

指纹图谱与保肝作用的谱效关系[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(2): 116-118.

[4] 张程荣, 曹 岗, 张 云, 等. 山茱萸的化学、药理与炮制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(9): 2002-2005.

[5] 呼 梅, 宋 英, 袁强华. 五味子煮散颗粒煎煮工艺优化及其煎煮质量评价[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1448-1450.

[6] 齐敏芳, 付忠广, 景 源, 等. 基于信息熵与主成分分析的火电机组综合评价方法[J]. 中国电机工程学报, 2013, 33(2): 58-64.

[7] 张 东, 张 宁. 物理学中的熵理论及其应用研究[J]. 北京联合大学学报, 2007, 21(1): 4-8.

[8] 王仁杰, 李 森, 闫 明, 等. 信息熵理论在热毒宁口服制剂中金银花与栀子提取工艺优选中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(5): 683-687.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 28, 67.

[10] 刘少静, 杨黎彬, 王小宁, 等. 五味子中总木脂素的提取工艺优化研究[J]. 应用化工, 2014, 43(6): 1071-1073.

[11] 励建荣, 夏道宗. 山茱萸中马钱素的提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(10): 45-47.

[12] 关志宇, 罗晓健, 黄 潇, 等. 胆胃通颗粒剂制备工艺研究[J]. 中成药, 2014, 36(1): 185-188.

[13] 靳瑞婷, 陶永华, 李雪峰, 等. 芪白平肺颗粒中人参和黄芪提取工艺的优化[J]. 中成药, 2016, 38(2): 795-800.

[14] 吴 璐, 杨华生. 基于信息熵理论的中药提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 29-31.

[15] 贺福元, 邓凯文, 黄 胜, 等. 中药群体指纹图谱信息量和一次投料量数学模型的建立及对大黄和鱼腥草实验研究[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1292-1298.

[16] 黄 瑛, 严云良, 余陈欢, 等. 基于信息熵原理的祛瘀清热颗粒指纹图谱最适进样量的研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 185-188.

黄连-厚朴药对 9 个配伍比例对抑制神经氨酸酶活性的影响

陈 高, 吴巧凤, 张小霞, 严云良*
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: 目的 探索黄连-厚朴药对 9 个配伍比例 (0:1、1:5、2:5、2:3、1:1、3:2、5:2、5:1、1:0) 对抑制神经氨酸酶活性的影响。**方法** 底物荧光检测法测定不同配伍比例药对对神经氨酸酶的抑制活性, 非线性回归法确定量效曲线参数, 建立三维响应曲面模型, 响应面法分析配伍比例与抑制作用的关系。**结果** 各配伍比例药对对神经氨酸酶均有抑制活性, 在 1:1 时作用最强。配伍比例在 0.55:1~1.11:1 时, 药对表现出明显的协同作用 (作用强度 -0.800), 而其他配伍比例下协同作用较弱, 或产生相加甚至拮抗作用。**结论** 该方法可为黄连-厚朴药对治疗流感时配伍比例的选择提供依据。

关键词: 黄连-厚朴药对; 配伍比例; 神经氨酸酶; 抑制作用; 响应面法

中图分类号: R289 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)07-1394-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.014

Effects of nine compatibility proportions of *Coptidis Rhizoma-Magnoliae officinalis Cortex* drug pair on the inhibition of neuraminidase activity

CHEN Gao, WU Qiao-feng, ZHANG Xiao-xia, YAN Yun-liang*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

KEY WORDS: *Coptidis Rhizoma-Magnoliae officinalis Cortex* drug pair; compatibility proportion; neuraminidase; inhibitory activity; response surface method

收稿日期: 2016-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81274030/H2803, 81473335/H2803); 浙江省自然科学基金项目 (LY15H290003); 浙江省重中之重一级学科 (中药学) 建设-浙江中医药大学开放基金 (Yao2016015)

作者简介: 陈 高 (1991—), 男, 硕士生, 从事中药活性成分及新药开发研究。Tel: 13758128942, E-mail: 635864699@qq.com

* 通信作者: 严云良 (1965—), 男, 副教授, 从事医药数理统计分析研究。Tel: (0571) 86633110, E-mail: yyllhz123456@sina.com

药对是依据中医配伍理论形成的相对固定的2味常用中药的配伍组合^[1],为方剂组成的基本形式,能很好地诠释中药“合群妙用”的特点^[2]。其不同配伍可产生协同、拮抗、相加等作用^[3],目前研究方法有辐射分析法、概率分析法、响应面法等^[4]。

黄连-厚朴药对源自宋代王怀隐《太平圣惠方》中的“厚朴丸”,两药配伍,共奏行气燥湿、平调寒热之功,收涩止泻、行气止痛之效^[5],临床上常以不同配伍比例出现于诸多方剂中。现代研究表明,该药对具有止泻、镇痛的药理作用^[5];课题组前期研究发现,其具有显著的抗甲型H₁N₁流感病毒作用^[6],但尚未探明其最佳配伍比例。

神经氨酸酶活性在流感病毒的复制、感染与传播过程中具有重要作用^[7],是流感病毒感染防治的主要靶点之一,目前临床上应用的奥司他韦、扎那米韦等均均为神经氨酸酶抑制剂。本实验在前期研究基础上采用辐射设计,以药对对神经氨酸酶活性的抑制率为评价指标,再通过响应面法进一步考察其配伍比例与抑制作用的关系,为揭示黄连-厚朴药对的配伍用药规律提供科学依据。

1 材料

1.1 药材 黄连(产地四川,批号20150529)、厚朴(产地湖北,批号20150529)均购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室俞冰副教授鉴定,分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rend. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮。

1.2 试剂 生理盐水(浙江莎普爱思药业股份有限公司,批号2A15090928);奥司他韦(瑞士巴塞尔豪夫迈·罗氏有限公司,批号B1354);神经氨酸酶抑制剂筛选试剂盒 P0309 [含1 mL神经氨酸酶荧光底物 2'-(4-methylumbelliferyl)-D-N-acetylneuraminic acid (MUNANA)];50 μL神经氨酸酶、10 mL神经氨酸酶检测缓冲液、1.200 mL Milli-Q水(碧云天生物技术研究);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 FLUOstar OPTIMA 荧光酶标检测仪(德国BMG公司);96孔荧光酶标板(美国COSTAR公司);AB135-S电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ5200超声波清洗器(昆山

市超声仪器有限公司);Centrifuge 5810R 超速离心机(德国Eppendorf公司)。

2 方法与结果

2.1 药对配伍设计 响应面法^[8]可采用多种设计方案,基于分析药物相互作用的要求,本实验采用辐射设计^[4]。将二维坐标均分为8等分,X轴表示黄连单味药,Y轴表示厚朴单味药,即得9个配伍比例,分别为0:1、1:5、2:5、2:3、1:1、3:2、5:2、5:1、1:0,具体见图1(黄连:厚朴以连-朴表示)。

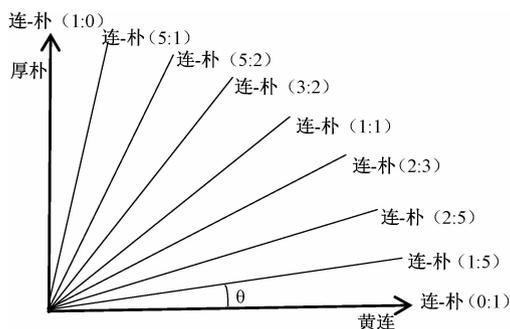


图1 药对9个配伍比例

Fig. 1 Nine compatibility proportions of drug pair

2.2 溶液配制 按上述配伍比例称取黄连、厚朴粗粉,混匀,每份12 g,10倍量水煎煮2次(1.0 h + 0.5 h),过滤,合并滤液,浓缩至相当于含生药量1 g/mL,即得相应提取液,4℃冷藏。临用时,用生理盐水稀释至所需浓度。

2.3 神经氨酸酶抑制率的测定^[9] 在96孔荧光酶标板内加入70 μL神经氨酸酶检测缓冲液、10 μL神经氨酸酶,每孔加入9个不同配伍比例药液各10 μL,使得含生药量分别为32、16、8.0、4.0、2.0、1.0、0.50 mg/mL。同时,设置酶对照组、空白对照组及阳性对照组(奥司他韦,0.100、0.050、0.025、0.010、0.005 mg/mL)。振荡混匀约1 min后,37℃下孵育2 min,以使抑制剂和神经氨酸酶充分相互作用,然后每孔加入10 μL神经氨酸酶荧光底物,振荡混匀约1 min,37℃下孵育20 min后进行荧光测定(激发波长360 nm,发射波长440 nm),按下式计算抑制率和IC₅₀,重复3次,结果见表1。由表可知,不同配伍比例药对对神经氨酸酶的抑制作用有很大差异,在1:1时IC₅₀最小、抑制率最高,即抑制作用最强。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{酶对照组荧光值} - \text{空白对照组荧光值}) - (\text{样品组荧光值} - \text{空白对照组荧光值})}{(\text{酶对照组荧光值} - \text{空白对照组荧光值})} \times 100\%$$

表1 药对对神经氨酸酶的抑制率及 IC₅₀ (n=3)
Tab.1 Inhibition rates and IC₅₀ values of drug pair on neuraminidase (n=3)

指标	黄连-厚朴药对配伍比例								奥司他韦	
	1:0	1:5	2:5	2:3	1:1	3:2	5:2	5:1		0:1
IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	21.10	19.09	15.39	3.80	3.53	13.66	8.90	19.04	19.37	0.02
抑制率/%	62.33	66.59	68.96	81.64	83.29	64.66	67.89	58.42	57.97	92.39

2.4 药对药效学模型 由于中药多成分多靶点共同作用，故采用二次多项式描述两药合用的量效曲线，合并指数来描述其相互作用强度。将合并指数减1，以0为典型的加和作用，可便于绘图。

2.5 模型参数加合构建响应曲面 采用非线性回归法确定量效曲线参数，建立三维响应面模型，应用 Matlab2009a 软件构建响应曲面三维图形。

2.6 药对相互作用评价 在三维响应面模型中，颜色深浅表示该处两药相互作用的强度。当合并指数接近于0时，药物间为相加作用；大于0时，药物间为拮抗作用；小于0时，药物间为协同作用。指数值越高，相互作用强度越大，在响应曲面图中表现为颜色接近于浅色或深色两端，具体见图2和图3。在图2中，X轴表示不同剂量的黄连单味药，Y轴表示不同剂量的厚朴单味药，Z轴表示药对在不同剂量下的抑制率，可知在整个三维响应面中，表现出相加作用的区域较明显，其次是协同作用，拮抗作用区域较小。由图3可知，药对配伍比例在0.550:1~1.110:1时，表现出明显的协同作用（协同作用强度-0.800），而其他配伍比例协同作用较弱，或产生相加甚至拮抗作用。

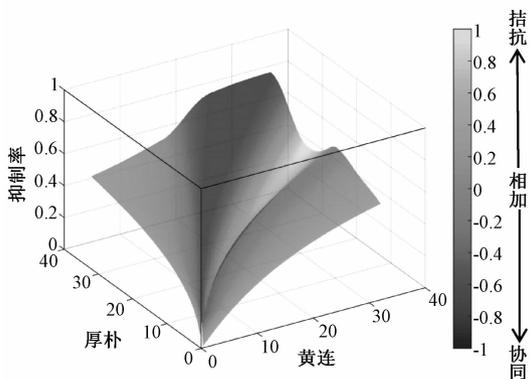


图2 药对响应面图(整体)

Fig.2 Response surface plot of drug pair (whole)

3 讨论

神经氨酸酶能催化水解链接流感病毒与宿主细胞的糖苷键，完成病毒的释放^[10]，导致流感发生，故抑制其活性可减少感染细胞中流感病毒的释放及

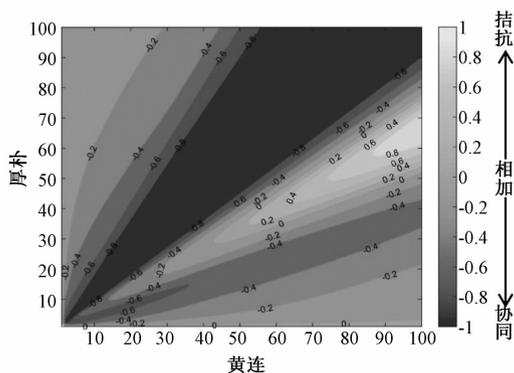


图3 药对响应面图(局部)

Fig.3 Response surface plot of drug pair (part)

扩散，从而阻止其发生^[11]。神经氨酸酶抑制剂和化学药物在治疗流感时易产生毒副作用，而传统中药毒副作用小，并有双向免疫调节作用，故在治疗流感方面发挥着重要作用。

黄连药效成分是以小檗碱为主的生物碱，可明显缓解流感病毒性肺炎小鼠肺组织的炎症损伤^[12-13]；厚朴主要有效成分为厚朴酚与和厚朴酚，对流感性肺炎具有显著的抑制作用^[14]。当黄连-厚朴药对配伍比例为1:1时，小檗碱与厚朴酚、和厚朴酚的提取率最高^[15-16]，有利于发挥其抑制流感得作用。前期课题组发现，该药对对流感小鼠具有显著抑制作用^[6]，本实验在此基础上采用底物荧光检测法考察该药对不同配伍比例对神经氨酸酶的抑制作用，发现在0.55:1~1.11:1范围内表现出明显协同作用。之前对含黄连-厚朴药对的475首古方进行统计^[17]，发现1:1配伍比例出现的频率最高（占总数的45.260%）；在主治普通感冒及流感的方剂中，其出现的频率也最高（占总数得50%），与本实验结果一致，可为其在临床上大多以1:1配伍比例应用提供了佐证。

响应面法可定性、定量地研究药物间药效学相互作用规律，并能寻找最佳阈值反应范围^[8]；辐射设计是一种从全局考虑药物不同配伍比例的方法，相比仅凭临床经验的少数几个参数设计更全面合理，两者合用已应用于药对活血效应^[18]和抗氧化作用^[19]的最佳配伍研究。本实验采用该方法首

次探讨黄连-厚朴药对不同配伍比例对抑制神经氨酸酶活性的影响,可为其治疗流感时配伍比例的选择提供参考,并为其他相关研究提供思路与方法。

参考文献:

[1] 段金庵,宿树兰,唐于平,等. 中药药对配伍组合的现代认识[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(5): 330-333.

[2] 王胜鹏,陈美婉,王一涛. 中药药对的系统研究(I)——理论与物质基础研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, 14(2): 1317-1321.

[3] 龙 项,李 浩,湛延风,等. 中西药物相互作用探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(5): 457-460.

[4] 魏 滨,杨 璐. 麻醉药物药效学相互作用研究方法新进展[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(12): 1041-1046.

[5] 邱志兵,李卫民,高 英,等. 黄连厚朴药对药理作用的研究[J]. 北方药学, 2012, 9(3): 48-49.

[6] 吴巧凤,宓嘉琪,吴新新,等. 黄连香薷饮抗流感病毒作用的拆方研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2057-2059.

[7] Yen H L, Liang C H, Wu C Y, et al. Hemagglutinin neuraminidase balance confers respiratory-droplet transmissibility of the pandemic H1N1 influenza virus in ferrets[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(34): 14264-14269.

[8] 史旭芹,尚尔鑫,唐于平,等. 基于响应面法对当归-黄芪配伍养血补血功效相互作用研究[J]. 药科学报, 2012, 47(10): 1375-1383.

[9] 李 芳,李八方,董诗竹,等. 低分子量海带岩藻聚糖硫酸脂的制备及流感病毒神经氨酸酶抑制活性研究[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(1-2): 106-112.

[10] 杨 帆,刘艾林,杜冠华. 流感病毒神经氨酸酶抑制活性测定方法的标准研究[J]. 药科学报, 2012, 47(6): 730-733.

[11] 张 波,李 玲,卢芳国,等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肺部炎症与神经氨酸酶活性影响的研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 1094-1099.

[12] 吴 莹,李季倩,孟 建,等. 小檗碱抗流感病毒性肺炎小鼠肺组织炎症损伤的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 40-43.

[13] 吴 莹,李季倩,孟 建,等. 小檗碱改善流感病毒性肺炎小鼠肺血管通透性的作用及机制[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(17): 3205-3208.

[14] Wu X N, Yu C H, Cai W, et al. Protective effect of a polyphenolic rich extract from *Magnolia officinalis* bark on influenza virus-induced pneumonia in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 191-194.

[15] 吴安国,曾 宝,林 乔,等. 黄连厚朴配伍在不同提取工艺中主要成分含量的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 19-22.

[16] 王术玲,姚玉铿,曾建波. 黄连-厚朴配伍比例对和厚朴酚、厚朴酚溶出的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 18-20.

[17] 陈 高,吴巧凤,严云良,等. 黄连-厚朴药对配伍的应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(14): 211-216.

[18] 黄美艳,唐于平,尚尔鑫,等. 基于响应面法对归芍药对活血效应相互作用研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1407-1412.

[19] 黄美艳,唐于平,尚尔鑫,等. 当归-川芎药对不同制法与配比抗氧化活性相互作用研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 234-238.