

口炎清颗粒发挥抗炎药效的组方配伍规律研究*

郑艳芳¹, 李楚源², 刘宏¹, 王德勤², 彭维¹, 吴忠¹, 苏薇薇¹
(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;
2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 523325)

摘要: 依据口炎清颗粒各味药材的处方组成比例, 采用均匀设计方法构建其具有不同药材投料比例的差异样品; 通过药效学研究获得诸差异样品的抗炎活性数据; 运用灰色关联分析方法研究口炎清颗粒差异样品药材含量与药效间的关联性, 明确各味药材对抗炎活性的药效贡献及其主次关系: 山银花为发挥抗炎药效的主要贡献者, 与 TNF- α 、IL-8、IL-6 和 IL-1 β 4 个药效指标间的关联度远远大于其余 4 味药材; 玄参、天冬、麦冬 3 味药材与 IL-6 和 IL-1 β 指标关联密切, 与调节多种炎症细胞的增殖、分化及迁移, 以及促进白细胞迁移和黏附分子表达、引起炎症介质的释放相关; 甘草与 TNF- α 指标关联密切, 与诱导 IL-1、IL-6 等细胞因子及炎症介质的产生、促进炎症细胞向病变组织移行相关; 玄参、天冬、麦冬、甘草 4 味药材通过相互补充, 起到增强山银花抗炎药效的作用。

关键词: 口炎清颗粒; 抗炎药效; 灰色关联分析; 组方配伍规律

中图分类号: R961 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2016) 03-0145-06

Formula principles of Kouyanqing granule for the anti-inflammatory effects

ZHENG Yanfang¹, LI Chuyuan², LIU Hong¹, WANG Deqin², PENG Wei¹, WU Zhong¹, SU Weiwei¹
(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Limited Company, Guangzhou 523325, China)

Abstract: The present study was designed to reveal the formula principles of Kouyanqing granule (KYQG) for the anti-inflammatory effects. According to uniform design, eleven KYQG samples with different herb proportions were prepared on the premise of the original formula proportions. Experiments with Human oral keratinocytes (HOK) were conducted to evaluate KYQG samples' anti-inflammation effects. Grey relational analysis approach was used to analyze the relevance between the five herbs and the biological effects in the KYQG samples. The results demonstrated that *Flos lonicerae* (flower bud of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.) is the key herb performing an obviously higher contribution to the regulation of TNF- α , IL-8, IL-6, and IL-1 β . *Radix scrophulariae* (root of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.), *Radix ophiopogonis* (root of *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.), and *Radix asparagi* (root of *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr.) are closely related to IL-6 and IL-1 β . *Radix et rhizoma glycyrrhizae* (root of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) contributes more to the suppression of TNF- α .

* 收稿日期: 2015-10-30

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2012BAI29B00); 广州开发区科技领军人才资助项目 (2015P-158)

作者简介: 郑艳芳 (1989 年生), 女; 研究方向: 中药谱效学; 通讯作者: 苏薇薇; E-mail: lsssw@126.com

The four herbs noted above play a role in strengthening the anti-inflammatory effects of *Flos Lonicerae* (flower bud of *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.).

Key words: Kouyanqing granule; anti-inflammatory effects; grey relational analysis; formula principles

口炎清颗粒是由山银花、玄参、麦冬、天冬、甘草5味药材组成的复方,具有滋阴清热、解毒消肿的功效,临床用于治疗阴虚火旺的口腔炎症疾病^[1-3],收录在《国家基本药物目录》(2012年版)。众所周知,中医理论的精髓在于整体性、用药的辩证和君臣佐使组方。中药复方的特色在于多味药材间的相互配合,然而对于传统的“君臣佐使”理论,绝大部分的中药复方仍缺乏科学实验的支撑,无法被西方医学界所接受。因此,通过药效实验科学解释“君臣佐使”规律,是一件很有意义的工作^[4]。本研究采用灰色关联分析方法,研究了口炎清颗粒组方中的原料药材与抗炎药效间的关联性,明确了各味药材的药效贡献及其主次关系,科学解释了其组方配伍规律;为其他中药复方的组方规律研究提供了范例,对于中药的国际化具有积极意义。

1 材料

1.1 实验药品与试剂

口炎清差异样品浸膏11批(批号:20140815),由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供;牛黄解毒片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号:13121398);地塞米松(中国药品生物制品检定所,批号:100129-201105);香烟(椰树牌,广东中烟工业有限公司);MTT(Sigma, M2128-1G);TNF- α 、IL-8、IL-6、IL-1 β ELISA试剂盒(武汉优尔生公司);RPMI-1640培养基(Hyclone);乙腈(质谱纯, Fisher Scientific);甲酸(质谱纯, Fluka);甲醇(质谱纯, Fisher Scientific);超纯水。

1.2 实验仪器

净化工作台(苏州净化安泰技术有限公司 HT-840型);CO₂培养箱(FORMA Seris 303792-6714型);多孔超微量核酸蛋白分析仪(Botek);数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司 KQ-250DE型);超纯水器(Millipore Simplicity);烘箱(Memmert UFB400);超低温冰箱(海尔BCD-568W);十万分之一电子天平(Sartorius BP211D);冷冻离心机(Eppendorf 5430R);系列精密移液器(Eppendorf)。

2 方法

2.1 差异样品的制备

根据口炎清颗粒的处方组成比例,按照配方约束下5因素11水平的均匀设计^[5],调整5味药材的配比,在此基础上制备11个口炎清差异样品S1-S11。其中山银花变化为16%~36%,玄参0%~42%,麦冬0%~42%,天冬0%~42%,甘草0%~22%。

2.2 药物细胞毒性实验

2.2.1 细胞培养 HOK细胞(人口腔黏膜角化细胞),购自广州吉妮欧生物科技有限公司。培养于RPMI-1640完全培养基(含 $w=10\%$ 胎牛血清,青霉素100 U/mL,链霉素100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7.2),在37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$ CO₂培养箱中。

2.2.2 香烟烟雾提取物的制备^[6-7] 将2支燃烧的椰树牌香烟烟雾用装有10 mL的RPMI-1640培养基(无血清)的50 mL注射器连续抽吸6次,每次50 mL,共300 mL;摇动使其充分溶解,经0.22 μm 微孔膜过滤后,得到100%体积分数的CSE溶液,用RPMI-1640培养基(无血清)稀释到需要的体积分数后加入细胞,使CSE终体积分数为1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%,30 min内用于实验。

2.2.3 药物配置及分组 各药物用RPMI-1640培养基(无血清)配制,口炎清1-11号差异样品(S1-S11)质量浓度为55.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$;地塞米松(Dex)终浓度为1、10、100、1 000 $\mu\text{mol}/\text{L}$;牛黄解毒片(NP)终质量浓度为10、100、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,经0.22 μm 微孔膜过滤后使用。

2.2.4 细胞毒性实验 用完全培养基调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,并铺96孔板,每孔100 μL ,24 h贴壁后除去培养基,加入200 μL 不同组受试药物,空白对照组加入等量的RPMI-1640培养基(无血清),置于含 $\varphi=5\%$ CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养24 h后,按MTT方法进行测定。

2.2.5 数据分析方法 所得计量资料均以均值 \pm 标准差表示。采用SPSS 19.0软件,运用单因素方差分析(ANOVA)和T检验方法进行分析。

2.3 差异样品药理学实验

药效实验分为15组:空白对照组,模型组

($\varphi = 5\%$ CSE), 阳性对照 Dex 组 ($1 \mu\text{mol/L}$), 阳性对照 NP 组 ($10 \mu\text{g/mL}$), 以及口炎清差异样品 1-11 组 ($55.6 \mu\text{g/mL}$)。

用完全培养基调整细胞密度为 4×10^5 个/mL, 并铺 24 孔板, 每孔 0.5 mL, 24 h 贴壁后换成 RPMI-1640 培养基 (无血清), 继续培养一晚上; 然后分别加入 Dex、NP、口炎清差异样品, 空白对照组和模型组给予等量的无血清培养基, 于 $\varphi = 5\%$ CO_2 、 37°C 培养箱培养; 1 h 后各组 (除空白对照组外) 加入终体积分数 5% 的 CSE, 空白对照组给予等量的无血清培养基, 继续孵育 24 h; 最后取细胞上清液, 采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-8、IL-6、IL-1 β 含量。

2.4 灰色关联分析^[8-9]

在本研究中, 实验处理组药效指标的均值用以表征药效高低。在进行药材含量与药效的关联分析之前, 对药效作用原始数据中的负向指标做正向化处理 (取倒数)^[10], 然后再用均值化方法进行无量纲化处理。在此基础上, 将模型组的 4 个药效参数值定义为参考数列, 给药组 (Dex、NP、S1-S11) 定义为比较数列, 利用灰色关联分析方法计算比较数列与参考数列间的灰色关联度, 灰色关联度越高则认为与模型组相似度越高, 即整体药效越差; 利用灰色关联分析方法计算 11 批差异样品中各味药材的含量差异与每个药效指标的药效结果的灰色关联度, 其大小与药材对药效的贡献呈正相关。

3 结果

3.1 不同含量药物的细胞毒性考察

φ (CSE) 的范围在 1% ~ 5% 时, 细胞存活率在 90% 以上, 与空白组比较无显著影响, 在 10% 以上时, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。NP 质

量浓度在 $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率无显著变化, 达到 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时, 存活率显著下降。Dex 组浓度在 $1 \sim 100 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率与空白组比较无显著影响, 在 $1000 \mu\text{mol/L}$ 时细胞存活率显著降低。口炎清差异样品在 $55.6 \mu\text{g/mL}$ 的质量浓度下, S1-S11 组对细胞的存活率均无显著影响。

根据细胞毒性实验结果, 采用以下条件进行 2.3 项实验: CSE 终体积分数为 5%; 牛黄解毒片 (NP) 终质量浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$; 地塞米松 (Dex) 终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$; 口炎清差异样品 (S1-S11) 终质量浓度为 $55.6 \mu\text{g/mL}$ 。

3.2 细胞急性炎症的改善

3.2.1 促炎因子 TNF- α 含量 实验结果 (图 1) 表明, 模型组 TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$), 给药处理后, NP、Dex、差异样品 1、4、5、6 和 11, 均对 TNF- α 升高有显著抑制作用 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2.2 促炎因子 IL-8 含量 实验结果 (图 2) 表明, 模型组 IL-8 含量显著升高 ($P < 0.01$), 给药处理后, NP、Dex、差异样品 5 和 6, 均对 IL-8 升高有显著抑制作用 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2.3 促炎因子 IL-6 含量 实验结果 (图 3) 表明, 模型组 IL-6 含量显著升高 ($P < 0.01$), 给药处理后, Dex、差异样品 1、2、4、5、6、8、9、10 和 11, 均对 IL-6 升高有显著抑制作用 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3.2.4 促炎因子 IL-1 β 的含量 实验结果 (图 4) 表明, 模型组 IL-1 β 含量显著升高 ($P < 0.01$), 给药处理后, NP、Dex、差异样品 3、4、5、6、8、9、10 和 11, 均对 IL-1 β 升高有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。

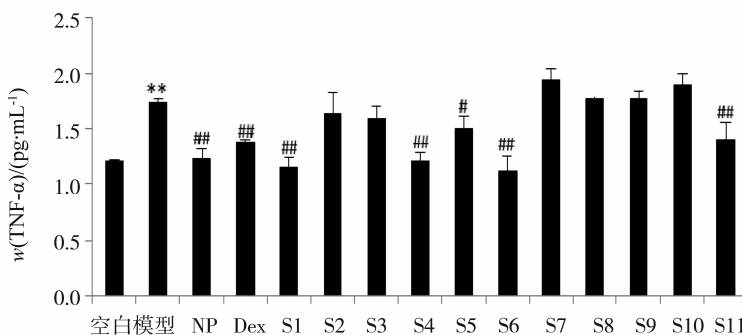


图 1 差异样品对 w (TNF- α) 的影响

Fig. 1 The effects of eleven KYQG samples S1-S11 on TNF- α production

(与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

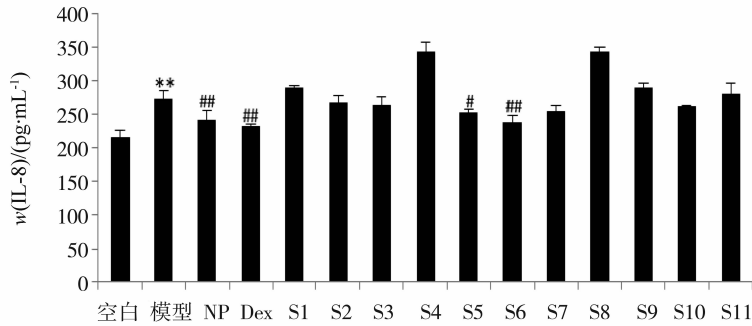
图 2 差异样品对 $w(\text{IL}-8)$ 的影响

Fig. 2 The effects of eleven KYQG samples S1 – S11 on IL – 8 production

(与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

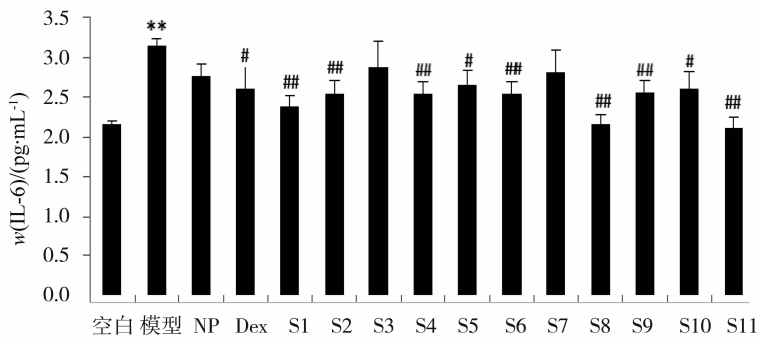
图 3 差异样品对 $w(\text{IL}-6)$ 的影响

Fig. 3 The effects of eleven KYQG samples S1 – S11 on IL – 6 production

(与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

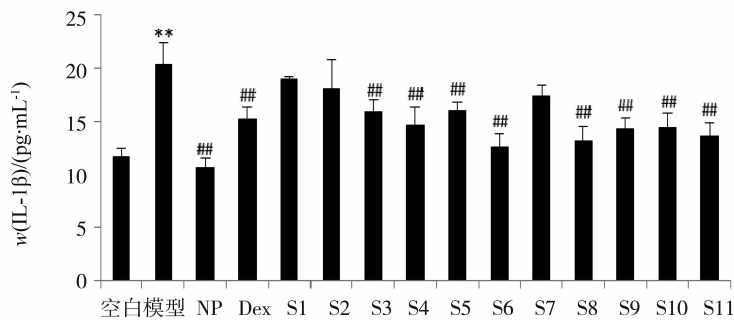
图 4 差异样品对 $w(\text{IL}-1\beta)$ 的影响

Fig. 4 The effects of eleven KYQG samples S1 – S11 on IL – 1β production

(与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)

3.3 药材与药效间灰色关联分析

实验处理组与模型组间的灰色关联度计算结果见表 1。结果表明,所有处理组药效作用的强弱依次为 $S6 > NP > S4 > S11 > Dex > S8 > S1 > S5 > S10 > S9 > S7 > S3 > S2$ 。

各味药材与抗炎药效指标间的灰色关联度计算结果见表 2。计算结果表明,山银花与 $\text{TNF} - \alpha$ 、

IL-8、IL-6 和 IL-1β 等 4 个药效指标间的关联度远远大于其余 4 味药材,为发挥抗炎药效的主要贡献者,体现了其在配伍中的君药地位;玄参、天冬、麦冬 3 味药材与 IL-6 和 IL-1β 指标关联密切,与调节多种炎症细胞的增殖、分化及迁移,以及促进白细胞迁移和黏附分子表达、引起炎症介质的释放相关;甘草与 $\text{TNF} - \alpha$ 指标关联密切,与诱

导 IL - 1、IL - 6 等细胞因子及炎性介质的产生、促进炎细胞向病变组织移行相关；玄参、天冬、麦冬、甘草 4 味药材通过相互补充，起到增强山银花

抗炎药效的作用。

综上，总结出口炎清颗粒中各味药材对抗炎活性的药效贡献及其主次关系如图 5 所示。

表 1 实验处理组与模型组间的灰色关联分析结果

Table 1 The Grey Relational Degree between the model group and the treatment groups

组别	S2	S3	S7	S9	S10	S5	S1	S8	Dex	S11	S4	NP	S6
灰色关联度	0.834 1	0.810 2	0.808 4	0.777 0	0.749 8	0.731 4	0.705 1	0.653 0	0.647 5	0.647 2	0.593 7	0.593 3	0.562 8

表 2 差异样品各味药材与药效指标的灰关联分析结果

Table 2 The Grey Relational Degree between herbs and effect parameters

灰色关联度	IL - 1 β	IL - 6	IL - 8	TNF - α
山银花	0.690 6	0.715 3	0.690 2	0.804 0
玄参	0.574 9	0.573 0	0.497 5	0.520 2
天冬	0.577 9	0.574 8	0.497 8	0.571 2
麦冬	0.544 2	0.558 2	0.500 7	0.556 6
甘草	0.541 2	0.550 9	0.504 0	0.619 0

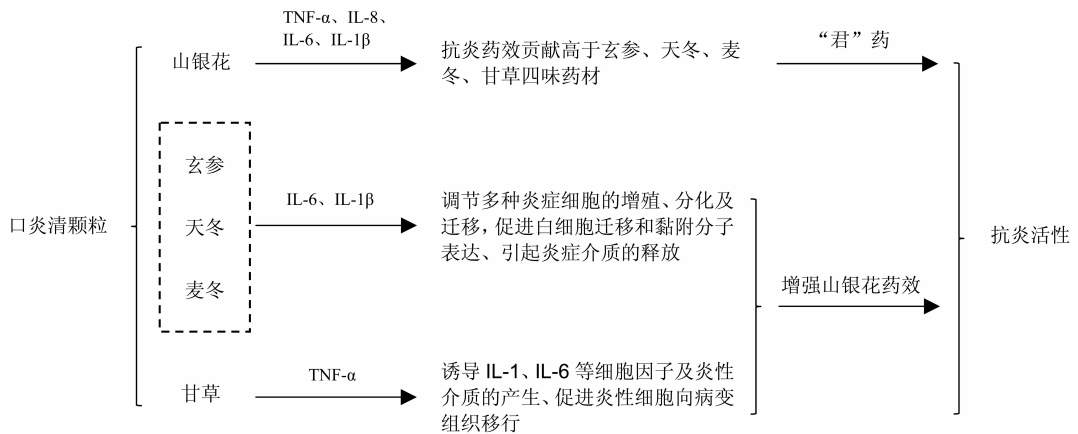


图 5 口炎清颗粒各味药材对抗炎活性的药效贡献及其主次关系

Fig. 5 The relevance between the five herbs and the anti - inflammatory effects in KYQG

4 讨论

TNF - α 、IL - 8、IL - 6 和 IL - 1 β 是参与炎症反应的重要介质，可促进炎症反应进程。在许多炎症反应性疾病、免疫性疾病的发生和发展中起着重要作用。许多资料表明，口腔炎症疾病，包括复发性口腔溃疡（ROU）、口腔黏膜炎（OM）、口腔扁平苔癣（OLP）等的发病过程中涉及多种细胞因子分泌紊乱，如 TNF - α 、IL - 8、IL - 6、IL - 1 β 的产生增加等^[11-15]。TNF - α 可诱导 IL - 1、IL - 6

等细胞因子以及多种炎性介质的产生，促进炎细胞向病变组织移行。IL - 8 有强烈的趋化作用，可激活和趋化中性粒细胞，以及趋化淋巴细胞和嗜碱性粒细胞等。IL - 6 调节多种炎症细胞的增殖、分化及迁移。IL - 1 β 可促进白细胞迁移和黏附分子表达，引起炎症介质的释放等^[16-22]。

差异样品 S6 为口炎清颗粒原配方比例，药效作用为最强（表 1）；差异样品 S1、S5、S7、S11 缺少一味药材，药效作用居中；差异样品 S2、S3、S9、S10 中有两味药材含量偏低，药效作用较差。

可见, 口炎清颗粒中各味药材均对药效有贡献, 缺一不可, 而且配伍比例越接近原配伍比例, 药效作用越强。

本研究结果表明, 口炎清颗粒中5味药材相互辅佐, 通过多靶点的协同作用共同发挥良好的抗炎药效。

参考文献:

- [1] 李忠思, 张小娜. 口炎清药效学研究[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 216-217.
- [2] 苏薇薇. 岭南特色中药指纹图谱质量控制关键技术研究[M]. 广州: 广东科技出版社, 2012.
- [3] 关倩怡, 黄琳, 彭维, 等. 口炎清颗粒指纹图谱研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(1): 115-118.
- [4] 刘宏, 谢称石, 王永刚, 等. 复方血栓通胶囊基于原料药材与药效相关联的组方规律研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2014, 53(2): 108-113.
- [5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [6] YANG S R, CHIDA A S, BAUTER M R, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages [J]. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2006, 291(1): L46-L57.
- [7] NAKAMURA Y, ROMBERGER D J, Tate L, et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1995, 151(5): 1497-1503.
- [8] SONG Q, SHEPPERD M. Predicting software project effort: A grey relational analysis based method [J]. Expert Systems with Applications, 2011, 38(6): 7302-7316.
- [9] KUO Y, YANG T, HUANG G W. The use of grey relational analysis in solving multiple attribute decision-making problems [J]. Computers & Industrial Engineering, 2008, 55(1): 80-93.
- [10] 刘新华. 因子分析中数据正向化处理的必要性及其软件实现[J]. 重庆工学院学报(自然科学), 2009, 23(9): 152-155.
- [11] SCULLY C, PORTER S. Oral mucosal disease: recurrent aphthous stomatitis [J]. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2008, 46(3): 198-206.
- [12] RHODUS N L, CHENG B, BOWLES W, et al. Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone [J]. Oral Diseases, 2006, 12(2): 112-116.
- [13] XAVIER G M, SÁ A R, GUIMARÃES A L S, et al. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus [J]. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2007, 36(8): 476-481.
- [14] GUPTA P, ASHOK L, NAIK S R. Assessment of serum interleukin-8 as a sensitive serological marker in monitoring the therapeutic effect of levamisole in recurrent aphthous ulcers: A randomized control study [J]. Indian Journal of Dental Research, 2014, 25(3): 284-289.
- [15] TOBITA T, IZUMI K, FEINBERG S E. Development of an in vitro model for radiation-induced effects on oral keratinocytes [J]. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2010, 39(4): 364-370.
- [16] 阮萍. 口腔扁平苔藓与细胞因子的关系研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2003(4): 250-252.
- [17] 张燕, 刘文娟, 王弘轶, 等. 复发性口腔溃疡免疫病因学相关研究[J]. 现代免疫学, 2012(5): 434-437.
- [18] GUIMARÃES A L S, CORREIA-SILVA J F, SÁ A R, et al. Investigation of functional gene polymorphisms IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α in individuals with recurrent aphthous stomatitis [J]. Archives of Oral Biology, 2007, 52(3): 268-272.
- [19] LEGERT K G, TSILINGARIDIS G, REMBERGER M, et al. The relationship between oral mucositis and levels of pro-inflammatory cytokines in serum and in gingival crevicular fluid in allogeneic stem cell recipients [J]. Supportive Care in Cancer, 2014: 1-9.
- [20] PANG G, COUCH L, BATEY R, et al. GM-CSF, IL-1 α , IL- β , IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 α and TNF- α [J]. Clinical & Experimental Immunology, 1994, 96(3): 437-443.
- [21] KIMBERLIN D W, WILLIS S A, McCracken Jr G H, et al. Protein synthesis-dependent induction of interleukin-1 β by lipopolysaccharide is inhibited by dexamethasone via mRNA destabilization in human astroglial cells [J]. Journal of Clinical Immunology, 1995, 15(4): 199-204.
- [22] 汤毅珊, 王宁生, 张银卿. 雄黄及含雄黄复方对炎症介质 IL-1 β , IL-6, TNF- α 和 NO 的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 107-110.