

维药神香草超临界CO₂流体萃取物的抗炎、止咳、祛痰作用及其对哮喘大鼠气道炎症的影响

麦合苏木·艾克木¹, 雪合热提·伊纳也提², 阿依先木·他西¹, 阿不都热依木·玉苏甫³

1. 新疆医科大学维吾尔医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆维吾尔自治区中医民族医药管理局, 乌鲁木齐 830001

摘要 观察维药神香草超临界CO₂流体萃取物的抗炎、止咳、祛痰作用及哮喘大鼠肺组织病理学改变,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞总数、淋巴细胞(Ly)、嗜酸性粒细胞(Eos)、中性粒细胞(Neu)的百分比及肺组织和BALF中的转化生长因子-β1(TGF-β1)水平,探讨其抗炎、止咳、祛痰作用及其对哮喘大鼠气道炎症的影响,为维药神香草的开发利用奠定基础。通过小鼠右耳二甲苯致炎法、氨水喷雾致小鼠咳嗽法、小鼠气管酚红分泌法进行抗炎、止咳、祛痰实验。哮喘大鼠气道炎症的影响实验中,采用卵清白蛋白(OVA)致敏和激发法复制哮喘模型,进行药物干预,观察肺组织病理学改变,测定BALF中细胞总数、Ly、Eos、Neu的百分比;以酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测肺组织及BALF中TGF-β1水平。结果显示,不同剂量给药组可明显抑制二甲苯致小鼠的耳廓肿($P < 0.05$)、减少氨水喷雾致小鼠咳嗽次数($P < 0.05$)、促进小鼠气管酚红分泌($P < 0.05$),且均呈明显的剂量依赖关系;与模型组比较,各给药组大鼠BALF中细胞总数, Ly、Eos、Neu的百分比, TGF-β1水平及肺组织中的TGF-β1水平均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);由此推测,维药神香草超临界CO₂流体萃取物具有显著的抗炎、止咳及祛痰作用,其可能通过抑制Ly、Eos、Neu等炎症细胞及细胞因子TGF-β1的分泌,减轻或改善哮喘的气道炎症。

关键词 神香草超临界CO₂流体萃取物;抗炎、止咳、祛痰作用;哮喘气道炎症

中图分类号 R291.5

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.24.012

Anti-inflammatory, antitussive and expectorant effects of traditional Uyghur medicinal herb *Hyssopus officinalis* L. extract and its effect on asthmatic rats with airway inflammation

EKIM Mahsum¹, ENAYAT Xohrat², TAX Ayxam¹, YUSUP Abdiryim³

1. Institute of Traditional Uyghur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Basic Medical, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Group Medicine of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

收稿日期:2015-05-08;修回日期:2015-06-24

基金项目:新疆少数民族科技人才特殊培养计划科研项目(201323122)

作者简介:麦合苏木·艾克木,副教授,研究方向为维吾尔医药作用机制研究及新药开发,电子邮箱:mahsum008@126.com;阿不都热依木·玉苏甫(通信作者),教授,研究方向为维吾尔医药作用机制研究及新药开发,电子邮箱:ayusup@126.com

引用格式:麦合苏木·艾克木,雪合热提·伊纳也提,阿依先木·他西,等.维药神香草超临界CO₂流体萃取物的抗炎、止咳、祛痰作用及其对哮喘大鼠气道炎症的影响[J].科技导报,2015,33(24):69-74.

Abstract This paper studies the anti-inflammatory, antitussive, and expectorant effects of traditional Uyghur medicinal herb *Hyssopus officinalis* L. extract by supercritical CO₂ fluid and its effect on pathological changes in lung tissue of asthmatic rats. The total number of cells and percentage of lymphocytes (Ly), eosinophils (Eos), and neutrophils (Neu) in BALF, the level of TGF-β1 in BALF and lung tissue were measured. The anti-inflammatory effect was studied by the external ear swelling of mice induced by dimethyl benzene. The antitussive effect was studied by the cough model induced by ammonia in mice. The expectorant effect was studied by a mouse model of phenoleo test. They were sensitized with OVA, Al(OH)₃ and DPT vaccine and then were challenged with inhalation of aerosolized OVA solution for preparation of the asthma model. The level of lung tissue and BALF TGF-β1 were determined with ELISA, and the total number of cells and percentage of Ly, Eos, and Neu in BALF were counted by light microscopy. The experimental results showed that the extract significantly inhibited xylene-induced ear edema in mice ($P<0.05$), reduced the number of ammonia spray-induced cough in mice ($P<0.05$), and promoted the phenol red excretion of the trachea ($P<0.05$), so that the latency was significantly prolonged in asthmatic guinea pigs ($P<0.05$) and a dose-dependent trend was shown. As compared with those of the asthma model group, the level of TGF-β1, total number of cells and percentage of Ly, Eos, and Neu in BALF and the level of lung tissue TGF-β1 were significantly lower in the treated groups ($P<0.05$). The results indicated that *Hyssopus officinalis* L. extract had outstanding anti-inflammatory, antitussive, and expectorant effects, and it inhibited secretion of TGF-β1, Ly, Eos, and Neu, reducing the airway inflammation of asthma.

Keywords *Hyssopus officinalis* L. extract by supercritical CO₂ fluid; anti-inflammatory, antitussive and expectorant effects; airway inflammation of asthma

神香草为唇形科植物欧神香草(*Hyssopus officinalis* L.)的干燥地上部分,主要产于新疆北部山区(阿尔泰山地区盛产),印度、伊朗等国也有分布。神香草是维医常用药材,维吾尔名为祖帕,常用于治疗哮喘、胸肺黏稠性顽疾及气管炎引起的咳嗽、气喘、感冒发烧和风湿等,均被《中华人民共和国卫生部药品标准,维吾尔药分册》、《中华本草,维吾尔药卷》记载,含挥发油、黄酮、生物碱、多糖等化学成分^[1,2]。

超临界流体萃取技术是当今方兴未艾的一种新型分离技术,具有萃取温度低、时间短、提取率高且无环境污染等优点^[3],近年来广泛应用于中药有效成分的提取、分离。但至今尚未见有关神香草超临界CO₂流体萃取物及其抗炎、止咳、祛痰、平喘作用等方面的研究报道。本研究探讨神香草超临界CO₂流体萃取物的抗炎、止咳、祛痰作用及其对哮喘大鼠气道炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

神香草由新疆维吾尔自治区维吾尔医院药房提供,经该医院制剂中心质检部鉴定为唇形科植物硬尖神香草(*Hyssopus officinalis* L.)的干燥地上部分(批号:20120421),二甲苯(天津市福晨化学试剂厂,批号:100909),酚红(天津市福晨化学试剂厂,批号:110908),浓氨水(天津市福晨化学试剂厂,批号:110905),三氯化铝(天津市福晨化学试剂厂,批号:110406),氨茶碱(0.1 g/片,四川锡成药业有限公司,批号:11070223),急支糖浆(太极集团重庆涪陵制药厂有限公司,批号:20111201),卵清白蛋白OVA(美国Sigma公司,批号:A8040),氢氧化铝干粉(西安化学试剂厂,批号:050912),吸附百白破联合疫苗(成都生物制品研究所,批号:

2007126008-3),大鼠转化生长因子-β1(TGF-β1)ELISA检测试剂盒(上海联硕生物科技有限公司,批号:YY-2856C),无水乙醇、氯化钠、无水硫酸钠(分析纯)。

1.2 仪器

SFE-221-50-6型1L-SFE-CO₂萃取装置(江苏南通华安有限公司),冷却水循环装置CA-1111(上海爱浪仪器有限公司),BL1500电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),UV-240型分光光度计(日本岛津公司),SpectraMax M5型酶标仪(美国Molecular Devices),鱼跃402AI型超声雾化器(九州医疗器械有限公司)。

1.3 神香草超临界CO₂流体萃取物的制备

按照发明专利《一种用CO₂超临界萃取神香草挥发油的方法及其用途》(专利号:201310362139.6)中的方法制备^[4],即称取干燥神香草100 g粉碎,过20目筛,采用超临界CO₂流体萃取的方法制备其萃取物,萃取条件为萃取压力20 MPa,用75%的携带剂量在40℃下萃取90 min,CO₂流速35 L/h,萃取收率达到5.5%。

1.4 实验动物

昆明种小鼠18~22 g,雌雄兼用。雄性健康Wistar大鼠160~180 g,由新疆医科大学实验动物中心提供(生产许可证:SCXK(新)2011-0004)。

1.5 神香草超临界CO₂流体萃取物(SFE)的抗炎、止咳、祛痰作用

1.5.1 神香草超临界CO₂流体萃取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响(抗炎作用)

取昆明种小鼠50只,按文献[5]方法随机分为模型对照组、急支糖浆阳性对照组、神香草超临界CO₂流体萃取物高剂量组、中剂量组、低剂量组,以0.2 mL/10 g分别灌胃给药灭菌

生理盐水、急支糖浆(5.0 g/kg)及高、中、低剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物(2.7、1.35、0.675 g/kg),1次/d,连续7 d,末次给药后30 min,各组小鼠均在小鼠右耳前、后面均匀涂二甲苯20 μL致炎,1 h后颈椎脱臼处死小鼠,剪下两耳,用直径9 mm打孔器分别在两耳的同一部位打下圆耳片,称重,计算肿胀度、肿胀抑制率。

耳肿胀度(mg)=右耳片重-左耳片重;

肿胀抑制率(%)=[(空白对照组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白对照组平均肿胀度]×100%。

1.5.2 神香草超临界CO₂流体萃取物对浓氨水致小鼠咳嗽反应的影响(止咳作用)

取昆明种小鼠50只,按文献[6]方法随机分为模型对照组、急支糖浆阳性对照组、神香草超临界CO₂流体萃取物高剂量组、中剂量组、低剂量组,分别灌胃给药灭菌生理盐水、急支糖浆及高、中、低剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物(剂量同上),1次/d,连续7 d,灌胃体积均为0.2 mL/10 g,末次给药后1 h,将小鼠逐一放入4 L密闭干燥容器内,恒压喷入25%浓氨水气雾,喷雾5 s引咳,观察其咳嗽潜伏期及2 min内咳嗽次数。

1.5.3 神香草超临界CO₂流体萃取物对小鼠气管段酚红分泌量的影响(祛痰作用)

取昆明种小鼠50只,按文献[7]方法随机分为模型对照组、急支糖浆阳性对照组、神香草超临界CO₂流体萃取物高剂量组、中剂量组、低剂量组,分别灌胃给药灭菌生理盐水、急支糖浆及高、中、低剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物(剂量同上),1次/d,连续7 d,灌胃体积均为0.2 mL/10 g,最后一次给药后30 min,每只小鼠腹腔注射5%酚红生理盐水溶液0.2 mL/20 g体重,30 min后处死小鼠,仰位固定,颈部拉直,解剖分离气管,将各气管段放入预先盛有1.5 mL 5% NaHCO₃溶液的试管中,超声波清洗,使气管段中的酚红完全释放,清洗液离心,取上清液于分光光度计546 nm处比色,测定OD值,以酚红标准曲线计算酚红分泌量。

1.6 神香草超临界CO₂流体萃取物对哮喘大鼠气道炎症的影响

1.6.1 动物分组和哮喘模型制备

取雄性健康Wistar大鼠50只随机分为正常对照组、哮喘模型对照组、氨茶碱阳性对照组和神香草超临界CO₂流体萃取物高、中、低剂量治疗组。除正常组外,各组大鼠于实验第1天腹腔注射1 mL抗原液(含10 mg卵清蛋白(OVA),100 mg Al(OH)₃,5×10⁹个百白破疫苗)以初次致敏,实验第8天重复一次以加强致敏。正常对照组给予灭菌生理盐水。从实验第15天开始,每天一次以10% OVA生理盐水雾化吸入20 min以激发引喘(正常对照组以生理盐水代替),待出现皮肤瘙痒、烦躁不安、点头呼吸、张口呼吸、呼吸急促、腹式呼吸明显等症状,最后反应迟钝时,表明引喘成功。

1.6.2 药物干预

各组大鼠于每次雾化吸入前30 min给予灌胃。正常对

照组给予灌胃生理盐水1 mL,哮喘模型对照组给予灌胃生理盐水1 mL,氨茶碱阳性对照组给予灌胃氨茶碱0.1 g/kg,高、中、低给药组分别给予灌胃神香草超临界CO₂流体萃取物2.7、1.35、0.675 g/kg。

1.6.3 标本采集

实验第21天,最后一次雾化吸入后24 h内,将各组大鼠腹腔注射10%的水合氯醛0.3 mL/100 g以麻醉。迅速开胸,暴露气管和双肺,在甲状软骨处上方剪开一T形缺口,插入磨平的针头,用备好的丝线结扎固定。再用注射器吸取5%生理盐水3 mL,立即回抽,收集支气管肺泡灌洗液(BALF),灌洗3次,回收的BALF以4℃,2000 r/min离心10 min,分离上清液及沉淀物,分别放于-4℃冰箱内保存。取左肺组织放于液氮中保存。取右肺中叶组织固定于10%的甲醛溶液,备用。

1.6.4 病理组织学检查

将10%甲醛固定48 h后的肺组织取材,逐级酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察。

1.6.5 哮喘大鼠BALF中的细胞总数计数及分类

将BALF离心后沉淀物,用100 μL 10%小牛血清-PBS重悬细胞,吸取0.1 mL置于细胞计数板上,在显微镜下计数细胞总数。吸取0.01 mL涂片,制作3张涂片,瑞氏染色后,进行细胞分类计数,测定细胞总数及淋巴细胞(Ly)、嗜酸性粒细胞(Eos)、中性粒细胞(Neu)的百分比。

1.6.6 哮喘大鼠BALF及肺组织水平转化生长因子-β1(TGF-β1)检测

将肺组织和BALF离心上清液,严格按照大鼠TGF-β1 ELISA试剂盒说明,分别检测各组哮喘大鼠肺组织和BALF中的TGF-β1水平。用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(OD值),通过标准曲线计算各组大鼠肺组织和BALF中TGF-β1浓度。

1.7 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学处理,数据以($\bar{x} \pm s$)形式表示,采用单因素方差分析,以P<0.05为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 神香草超临界CO₂流体萃取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响(抗炎作用)

结果显示,致炎后各组小鼠右耳立刻出现高度红肿现象,急支糖浆阳性对照组和3个不同剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物给药组对二甲苯所致的小鼠耳肿胀均有明显抑制作用(P<0.05),3个不同剂量的给药组肿胀抑制率呈明显的剂量依赖关系,抑制作用随剂量的增加而增加(P<0.05),结果见表1。实验结果验证,在以血管通透性增加为主要改变的急性炎症模型实验中,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著抑制二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀炎症反应,说明其具有抗炎作用。

表1 神香草超临界CO₂流体萃取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of *Hyssopus officinalis* L. extract by CO₂ supercritical fluid on xylene-induced mouse ear swelling ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	耳肿胀/mg	抑制率/%
模型对照组	10	—	6.65±0.28	—
急支糖浆阳性对照组	10	5.0	3.09±0.41*	53.53
SFE高剂量组	10	2.7	3.01±0.47 ^{#Δ}	54.75
SFE中剂量组	10	1.35	4.34±0.39*	34.73
SFE低剂量组	10	0.675	4.94±0.33*	25.71

注:与模型对照组比较,*P<0.05;与急支糖浆阳性对照组比较,#P<0.05;与神香草超临界CO₂流体萃取物各剂量组之间组比较,ΔP<0.05;下同。

2.2 神香草超临界CO₂流体萃取物对浓氨水致小鼠咳嗽反应的影响(止咳作用)

急支糖浆阳性对照组和3个不同剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物给药组对浓氨水致小鼠咳嗽反应有明显的抑制作用,能延长小鼠咳嗽反应的潜伏期(P<0.05),并减少咳嗽次数(P<0.05),3个不同剂量的给药组止咳作用呈明显的剂量依赖关系(P<0.05),见表2。实验结果验证,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著抑制浓氨水喷雾引起的小鼠咳嗽反应及延长咳嗽潜伏期,提示其作用于有关化学感受器,抑制支气管黏膜对刺激的反应性而表现出镇咳作用。

表2 神香草超临界CO₂流体萃取物对浓氨水致小鼠咳嗽的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of *Hyssopus officinalis* L. extract by CO₂ supercritical fluid on ammonia induced cough ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	咳嗽次数	咳嗽潜伏期/s
模型对照组	10	—	56.1±2.28	29.6±4.07
急支糖浆阳性对照组	10	5.0	20.7±0.71*	63.5±6.80
SFE高剂量组	10	2.7	20.1±0.38 ^{#Δ}	64.7±4.90
SFE中剂量组	10	1.35	22.1±0.45*	51.8±5.16
SFE低剂量组	10	0.675	33.4±1.39*	39.4±4.03

2.3 神香草超临界CO₂流体萃取物对小鼠气管段酚红分泌量的影响(祛痰作用)

急支糖浆阳性对照组和3个不同剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物给药组能明显提高小鼠呼吸道酚红分泌量(P<0.05),3个不同剂量的给药组祛痰作用呈明显的剂量依赖关系(P<0.05),见表3。实验结果验证,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著促进小鼠气管段酚红分泌量,提示神香草

全草挥发油具有明显的祛痰作用。

表3 神香草超临界CO₂流体萃取物对小鼠气管段酚红分泌量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *Hyssopus officinalis* L. extract by CO₂ supercritical fluid on mouse trachea phenol red excretion ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	酚红质量浓度/(μg·mL ⁻¹)
模型对照组	10	—	0.60±0.58 ^{#Δ}
急支糖浆阳性对照组	10	5.0	1.31±0.28 ^{#Δ}
SFE高剂量组	10	2.7	1.58±0.21 ^{#Δ}
SFE中剂量组	10	1.35	1.32±0.30*
SFE低剂量组	10	0.675	1.14±0.49*

2.4 哮喘大鼠的一般状态

哮喘模型组在雾化激发过程中均出现烦躁不安、呼吸加快、四肢瘫软、行动迟滞或俯伏不动等症状;严重者可见呼吸急促,呼吸节律不整,紫绀,痉挛,抽搐等;激发后体重减轻,反应迟钝。服用神香草超临界CO₂流体萃取物后,上述症状均可获得不同程度的改善。

2.5 肺组织病理学变化

正常对照组支气管管腔规则完整,上皮细胞无脱落,肺泡腔完整,未见炎性细胞浸润(图1(a));哮喘模型对照组上

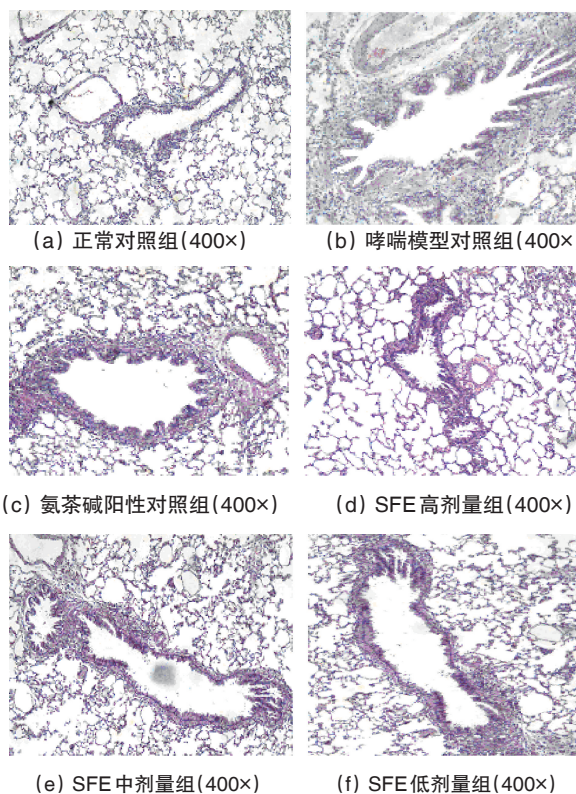


图1 大鼠肺组织病理学变化

Fig.1 Pathological changes of the lung tissue of rats

皮细胞脱落并有黏液栓形成,支气管管腔基底膜明显增厚,血管壁增厚周围有炎性细胞浸润,支气管黏膜下层及黏膜外层有大量炎性细胞浸润(图1(b));氨茶碱阳性对照组支气管上皮完整,管壁周围有少量炎性细胞浸润(图1(c));神香草超临界CO₂流体萃取物低剂量组黏膜层有部分脱落,仍有一定的炎性细胞浸润,其中高、中剂量组与哮喘模型组相比,炎症现象明显缓解(图1(d)~(f))。

2.6 大鼠BALF中的细胞总数及Ly、Eos、Neu百分比的比较

氨茶碱阳性对照组和3个不同剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物给药组能明显降低BALF中的细胞总数及Ly、Eos、Neu百分比($P<0.05$),3个不同剂量给药组气道炎症细胞抑制作用呈明显的剂量依赖关系($P<0.05$),见表4。实验结果验证,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著降低哮喘大鼠BALF中的细胞总数及Ly、Eos、Neu百分比,提示神香草超临界CO₂流体萃取物具有明显的气道炎症细胞抑制作用。

表4 各组哮喘大鼠BALF中的细胞总数及各种炎症细胞的百分比比较($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Total number of cells and counts of inflammatory cells in BALF of asthmatic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞总数/ 10 ⁶ L ⁻¹	Ly/%	Eos/%	Neu/%
正常对照组	1.61±0.33	1.35±0.42	0.79±0.66	1.06±0.79
哮喘模型对照组	12.504±1.52*	6.33±0.36 [†]	11.69±1.84*	4.23±1.19*
氨茶碱阳性对照组	2.96±0.63 ^{#Δ}	2.12±0.42 ^{#Δ}	2.23±0.36 ^{#Δ}	2.08±0.55 ^{#Δ}
SFE高剂量组	1.80±0.67 ^{#Δ}	2.01±0.52 ^{#Δ}	1.89±0.51 ^{#Δ}	1.95±0.66 ^{#Δ}
SFE中剂量组	2.83±0.26 ^{#Δ}	2.20±0.62 ^{#Δ}	2.06±0.62 ^{#Δ}	2.09±0.41 ^{#Δ}
SFE低剂量组	4.21±1.32 ^{#Δ}	3.13±0.67 ^{#Δ}	4.66±0.66 [#]	3.31±1.11 [#]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与哮喘模型对照组比较,# $P<0.05$;与各剂量组之间组比较,Δ $P<0.05$;下同。

2.7 各组哮喘大鼠BALF及肺组织TFG-β1水平比较

氨茶碱阳性对照组和3个不同剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物给药组能明显降低哮喘大鼠肺组织及BALF中的TFG-β1的水平($P<0.05$),3个不同剂量给药组降低哮喘大鼠肺组织及BALF中的TFG-β1的水平呈明显的剂量依赖关系($P<0.05$),见表5。实验结果验证,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著降低哮喘大鼠肺组织及BALF中的TFG-β1的水平,提示神香草超临界CO₂流体萃取物具有明显的转化生长因子β1抑制作用。

表5 神香草超临界CO₂流体萃取物对肺组织、BALF中TFG-β1水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of *Hyssopus officinalis* L. extract by CO₂ supercritical fluid on the level of TFG-β1 in BALF and lung tissue serum of asthmatic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TFG-β1/(pg·mL ⁻¹)	
			肺组织	BALF
正常对照组	10	—	69.17±11.06	26.66±4.30
哮喘模型对照组	10	—	195.14±10.41	76.85±6.29
氨茶碱阳性对照组	10	0.10	126.85±10.81 ^{#Δ}	47.64±6.04 ^{#Δ}
SFE高剂量组	10	2.7	106.59±13.25 ^{#Δ}	34.60±4.22 ^{#Δ}
SFE中剂量组	10	1.35	121.35±20.07 ^{#Δ}	47.53±6.13 ^{#Δ}
SFE低剂量组	10	0.675	146.11±18.35 [#]	58.45±5.55 [#]

3 讨论

神香草是维医治疗哮喘、支气管炎等疾病良药,也是新疆特色药用植物之一。以往对神香草抗哮喘药效物质及其作用机制进行研究,发现神香草水提物、醇提物、乙酸乙酯萃取物等不同萃取物及其总黄酮提取物均具有抗炎、止咳、平喘作用,其中总黄酮能够改善肺组织病理改变,减轻哮喘气道炎症^[8-10],加之近年在新疆维吾尔自治区人工种植神香草获得成功,为开发和利用神香草的药用价值提供了充足的物质资源,因此,开发和利用维药神香草具有重大的实际意义和较高的学术价值。研究报道,挥发油是维药神香草的主要活性组分或成分之一,具有显著的抗炎、抑菌、解痉作用^[11-13]。采用水蒸气蒸馏法提取挥发油是目前常用方法,但提取率低,所需时间长。超临界流体萃取作为提取效率高的绿色提取分离技术,在中医药有效成分的提取、分离方面已得到了日益广泛的应用。前期神香草超临界CO₂流体萃取物的制备研究中发现^[14],神香草超临界CO₂流体萃取物的萃取得率为5.5%,而水蒸气蒸馏法提取维药神香草挥发油的提取率为0.68%,且两者化学组成或成分上存在显著差异。挥发油中化合物成分较多,既有含量较低的正己酸、薄荷酮、薄荷醇、薄荷脑等一些小分子化合物,也有亚油酸、棕榈酸、(+)-斯巴醇、二十一烷、香茅酸、二十六烷、二十四烷、二十烷等大分子的化合物。而超临界萃取物所含化合物比挥发油少,其中小分子化合物也不同且量较少,但在包含这些大分子化合物的基础上还多了γ-谷甾醇、亚麻酸、亚麻酸乙酯等目前被认为具有许多生物活性的化合物且含量较高。

哮喘是由多种炎症细胞在气道浸润和聚集的气道慢性炎症性疾病,哮喘发作时表现为呼气性呼吸困难,烦躁不安,并常伴有咳嗽,喉中痰鸣等症状。目前认为,哮喘是多种炎症细胞、炎症介质、细胞因子相互作用构成引起、加重炎症的复杂网络。Ly、Eos、Neu是哮喘发作时最主要的炎症细胞,

Eos的浸润是气道炎症发生的中心环节,通过释放已经生成并储存于细胞内的炎症介质和新生炎症介质起作用,损伤气道上皮,是哮喘急性发作时的主要病理特征之一。近年来,生长因子与哮喘的关系引起越来越多学者的关注,其中TFG-β1在哮喘的发病过程中有重要的作用,近年研究表明,气道中TGF-β1表达增高,能刺激气道平滑肌细胞(airway-smooth muscle cell, ASMC)释放IL-8,诱导环氧化酶(cyclooxygenase, COX)-2和前列腺素(PG)E2的产生,从而参与气道的炎症反应^[15]。因此根据哮喘的气道炎症的发病特点和发作的主要临床表现症状,通过抗炎、止咳、祛痰试验和哮喘大鼠模型实验来探讨探讨神香草超临界CO₂流体萃取物抗炎、止咳、祛痰作用及其对哮喘大鼠气道炎症的影响。

维药神香草超临界CO₂流体萃取物抗炎、止咳、祛痰作用研究结果显示,神香草超临界CO₂流体萃取物能显著抑制二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀炎症反应($P<0.05$),提示其能够抑制血管通透性增加为主要改变的急性炎症。同样剂量的神香草超临界CO₂流体萃取物显著抑制浓氨水喷雾引起的小鼠咳嗽反应及延长咳嗽潜伏期($P<0.05$),提示其作用于有关化学感受器,抑制支气管黏膜对刺激的反应性而表现出镇咳作用。另外,神香草超临界CO₂流体萃取物显著促进小鼠气管段酚红排泄量($P<0.05$),并呈现剂量依赖性,说明其具有明显祛痰作用。神香草超临界CO₂流体萃取物对哮喘大鼠气道炎症的影响研究结果表明,与模型组相比,各剂量组大鼠血清及BALF中细胞总数及Ly、Eos、Neu的百分比、TFG-β1水平及肺组织TFG-β1水平均明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),呈现剂量依赖性趋势。由此推测,维药神香草超临界CO₂流体萃取物可能通过抑制Ly、Eos、Neu等炎症细胞及细胞因子TGF-β1的分泌,减轻或改善哮喘的气道炎症。

4 结论

神香草超临界CO₂流体萃取物的抗炎、止咳、祛痰作用及减轻或改善哮喘气道炎症,为维药神香草的开发利用奠定了基础,至于其作用机理及有效成分的确定有待今后进一步研究。

参考文献(References)

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
State Administration of Traditional Chinese Herbal Editorial Board. Chinese herbal medicine, part of uyghur medicine[M]. Shanghai: Publishing House of Shanghai Science and Technology, 2005.

[2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
Pharmacopoeia Committees of the People's Republic of China Ministry of Health. Drug standard of Ministry of Public Health of the Peoples's Republic of China, part of Uyghur medicine[M]. Urumqi: Publishing House of Xinjiang Science and Technology, 1999.

[3] Occhipinti A, Capuzzo A, Arceusz A, et al. Comparative analysis of α- and β-thujone in the essential oil and supercritical CO₂ extract of sage (*Salvia officinalis* L.)[J]. Journal of Essential Oil Research, 2014, 26(2): 85-90.

[4] 阿不都热依木·玉苏甫, 麦合苏木·艾克木, 安尼瓦尔·托乎提. 一种用CO₂超临界萃取神香草全草挥发油的方法及其用途: 中国, 201310362139.6 [P]. 2013-08-19.
Yusup Abdiryim, Ekim Mahsum, Tohti Aniwar. Preparation method and use of supercritical CO₂ fluid extraction extract of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. or *Hyssopus officinalis* L.: China, 201310362139.6[P]. 2013-08-19.

[5] 麦合苏木·艾克木, 努尔江·肉孜, 于洋, 等. 维药神香草乙酸乙酯部位抗炎、止咳、祛痰及平喘作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(4): 39-41.
Ekim Mahsum, Rozi Nurjan, Yu Yang, et al. A study on anti-inflammatory, antitussive, expectorant, and anti-asthmatic effects of Ethyl Aectates from Uighur Medicine *Hyssopus officinalis* L.[J]. Journal of Medicine & Pharmacy of Chinese Minorities, 2014, 20(4): 39-41.

[6] 麦合苏木·艾克木, 努尔江·肉孜, 阿不都热依木·玉苏甫. 维药神香草总黄酮抗炎、止咳、祛痰及平喘作用研究[J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(4): 403-406.
Ekim Mahsum, Rozi Nurjan, Yusup Abdiryim. A study on anti-inflammatory, antitussive, expectorant, and anti-asthmatic effects of Total flavonoids from Uighur Medicine *Hyssopus officinalis* L.[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2014, 37(4): 403-406.

[7] Na H, Chang C, Wang Y, et al. The in vivo expectorant and antitussive activity of extract and fractions from *Reineckia carnea*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 130: 220-223.

[8] 阿孜古丽·吐鲁洪, 努尔江·肉孜, 于洋, 等. 维药神香草不同提取物的镇咳、祛痰作用比较研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(17): 10-13.
Turgun Arziguli, Rozi Nurjan, Yu Yang, et al. Contrast research on antitussive and expectorant effects of different extracts from *Hyssopus officinalis* L.[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2014, 10(17): 10-13.

[9] 麦合苏木·艾克木, 努尔江·肉孜, 阿不都热依木·玉苏甫. 维药神香草乙酸乙酯部位对大鼠实验性哮喘炎症反应的影响[J]. 科技导报, 2011, 29(30): 52-56.
Ekim Mahsum, Rozi Nurjan, Yusup Abdiryim. Effect of Uyghur medicine *Hyssopus officinalis* L. ethyl aectate on inflammatory response in athmatic rats[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(30): 52-56.

[10] 麦合苏木·艾克木, 努尔江·肉孜, 阿不都热依木·玉苏甫. 维药神香草总黄酮对卵清白蛋白致大鼠哮喘模型气道炎症的影响[J]. 科技导报, 2013, 31(36): 71-75.
Ekim Mahsum, Rozi Nurjan, Yusup Abdiryim. Effect of Uyghur medicine *Hyssopus officinalis* L. total flavonoids on airway inflammation in voalbumin-induced athmatic rats[J]. Science & Technology Review, 2013, 31(36): 71-75.

[11] 赵军, 徐芳, 贺金华, 等. 硬尖神香草化学成分研究[J]. 中药材, 2013 (1): 54-57.
Zhao Jun, Xu Fang, He Jinhua, et al. Study on chemical constituents of *Hyssopus cuspidatus*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013 (1): 54-57.

[12] Fathiazad F, Hamedeyazdan S. A review on *Hyssopus officinalis* L. composition and biological activities[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, 5(17): 1959-1966.

[13] Lu M, Battinelle L, Daneile C, et al. Muscle relaxing activity of *Hyssopus officinalis* essential oil on isolated intestinal preparations[J]. Planta Medica, 2002, 68(3): 213.

[14] 祖丽菲亚·吾斯曼, 努尔江·肉孜, 买吾拉尼江·依孜布拉, 等. 维药神香草挥发油与超临界CO₂流体萃取物化学成分的比较研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(7): 889-891.
Osman Zulpiya, Rozi Nurjan, Hizbulla Mawlanjan, et al. Chemical constituents comparison of the volatile oil and supercritical CO₂ fluid extraction extracts of *Hyssopus officinalis* L. a traditional Uyghur medicinal hreb[J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2015, 38(7): 889-891.

[15] Fong C Y, Pang L, Holland E, et al. TGF-β1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway muscle cells[J]. AJP Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000, 279(1): 1201-1207.

(责任编辑 吴晓丽)