

麻黄-桂枝药对中桂枝对麻黄碱诱导兴奋性变化的抑制作用

郑芳昊¹, 罗佳波^{2*}

(1. 佛山市中医院, 广东 佛山 528000; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 采用药动学-药效学 (PK-PD) 模型拟合法考察麻黄-桂枝药对配伍中桂枝对麻黄碱诱导的兴奋性变化的抑制作用。**方法** SD 大鼠分别灌胃给予生理盐水、麻黄碱、麻黄和麻黄-桂枝药对 (3 : 2) 水煎液。借助微透析采样技术, 以麻黄碱在脑脊液中的质量浓度变化为 PK 观察指标, 以氨基酸类神经递质谷氨酸 (Glu)、 γ -氨基丁酸 (GABA) 的动态变化为 PD 指标。**结果** 最佳药效动力学模型为 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型。各组 Glu 的药物浓度-效应 (E-C) 曲线均呈顺时针环, 各组 GABA 的 E-C 曲线均呈逆时针环。**结论** 麻黄碱易于产生耐受性, 桂枝可以抑制麻黄碱引起的兴奋性变化。

关键词: 麻黄; 桂枝; 药对; 药动学-药效学 (PK-PD); 谷氨酸 (Glu); γ -氨基丁酸 (GABA); 药物浓度-效应 (E-C) 曲线; 大鼠

中图分类号: R285. 5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)05-0984-05

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2016. 05. 005

Neuroprotective effect of *Cinnamomi Ramulus* against ephedrine-induced excitotoxicity in *Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus* herb pair

ZHENG Fang-hao¹, LUO Jia-bo^{2*}

(1. Foshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the neuroprotective effect of *Cinnamomi Ramulus* against ephedrine-induced excitotoxicity in *Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus* herb pair by pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) modeling. **METHODS** SD rats received gavage with saline, ephedrine, ephedra and *Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus* herb pair (3 : 2) decoctions. In the microdialysis, the change of ephedrine concentration in cerebrospinal fluid was taken as a PK index, while the dynamic changes of amino acid neurotransmitters were taken as PD indexes. **RESULTS** The best PK-PD model was Sigmoid- $E_{\max}$. Each group of Glu E-C curve showed a clockwise loop, while E-C curve of GABA showed a counterclockwise loop. **CONCLUSION** Ephedrine has tachyphylaxis, and the excitatory changes induced by ephedrine can be inhibited by *Cinnamomi Ramulus*.

KEY WORDS: *Ephedrae Herba*; *Cinnamomi Ramulus*; herb pair; pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD); Glu; GABA; effect-concentration (E-C) curve; rats

麻黄汤是中医治疗风寒表实证的经典方剂, 在临床中应用广泛。其中, 麻黄和桂枝是发挥药效的主要药味, 在原方中的配伍比例为 3 : 2。大量的实验研究表明, 麻黄-桂枝配伍可以增强药物的发汗作用, 缓解患者的发热、鼻塞、咳喘等症状^[1-5]。然而, 由于麻黄碱对中枢神经系统和心血

管系统的毒副作用, 西方国家将麻黄列为有毒的天然植物添加剂^[6-10]。较低剂量下, 麻黄可以改变大鼠的行为学参数, 出现兴奋性行为变化。而在较高剂量下, 长期给予麻黄将出现严重的不良反应, 提示长期大剂量使用麻黄可能影响脑部特定区域神经细胞的正常结构和生理功能^[11]。

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81030066)

作者简介: 郑芳昊 (1987—), 男, 博士, 从事中药新药研发工作。Tel: (0757) 81092010, E-mail: fanghao-zheng@foxmail.com

* 通信作者: 罗佳波 (1947—), 男, 教授, 从事中药新药研发方向研究。Tel: (020) 62789112, E-mail: ljbo@fimmu.com

PK-PD(pharmacokinetics-pharmacodynamics)模型(药动学和药效学结合模型),是在传统药动学和药效学的基础上发展而来的。通过测定特定效应的药物浓度和药理效应随时间的变化,有助于了解两者之间的内在联系。相对于传统的药动学研究,PK-PD模型要求尽量了解药物在体内作用部位的动力学特征,明确药物在作用部位的浓度变化,以此与药理效应更紧密的联系在一起,定量的反应药物浓度与效应的关系。通常PK-PD模型可以通过特定的数学模型进行拟合,通过比较参数的变化进一步掌握药物在作用部位的综合特性^[12]。

本实验以麻黄碱在大鼠脑脊液中的质量浓度变化为药动学观察指标(PK),以氨基酸类神经递质谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)的动态变化为药效学指标(PD),阐明麻黄碱在大鼠额叶皮层的浓度-效应-时间三维关系,拟合药物浓度及其效应经时过程的曲线,为揭示麻黄-桂枝药对配伍的减毒机理提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎,产地吉林,批号 110901;桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presel 的干燥嫩枝,产地广西,批号 121001,均购自广州致信中药饮片有限公司,经南方医科大学中药鉴定教研室马骥教授鉴定为正品。

1.2 试剂 盐酸麻黄碱对照品(批号 060307,赤峰艾克制药科技有限公司)。乙腈、甲醇购自德国默克公司,均为色谱纯;氯化钠、氯化钙、氯化钾,均为市售分析纯。

1.3 仪器与耗材 微透析系统(RWD302,深圳市瑞沃德生命科技有限公司);探针(CMA20,瑞典 CMA/Microdialysis AB 公司);高效液相色谱仪(Agilent 1200 Series,美国安捷伦科技有限公司);液质联用仪(Agilent 6410 Triple Quad LC/MS,美国安捷伦科技有限公司)。

1.4 动物及分组 SD 大鼠,雄性,24 只,体重 180~220 g,SPF 级,购于南方医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(粤)2011-0015。采用随机方法将动物分组,每组 6 只,分别灌胃给予生理盐水、麻黄碱、麻黄和麻黄-桂枝药对(3:2)水煎液。

2 方法

2.1 药液的制备

2.1.1 麻黄碱组 精密称取麻黄碱对照品,加蒸

馏水制成 4.80 mg/mL 的溶液,作为麻黄碱组试液。

2.1.2 麻黄组 称取麻黄药材,按麻黄汤原方配比加 10 倍量水,浸泡 30 min。煎煮 20 min,去沫。再煎 30 min,定容。浓缩至 1.50 g/mL,按麻黄碱计为 4.80 mg/mL,作为麻黄组试液。

2.1.3 麻黄-桂枝(3:2)组 称取麻黄药材,按麻黄汤原方配比加 10 倍量水,浸泡 30 min。煎煮 20 min,去沫。按麻黄汤原方配比加桂枝药材,煎煮 30 min,定容。按麻黄量计浓缩至 1.85 g/mL,按麻黄碱计为 4.80 mg/mL,作为麻黄-桂枝(3:2)组试液。

2.1.4 林格氏液的配制 分别称取 4.300 0 g 氯化钠、0.122 1 g 氯化钙、0.149 0 g 氯化钾,加蒸馏水溶解,转移至 500 mL 量瓶中,加稀盐酸调 pH 至 7.4,定容,0.45 μ L 滤膜过滤,制得空白林格氏液溶液。

2.2 微透析法收集脑脊液 采用 20% 乌拉坦(0.6 mL/100 g)麻醉大鼠,插入胃管,固定于大鼠脑立体定位仪上,暴露颅骨。参照《大鼠脑立体定位图谱》,在前囟前 2.6 mm、旁开 1.3 mm、硬膜下 3.6 mm 颅骨上钻孔,插入脑探针。以 1.5 μ L/min 灌注空白人工脑脊液(林格氏液),平衡 2 h。分别灌胃给予各组试药(1 mL/100 g),采用动物低温收集器收集透析液样品, -80 $^{\circ}$ C 保存待测。实验结束后,对大鼠进行心脏灌注,分离取出鼠脑,福尔马林浸泡固定后,通过切片确定探针所在位置是否准确。若脑内损伤过重或探针膜头弯曲,摒弃实验结果^[13]。以 1:1 比例混合待测透析液和内标溶液后,立即进行 LC-MS(液质联用)分析^[14]。

2.3 PK-PD 联合模型分析 采用 Winnonlin 4.0.1 软件,分别输入时间、药代动力学指标(药物浓度随时间的变化)、药效动力学指标(Glu、GABA 含量随时间的变化)3 组数据,选用线性模型、对数模型及 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型等 PK-PD 模型进行拟合。根据软件计算得到的 R(相关系数)、AIC(Akaike 信息量准则)、SBC(Schwarz 信息量准则)等指标选择最佳药效动力学模型,比较不同给药组间的参数差异。

3 结果

3.1 麻黄碱在额叶皮层部位的药时曲线及 Glu 和 GABA 的水平变化 结果表明,不同组别麻黄碱在大鼠额叶皮层的药代动力学过程基本一致。与

生理盐水组相比，不同组别的 Glu、GABA 均有不同程度的升高。其中，Glu 均在 60 min 达到峰值，随着时间推移逐渐下降；麻黄碱组 GABA 质量浓度在 100 min 达到峰值，麻黄组和配伍组均在 120 min 达到峰值，随着时间推移逐渐下降。见图 1 ~ 3。

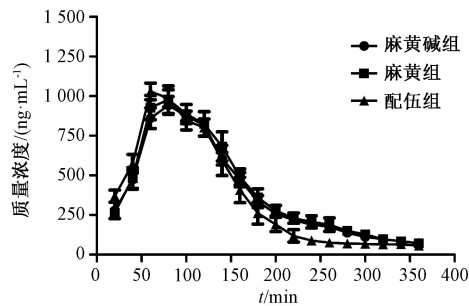


图 1 麻黄碱药-时曲线

Fig. 1 Concentration-time curves of ephedrine

3.2 PK-PD 模型分析

3.2.1 不同 PK-PD 模型拟合的结果 如表 1 所示，通过 PK-PD 模型拟合，麻黄碱药效指标的最佳药效动力学 (PD) 模型为 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型，各组 AIC、SBC 值相对较小，且相关系数较其它模型更接近 1。其公式如下。

$$E = E_0 + \frac{(E_{\max} + E_0) C^S}{EC_{50}^S + C^S}$$

表 1 药对对麻黄碱 PD 模型拟合参数的影响

Tab. 1 Effects of herb pair on PD fitting parameters of ephedrine

PK-PD 模型	参数	麻黄碱组		麻黄组		药对组	
		Glu	GABA	Glu	GABA	Glu	GABA
线性模型	R	0.371 6	0.392 8	0.352 7	0.376 3	0.309 3	0.342 5
	AIC	478.48	483.29	499.38	477.44	582.38	508.69
	SBC	479.68	485.32	502.21	479.83	587.64	511.21
对数模型	R	0.378 3	0.373 8	0.602 8	0.472 8	0.639 2	0.583 9
	AIC	398.74	376.56	177.69	388.72	98.27	117.63
	SBC	427.98	378.19	179.38	394.34	117.83	121.31
Sigmoid- $E_{\max}$ 模型	R	0.876 8	0.901 7	0.879 3	0.901 1	0.867 4	0.899 2
	AIC	59.82	24.27	57.43	27.82	68.79	30.19
	SBC	63.29	27.93	59.25	29.78	70.23	32.22

3.2.2 药对配伍对 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型拟合参数的影响 从表 2 的结果可以看出，麻黄碱组和麻黄组的 Glu 达峰质量浓度 ($E_{\max}$) 均大于配伍组，而 EC_{50} 值小于配伍组，说明桂枝的加入抑制了麻黄碱引起的兴奋性变化。各组 GABA 的 S 值均大于 1，说明此时 S 形曲线的中间部分较陡；而 Glu 的 S 值均小于 1，说明低质量浓度时曲线较陡，但离开 EC_{50} 后，其曲线较平坦，效应接近 $E_{\max}$ 较慢。

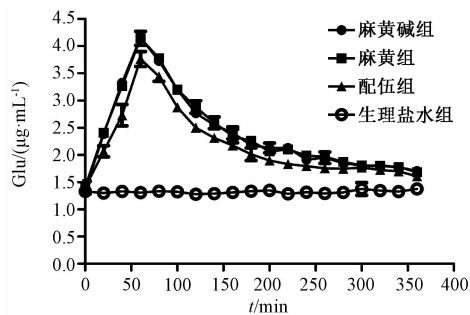


图 2 Glu 质量浓度随时间变化曲线

Fig. 2 Curves of Glu concentration with time

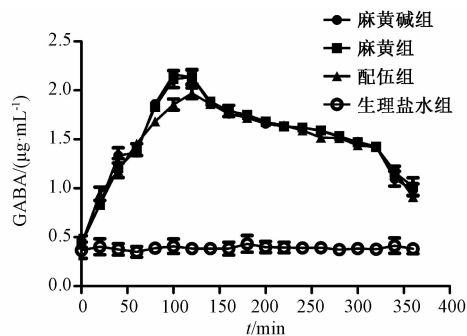


图 3 GABA 质量浓度随时间变化曲线

Fig. 3 Curves of GABA concentration with time

其中， E 为即时效应值， $E_{\max}$ 为最大效应， E_0 为基础效应值， EC_{50} 为引起效应达到最大效应一半时的药物浓度值， C 为药物即时浓度值， S 为形状因子，反映曲线的形状变化。

3.2.3 PK-PD 模型拟合的 E-C 曲线 实验结果如图 4 所示，以麻黄碱在大鼠脑脊液中的质量浓度变化为 PK 指标，以氨基酸类神经递质含有量的动态变化为 PD 指标，各组 Glu 的 E-C 曲线均呈顺时针环，说明各组大鼠给予麻黄碱后均出现了显著的快速耐受性；各组 GABA 的 E-C 曲线均呈逆时针环，说明抑制性氨基酸含有量变化滞后于血药浓度变化。

表 2 药对对 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型拟合参数的影响

Tab. 2 Effects of herb pair on fitting parameters of Sigmoid- $E_{\max}$ model

组别	指标	$E_{\max}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$E_0/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\text{EC}_{50}/$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	S	消除速率 常数(K_{e0})
麻黄碱组	Glu	3.75	1.43	0.87	0.437	0.973 5
	GABA	2.47	0.97	5.24	2.330	0.973 4
麻黄组	Glu	3.72	1.44	0.85	0.436	0.968 7
	GABA	2.46	1.02	5.37	2.360	0.953 7
配伍组	Glu	3.34	1.43	1.04	0.376	0.987 2
	GABA	2.42	0.95	5.47	2.410	0.968 4

4 讨论

传统的药代动力学（PK）和药效动力学（PD）研究是分别进行的。其中，药代动力学研究

多是通过测定体内血液的药物浓度变化来反应药物在体内的综合作用特征，无法反应作用部位的特定药动学特征。而药效动力学研究则主要在离体水平进行，相关模型往往呈现药物浓度和效应一一对应的关系，无法反应药物在体内的真实效应变化。实际上，PK 和 PD 是在体内密切相关的两个同时进行的动力学过程。前者反应药物浓度随时间的变化规律，进而可以推断药物的吸收、分布、代谢和排泄特征。后者描述药理效应随时间的变化特征，进而推断作用部位的药物浓度与药理效应之间的变化规律。因此，有必要将两者结合起来同步研究。

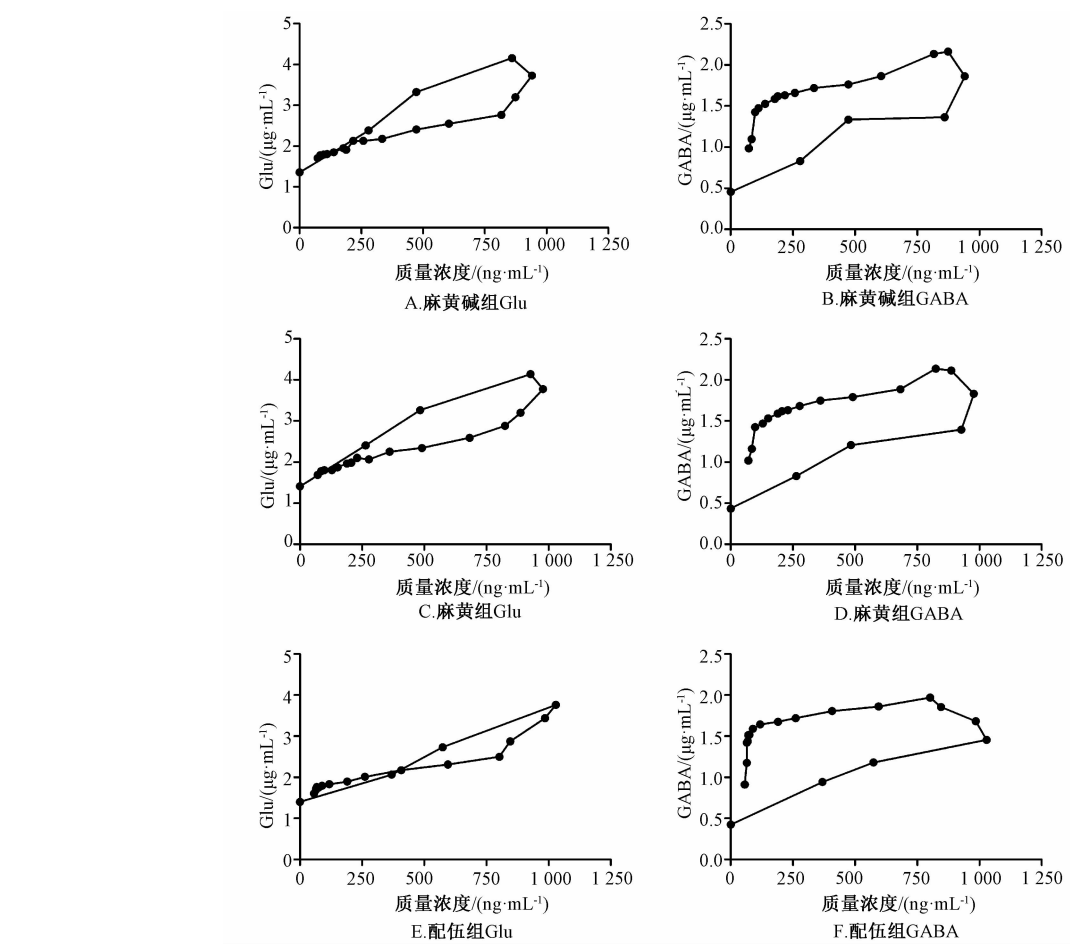


图 4 各组 Glu 和 GABA 的 E-C 曲线

Fig. 4 E-C curves of Glu and GABA in various groups

麻黄碱是麻黄的主要药效成分，同时也是麻黄产生兴奋性毒副作用的毒性成分。由于麻黄碱分子量较小，因此可以直接通过血脑屏障进入脑区。谷氨酸（Glu）是兴奋性氨基酸类神经递质，而 γ -氨基丁酸（GABA）是抑制性氨基酸类神经递质，两者的含有量变化可以直接反应动物的中枢神经系统

变化。有实验研究表明，麻黄碱可以引起大鼠脑部氨基酸类神经递质变化，额叶皮层是影响最大的部位^[15]。本实验采用的脑部微透析采样技术，可以同时收集反应药物浓度变化和效应变化的样品，进一步通过 LC-MS/MS 等灵敏度较高的分析技术可以测定样品中微量的麻黄碱和 Glu、GABA 等效应指标。

目前,常用的 PK-PD 模型有线性模型、对数线性模型、最大效应模型 ($E_{\max}$)、Sigmoid- $E_{\max}$ 模型等。其中, Sigmoid- $E_{\max}$ 模型是在研究中使用最多的药效模型,适用于描述多种药物在体内的浓度和效应关系。实验结果表明,以麻黄碱在大鼠脑透析液中的质量浓度变化为 PK 指标,以氨基酸类神经递质含有量的动态变化为 PD 指标,经模型拟合比较符合 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型。PK-PD 模型的药物浓度-效应曲线 (E-C 曲线) 大致可分为 3 种类型, E-C S 形曲线、E-C 逆时针滞后曲线和 E-C 顺时针曲线。本实验研究表明,以大鼠脑透析液中麻黄碱的质量浓度变化为 PK 指标,以 Glu 含有量的动态变化为 PD 指标,给药后各组 E-C 曲线均呈顺时针,相对于药物浓度上升期的效应变化,同一药物浓度在下降期内所对应的效应显著减弱,说明各组动物均对麻黄碱产生了快速耐受性。以大鼠脑透析液中麻黄碱的质量浓度变化为 PK 指标,以 GABA 含有量的动态变化为 PD 指标,给药后各组 E-C 曲线均呈逆时针,相对于达到药物浓度峰值的时间,药理效应的峰值显著滞后,表明引起 GABA 含有量变化的效应室不在额叶皮层,麻黄碱并不是直接对 GABA 产生作用,而很有可能是机体对 Glu 含有量升高的自我调节作用。麻黄-桂枝配伍组与麻黄碱组和麻黄组相比,产生同一效应值药物浓度较高,说明桂枝对中枢神经的作用与麻黄碱相反,具有下调 Glu 水平和升高 GABA 水平的作用。

本实验通过 PK-PD 模型拟合,说明以麻黄碱在大鼠脑透析液中的质量浓度变化为 PK 指标,以 Glu、GABA 含有量的动态变化为 PD 指标,最佳 PK-PD 模型为 Sigmoid- $E_{\max}$ 模型。E-C 曲线表明麻黄碱易于产生耐受性,桂枝可以抑制麻黄碱引起的兴奋性变化,这可能是麻黄-桂枝药对配伍后相对安全的证明。

参考文献:

[1] 徐文杰,方 芳,余林中,等. 麻黄桂枝药对解热作用及其机制的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1547-1549.

[2] 刘国清,罗佳波. 麻黄汤不同配伍对大鼠发汗作用的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(5): 318-320.

[3] 朱秋双,任春清,刘 蕾,等. 麻黄汤不同配伍解热药效实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2005, 28(2): 12-13.

[4] 刘永刚,罗佳波,贺 丰. 麻黄汤及拆方抗炎作用的研究[J]. 中药材, 2005, 28(5): 413-415.

[5] 朱秋双,刘 蕾,任春清,等. 麻黄汤配伍解热药效实验研究[J]. 黑龙江医药科学, 2004, 27(5): 13-14.

[6] Haller C A, Benowitz N L. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343 (25): 1833-1838.

[7] Singh A, Rajeev A G, Dohrmann M L. Cardiomyopathy associated with ephedra-containing nutritional supplements [J]. *Congest Heart Fail*, 2008, 14(2): 89-90.

[8] Maglione M, Miotto K, Iguchi M, *et al.* Psychiatric effects of ephedra use: an analysis of Food and Drug Administration reports of adverse events[J]. *Am J Psychiatry*, 2005, 162(1): 189-191.

[9] Miller S C. Psychiatric effects of ephedra: addiction[J]. *Am J Psychiatry*, 2005, 162(11): 2198.

[10] 陆 斌. 麻黄或与其它兴奋剂合用易致严重不良反应[J]. 药物不良反应杂志, 2002, 4(4): 275-276.

[11] 郑芳昊,罗佳波. 麻黄对大鼠中枢神经系统毒副作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 534-536.

[12] 曹 岗,张 云,丛晓东,等. PK-PD 模型在中药药动学中的应用[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1830-1834.

[13] 陈 燕. 麻杏石甘方药效/毒两性成分及脑内分布的研究[D]. 广州:南方医科大学, 2011.

[14] 陈 燕,王有志,安春志,等. LC-ESI-MS/MS 测定大鼠海马和纹状体中氨基酸类神经递质的含量[J]. 今日药学, 2013, 23(2): 65-69.

[15] 张秀明. 麻杏石甘方药效/毒两性成分存效减毒整合机制研究—中枢神经系统[D]. 广州:南方医科大学, 2010.