸和甘草酸及其衍生物的药理作用研究进展[J]. 中华医学研究与实践, 2004, 2(3): 48-51.

[4] Yoh T, Nakashima T, Sumida Y, *et al.* Effects of glycyrrhizin on glucocorticoid signaling pathway in hepatocytes [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(8): 1775-1781.

[5] Wang Z Y, Nixon D W. Licorice and cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 39(1): 1-11.

[6] 段伟奇, 姬胜利. 甘草酸抗病毒活性的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(4):附 1-附 2.

[7] Bai G, Yang Y, Shi Q, *et al.* Identification of higenamine in *Radix Aconiti Lateralis Preparata* as a beta2-adrenergic receptor agonist [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(10): 1187-1194.

[8] Hashiba E, Sato T, Hirota K, *et al.* The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity [J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(1): 191-196.

[9] Vogel H G, Vogel W H. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* [M]. Germany: Springer Verlag, 1997.