

还具有多种成分、多种作用,一直以来人们对其作用机制尚无明确认识。本研究选择了其中几个环烯醚萜类成分比较系统地研究了其可能的作用,计算结果表明确定多个成分作用于一个靶标,一个成分作用于多个靶标的情况,与中药的治病理念有类似的地方。本研究只是整个研究的一个方面,对于阐明栀子的总体作用,还需要研究尽可能多的成分、量大的成分各种可能的作用,以及各成分之间的相互作用,本研究结果提示理论方法研究中中药复杂体系具有一定的可行性<sup>[11]</sup>。

本研究是一个初步的虚拟评价研究,之所以称为虚拟评价是为了区别虚拟筛选的概念。通常虚拟筛选是利用少量的靶标对大量的分子进行理论筛选,目的是帮助发现先导化合物,本研究利用大量的靶标结构对少量的分子进行潜在活性的筛选,目的是比较完整地评价分子的潜在作用,故称作虚拟评价<sup>[5,11]</sup>。随着越来越多的靶标结构的确定、计算机计算能力的提高,从理论上预测分子活性的结果越来越准确,因此,利用虚拟评价的方法研究中中药这样的复杂体系的作用规律具备了一定的可行性,能够为实验的研究提供方向性的参考数据。

### 3 讨论

本研究选择了环烯醚萜苷元、含饱和及不饱和五元环的环烯醚萜苷共6个栀子成分,利用对接计算系统研究了其与常见靶标的理论结合能力,以扣除非特异得分后的选择性分级判断标准,虚拟评价了其靶标晶体结构作用的选择性。理论上发现环烯醚萜苷的选择性靶标对应的疾病与文献报道的治疗疾病及药理作用具有较好的吻合,表明虚拟评价的技术具有较大的实用性,为利用理论手段研究中

药的作用机制进行了有益的尝试。

本研究的结果表明,糖基对于环烯醚萜类的作用具有重要的影响,饱和五元环对于提高靶标的选择性具有较大的意义。

研究表明,环烯醚萜类能够作用的选择性靶标涉及心衰、高血压、自身免疫疾病、抑郁症、疟疾等疾病,提示这类成分有可能用于相应疾病的治疗,还需要实验上进一步的研究和探索。

致谢:上海超算中心和华南理工大学网络计算中心提供支持。

### 参考文献:

- [1] 那莎,郭国田. 栀子及其有效成分药理研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 1, 12(1): 90-92
- [2] 傅春升,姜红祥,张学顺. 栀子的化学成分与药理作用 [J]. 国外医药:植物药分册, 2004, 19(4): 152-156
- [3] 万进,方建国. 环烯醚萜类化合物的研究进展 [J]. 医药导报, 2006, 25(6): 530-533
- [4] 付小梅,周光雄. 栀子类药材的研究概况及展望 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 20(2): 24-30
- [5] 陈正隆,徐为人,汤立达. 分子模拟的理论研究与实践 [J]. 北京:化学工业出版社, 2007
- [6] 王晶晶,刘巍,徐为人,等. 黄酮苷类与表皮生长因子受体结合模式的理论研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 420-423
- [7] 金丽媛,张士俊,刘冰妮,等. 连翘苷D和凝血因子 $\alpha$ 相互作用的分子动力学模拟 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 592-596
- [8] 周家驹,谢桂荣,严新建. 中药原植物化学成分手册 [M]. 北京:化学工业出版社, 2004
- [9] Friesner R A, Banks J L, Murphy R B, et al. Glide: A new method for rapid, accurate docking and scoring 1. Method and assessment of docking accuracy [J]. *Med Chem*, 2004, 7(47): 1739-1749
- [10] Wang R, Fang X, Lu Y, et al. The PDB bind database: Collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three dimensional structures [J]. *Med Chem*, 2004, 2(47): 2977-2980
- [11] 朱伟,陈可冀,徐筱杰. 计算机药物虚拟筛选技术在中国医药领域中的应用前景 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 263-266

## 麻黄碱与伪麻黄碱平喘效果及机制比较研究

刘 贇<sup>1</sup>,石 倩<sup>2</sup>,杨 洋<sup>1</sup>,李若洁<sup>1</sup>,朱元元<sup>2\*</sup>,白 钢<sup>1,2</sup>

(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 探讨麻黄碱与伪麻黄碱在平喘作用效果与机制方面的差异。方法 取麻黄碱、伪麻黄碱和草麻黄提取物供试样品,分别在分子细胞受体、离体器官及整体动物水平进行实验,比较其作用效果。结果 麻黄碱、伪麻黄碱以及草麻黄提取物均可以激动 $\beta_2$ 肾上腺素受体,并且麻黄碱的激动效果( $EC_{50}$ )优于伪麻黄碱( $EC_{50}$ );豚鼠离体气管平滑肌实验中,麻黄碱对乙酰胆碱(Ach)引起的豚鼠离体气管平滑肌收缩的解痉作用优于同浓度的伪麻黄碱;麻黄碱可以延长组胺致豚鼠的引喘潜伏期,其作用效果优于同浓度伪麻黄碱的作用,且草麻黄提取物亦

\* 收稿日期:2008-10-14  
基金项目:天津市自然科学基金重点项目(07JCZDJC05000)  
\* 通讯作者:朱元元 E-mail: zhuyuan@nankai.edu.cn

有此相同作用。结论 草麻黄提取物含有麻黄碱及伪麻黄碱,麻黄碱在平喘效果上优于伪麻黄碱,并且草麻黄中麻黄碱的量高于伪麻黄碱,草麻黄中主要由麻黄碱起到平喘作用,伪麻黄碱具有辅助的作用。

关键词:草麻黄;麻黄碱;伪麻黄碱; $\beta_2$ 肾上腺素受体激动剂

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)05-0771-04

麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk 或木贼麻黄 *Ephedra equiestifolia* Bunge 的干燥草质茎<sup>[1]</sup>。麻黄茎中生物碱主要为麻黄碱和伪麻黄碱及少量的甲基麻黄碱、甲基伪麻黄碱、去甲基麻黄碱、去甲基伪麻黄碱等<sup>[2]</sup>。其中麻黄碱和伪麻黄碱是一对差向异构体<sup>[3,4]</sup>。研究表明麻黄碱对机体多个系统、器官、组织均有作用,其作用机制复杂,而且涉及各型肾上腺素受体<sup>[5,6]</sup>;而伪麻黄碱的研究资料相对较少,其作用方式多以间接作用为主,临床上主要作为抗感冒药的成分。本研究分别从细胞受体、离体器官以及整体动物水平上,对麻黄碱、伪麻黄碱以及草麻黄提取物对 $\beta_2$ 肾上腺素受体相关的平喘机制进行了研究,明确麻黄碱及伪麻黄碱在哮喘治疗过程中的作用。

## 1 材料

1.1 仪器:Shimadzu 10A 系列高效液相色谱仪(日本岛津),荧光倒置显微镜(Olympus ①1,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)。

1.2 材料:各种型号树脂均购自南开大学化工厂;豚鼠购自军事医学科学院实验动物中心;草麻黄中药饮片购自天津市药材公司(天津药物研究院张铁军教授鉴定);CHO $\beta_2$ -AR-CRE-GFP 细胞系由本实验室构建<sup>[7]</sup>。

1.3 试剂:盐酸麻黄碱及盐酸伪麻黄碱对照品(质量分数>99%),购自中国药品生物制品检定所;沙丁胺醇和乙酰胆碱(Ach)购自Sigma公司;细胞培养基购自GibcoBRL Life Technologies公司;HPLC用试剂均为色谱纯,用水为双蒸水。其余试剂均为国产分析纯。

## 2 方法

2.1 草麻黄提取物的制备:参照文献方法进行<sup>[8]</sup>。取草麻黄中药饮片100g水中浸泡过夜,次日超声处理30min,取上清。将上清液调pH至11,后经D151大孔树脂吸附,用0.08mol/L盐酸洗脱,提取液经冷冻干燥后,得到387.69mg草麻黄提取物。

2.2 HPLC色谱条件:色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>(250mm×4.6mm,5 $\mu$ m);流动相:乙腈-0.2%磷酸

(1:20);体积流量:0.8mL/min;检测波长:205nm;柱温:室温;进样量:10 $\mu$ L。

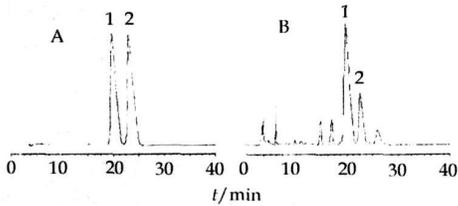
2.3 CHO $\beta_2$ -AR-CRE-GFP 细胞活性检测<sup>[7]</sup>:取供试样品经含有10%FBS的RPMI 1640培养基系列稀释后,加入稳定转染有 $\beta_2$ 肾上腺素受体基因和GFP报告基因的CHO $\beta_2$ -AR-CRE-GFP细胞( $5 \times 10^4$ )的96孔板中(100 $\mu$ L/孔)。37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育10h,弃去培养基加入等体积的PBS溶液,置于荧光倒置显微镜下观察拍照,并用Image Pro Plus 5.1软件(Media Cybernetics, Inc,美国)进行荧光强度分析。分别设荧光强度的最大值为100%、最小值为0,计算细胞产生荧光强度的百分比。

2.4 离体气管收缩实验<sup>[9]</sup>:豚鼠击头致昏,剥取气管,剪成气管片(4mm×8mm),并固定于盛有Krebs-Henseleit缓冲液(20mL)的37℃恒温浴槽中,持续通入95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>的混合气体,静息负荷1g重物后,加入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,分别测量量效曲线。

2.5 磷酸组胺致敏的豚鼠哮喘实验<sup>[10]</sup>:取(150±3)g、豚鼠,雌雄各半,置玻璃钟罩内,以超声喷雾器喷入(0.5mL/min)0.1%磷酸组胺20s,记录豚鼠产生哮喘的时间,即哮喘潜伏期。并将筛选的哮喘豚鼠进行随机分组( $n=6$ ),分别为对照组,阳性对照沙丁胺醇(1.92、0.192、0.0192 $\mu$ g/kg)组,麻黄碱(0.67、0.067、0.0067 $\mu$ g/kg)、伪麻黄碱(0.67、0.067、0.0067 $\mu$ g/kg)以及草麻黄提取物(5.45、0.545、0.0545 $\mu$ g/kg)组,喷雾给药或生理盐水1min后,再将豚鼠放入玻璃钟罩内,并按上述条件给予0.1%磷酸组胺,记录哮喘潜伏期的变化。使用Graph Pad Prism 5.0软件进行多样本配对 $t$ 检验统计学分析。

## 3 结果

3.1 草麻黄提取物的HPLC分析:取一定量上述草麻黄提取物样品溶液(100mg/mL),以HPLC检测。如图1(A,B)所示,在该色谱条件下麻黄碱与伪麻黄碱得到较好的分离,其保留时间分别为19.398、21.532min,经与对照品比较,其质量分数分别占草麻黄提取物的12.3%和3.7%。



1-麻黄碱 2-伪麻黄碱

1-ephedrine 2-pseudo-ephedrine

图 1 麻黄碱和伪麻黄碱混合对照品(A)及草麻黄提取物(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of mix reference substance of ephedrine and pseudoephedrine (A), and *E. sinica* extract (B)

3.2 草麻黄提取物中  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂的检测及活性分析: 分别收集草麻黄提取物 HPLC 色谱峰对应的洗脱液, 除去溶液中的有机相后 10 倍稀释, 利用 CHO $\beta_2$ -AR-CRE-GFP 细胞系, 确定  $\beta_2$  肾上腺素受体激动剂的存在部位。结果如图 2 所示, 只有麻黄碱和伪麻黄碱对应色谱峰洗脱液能明显地刺激细胞表达绿色荧光, 而其他组分均不显示  $\beta_2$  肾上腺素受体激动活性。

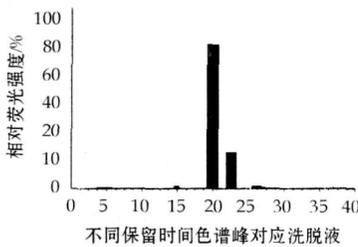


图 2 草麻黄提取物 HPLC 组分对  $\beta_2$  肾上腺素受体激动能力

Fig. 2 Stimulation of HPLC fractions of *E. sinica* extract to  $\beta_2$ -AR

3.3 麻黄碱与伪麻黄碱的  $\beta_2$  肾上腺素受体激动效果: 如图 3 所示, 与沙丁胺醇 ( $EC_{50}$  0.283 3  $\mu\text{mol/L}$ ) 相比, 麻黄碱和伪麻黄碱均显示了较强的  $\beta_2$  肾上腺素受体激动能力,  $EC_{50}$  分别为 17.79 和 51.19  $\mu\text{mol/L}$ , 伪麻黄碱与麻黄碱相比其  $\beta_2$  肾上腺素受体激动能力较弱。

3.4 麻黄碱与伪麻黄碱对豚鼠离体气管收缩的抑制作用: 设定低剂量 Ach (1 nmol/L) 的收缩率为 0, 而高剂量 Ach (1 mmol/L) 的收缩率为 100%。如图 4 所示, 空白对照组  $EC_{50}$  值为 8.09  $\mu\text{mol/L}$ , 当加入阳性对照药沙丁胺醇 (0.024  $\mu\text{g/mL}$ ) 后量效曲线明显右移,  $EC_{50}$  为 57.43  $\mu\text{mol/L}$ , 为空白对照组的 7.1 倍。当加入麻黄碱 (0.2  $\mu\text{g/mL}$ )、伪麻

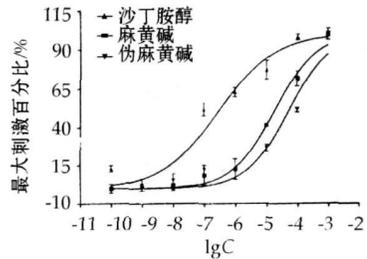


图 3 麻黄碱与伪麻黄碱  $\beta_2$  肾上腺素受体激动活性量效曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Dose-response curves of stimulating activity of ephedrine and pseudo-ephedrine to  $\beta_2$ -AR ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

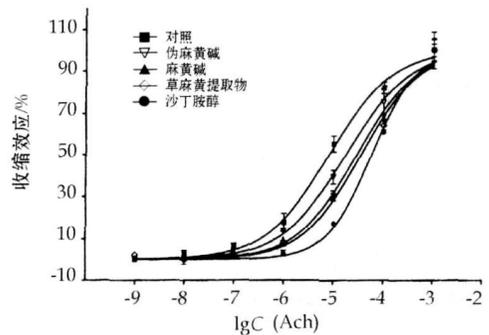


图 4 麻黄碱、伪麻黄碱、草麻黄提取物对 Ach 收缩豚鼠离体气管量效曲线的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 4 Effect of ephedrine, pseudo-ephedrine and *E. sinica* extract on dose response curve of Ach contracting tracheal of guinea pig ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

黄碱 (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) 和草麻黄提取物 (16.6  $\mu\text{g/mL}$ ) 后, 量效曲线也出现不同程度右移, 其  $EC_{50}$  值分别为空白对照组的 3.57、2.16、4.35 倍。结果表明草麻黄提取物对 Ach 引起的豚鼠离体气管平滑肌收缩有较好的解痉的作用, 而麻黄碱的作用明显强于伪麻黄碱。

3.5 麻黄碱与伪麻黄碱对组胺致敏豚鼠的抗哮喘效果: 见表 1。与对照组相比, 高、中、低不同剂量麻黄碱、伪麻黄碱和草麻黄提取物, 均能剂量依赖性延长豚鼠哮喘潜伏期 ( $P < 0.01$ ), 且麻黄碱的作用要明显优于相同剂量的伪麻黄碱 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

构效关系分析表明, 麻黄碱和伪麻黄碱均具有苯乙胺的基本结构, 一般认为该类药物分子中的氨基、苯环以及在氨基的  $\beta$  位的醇羟基 3 个部分与受体形成三点结合。侧链氨基被非极性烷基取代后, 对  $\beta_2$  肾上腺素受体的选择性也增强; 侧链氨基  $\alpha$  碳原子上引入甲基, 可阻碍单胺氧化酶 (MAO) 对氨

表 1 麻黄碱、伪麻黄碱、草麻黄提取物对组胺致豚鼠的平喘作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Anti-asthmatic effects of ephedrine, pseudo-ephedrine and *E. sinica* extract on asthmatic guinea pig induced by His ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	延喘时间/ s	组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	延喘时间/ s
对照	-	11.60 ± 3.45	伪麻黄碱	670	68.21 ± 5.25**
沙丁胺醇	1920	369.23 ± 22.95**		67	46.65 ± 7.09**
	192	266.11 ± 17.37**		6.7	24.41 ± 4.78**
	19.2	170.62 ± 14.55**	草麻黄提取物	5450	178.73 ± 7.91**
麻黄碱	670	166.20 ± 5.23**		545	95.84 ± 11.87**
	67	98.00 ± 9.12**		54.5	73.85 ± 3.46**
	6.7	54.77 ± 7.96**			

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

基的氧化、代谢脱氧, 可使药物的作用时间延长, 但伪麻黄碱的  $\alpha$  碳原子上引入甲基的构象正好同麻黄碱相反, 阻碍了铵离子与受体下部的结合因而活性较小<sup>[11]</sup>。虽然  $\beta_2$  肾上腺素受体的晶体结构刚刚被解析, 但受体与激动剂的构效关系还不十分明确<sup>[12]</sup>。麻黄碱与伪麻黄碱的构效关系见图 5。

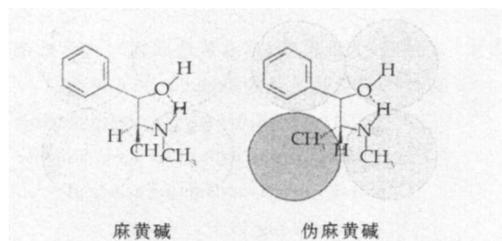


图 5 麻黄碱与伪麻黄碱的构效关系分析

Fig. 5 Structure-activity relationship of ephedrine and pseudo-ephedrine

在不同产地的麻黄药材中, 麻黄碱的量一般高于伪麻黄碱可以达到 3~4 倍<sup>[1]</sup>。结合本实验结果, 不论是细胞受体、离体器官还是整体动物水平, 麻黄碱均表现出较相同浓度的伪麻黄碱有更强(2~4 倍)的平喘效果。因此在麻黄提取物或制剂中, 麻黄碱的平喘效果可以达到伪麻黄碱 6~15 倍。故可以推测麻黄碱是麻黄及其制剂具有平喘效果的主要因素。

参考文献:

- [1] 高湘, 许爱霞, 宋平顺. 甘肃不同采收期人工种植及野生麻黄中麻黄碱与伪麻黄碱含量分析 [J]. 兰州大学学报, 2006, 32(2): 43-49.
- [2] 戴贵东, 郑萍, 李汉青. 伪麻黄碱与麻黄碱对豚鼠气管条的快速耐受作用 [J]. 华西药学杂志, 2001, 16(1): 38-39.
- [3] 郑萍, 戴贵东, 李汉青. 麻黄碱及伪麻黄碱药理作用研究进展 [J]. 宁夏医学杂志, 2002, 24(2): 126-127.
- [4] 李吉来, 陈飞龙, 刘传明. 麻黄汤中麻黄碱与伪麻黄碱的 GGMS 法测定及配伍因素对汤剂中该成分含量的影响 [J]. 中草药, 2002, 33(4): 307-309.
- [5] 戴贵东, 郑萍, 李汉青. 伪麻黄碱和麻黄碱对离体兔和大鼠主动脉环的影响 [J]. 宁夏医学院学报, 2001, 23(5): 318-319.
- [6] 高岭, 张学明, 姚青. 甘草酸二伪麻黄碱盐解热及对大鼠心率血压的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(11): 767-769.
- [7] Yang Y, Bai G, Shi Q, et al. Identification of higenamine in Radix Aconiti Lateralis Preparata as a beta2 adrenergic receptor agoist [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(10): 1187-1194.
- [8] 任海斌, 查丽杭, 秦川. 大孔树脂分离提取麻黄碱的研究 [J]. 离子交换与吸附, 2002, 18(2): 97-111.
- [9] Hashiba Eiji, Tetsumi Sato, Kazuyoshi Hirota, et al. The relaxant effect of proppfol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and  $\beta$  adrenoceptor activity [J]. Anesth Analg, 1999, 89: 191-196.
- [10] Vogel H G, Vogel W H. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays [M]. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1997.
- [11] 赵海燕, 潘莉, 冀雪, 等. 抗哮喘药物  $\beta_2$  受体激动剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(3): 187-192.
- [12] Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A. High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-couple receptor [J]. Science, 2007, 23, 318(5854): 1258-1264.

## 蕨麻提取物对小鼠缺血再灌注心肌损伤的保护作用

叶立<sup>1,2</sup>, 陈洋<sup>3</sup>, 李灵芝<sup>2,3\*</sup>, 张永亮<sup>2,3</sup>

(1. 天津医科大学总医院, 天津 300052; 2 天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300162;

3 中国人民武装警察部队医学院, 天津 300162)

摘要: 目的 研究蕨麻乙醇提取物的抗心肌缺血再灌注损伤作用。方法 采用垂体后叶素+硝酸甘油建立小鼠急性心肌缺血再灌注损伤模型, 监测心电图变化; HE 染色法观察心肌病理改变; Nagar-Olsen 特殊染色观察心肌缺血损伤程度; 生化方法检测血清乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平。结果 蕨麻乙醇提取物能减轻缺血再灌注导致的心电图 J 点抬高, 提高 SOD 活性, 降低血清

\* 收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672774)

作者简介: 叶立 (1966-), 女, 浙江杭州人, 副主任药师, 主要从事临床药学研究。

\* 通讯作者: 李灵芝 Tel: (022) 60578184 E-mail: llzhx@tom.com