

基于磷酸二酯酶抑制活性的清金化痰汤 抗炎活性评价方法建立

肖顺利, 孙正霄, 刘陆, 张琼玲, 丁世兰, 许静, 廖福龙, 游云*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 基于磷酸二酯酶(PDE)抑制活性, 建立清金化痰汤抗炎活性测定方法, 补充与完善该经典名方的质量控制体系。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)建立PDE活性测定方法, 考察清金化痰汤抑制PDE活性的量效关系, 流动相甲醇-0.5%乙酸水溶液(5:95), 检测波长254 nm。通过测定多批清金化痰汤水提物冻干粉对PDE的抑制率, 以中和酶的活性国际单位U标示其生物活性。结果: 选择 $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ PDE溶液, 在反应底物环磷酸腺苷(cAMP)浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、反应时间为60 min时, 酶促反应稳定。在此反应体系下, 当清金化痰汤水提物冻干粉终质量浓度为 $0.11 \sim 3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其对PDE的抑制作用呈现浓度依赖性。确定清金化痰汤水提物冻干粉待检质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在该质量浓度下对PDE呈显著且稳定抑制作用, 抑制率 $> 45\%$, 即1 mg的清金化痰汤水提物冻干粉至少可中和1.8 U PDE的活性。结论: 建立了基于PDE抑制活性的清金化痰汤生物活性评价方法, 以PDE活性国际单位U表征了清金化痰汤的抗炎活性, 可为中药复方生物活性测定研究提供新方法。

[关键词] 清金化痰汤; 水提物; 经典名方; 磷酸二酯酶(PDE); 高效液相色谱法(HPLC); 生物活性; 质量控制

[中图分类号] R22; R28; R96; TQ450.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0015-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212052

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211028.1549.003.html>

[网络出版日期] 2021-10-29 10:09

Establishment of Anti-inflammatory Activity Evaluation Method of Qingjin Huatantang Based on Phosphodiesterase Inhibitory Activity

XIAO Shunli, SUN Zhengxiao, LIU Lu, ZHANG Qiongling, DING Shilan,
XU Jing, LIAO Fulong, YOU Yun*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Based on the inhibitory activity of phosphodiesterase (PDE), a method for determining the anti-inflammatory activity of Qingjin Huatantang was established to supplement and improve the quality control system of this famous classical formula. **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the activity of PDE, and the dose-effect relationship of inhibiting PDE activity of Qingjin Huatantang was investigated. The mobile phase consisted of methanol-0.5% acetic acid aqueous solution (5:95), and the detection wavelength was 254 nm. By measuring the PDE inhibition rate of multiple batches of Qingjin Huatantang water extract lyophilized powder, biological activity was marked with the activity of the neutralizing enzyme in the international unit U. **Result:** When the concentration of reaction substrate (cyclic adenosine monophosphate) was $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the reaction time was 60 min, the enzymatic reaction was stable with $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ of PDE. In this reaction system, when the concentration of Qingjin Huatantang water extract lyophilized powder was $0.11 \sim 3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibitory effect of PDE showed a concentration-dependent

[收稿日期] 2021-08-17

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721004-006-003)

[第一作者] 肖顺利, 在读博士, 从事中药药理研究, E-mail: xiaosl3@163.com

[通信作者] * 游云, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学研究, Tel: 010-64013996, E-mail: youyunrice@126.com

relationship. It was determined that the concentration of Qingjin Huatantang water extract lyophilized powder to be tested was $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which showed a significant and stable inhibitory effect on PDE, and the inhibitory rate was $>45\%$, that is, 1 mg of Qingjin Huatantang water extract lyophilized powder could neutralize the activity of 1.8 U PDE at least. **Conclusion:** This study establishes a biological activity evaluation method of Qingjin Huatantang based on the inhibitory activity of PDE, and the anti-inflammatory activity of Qingjin Huatantang is characterized by international unit U of PDE activity, which can provide a new method for the determination of biological activity of traditional Chinese medicine compounds.

[Keywords] Qingjin Huatantang; water extract; famous classical formulas; phosphodiesterase (PDE); high performance liquid chromatography (HPLC); biological activity; quality control

清金化痰汤载于明代叶文龄所著《医学统旨》卷六治疗“咳嗽”项下,由黄芩、栀子、桑白皮、桔梗、贝母、瓜蒌仁、橘红、茯苓、麦冬、知母和甘草11味药材组成,具有清热化痰止咳、清肺养阴润燥的功效,是治疗咳嗽属痰热郁肺证的代表方剂^[1-4]。其在现代临床上应用广泛,尤其对以咳嗽咳痰为主要症状的呼吸道感染疗效显著,如感冒、急性支气管炎、慢性支气管炎急性发作、肺炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)等^[5-8]。目前针对清金化痰汤的质量控制方法主要为多指标成分含量测定,但中药复方药效物质基础不明晰,其药效是多成分、多靶点、多途径交互作用的体现,测定的指标成分往往难以关联其临床疗效,亟需能够关联其临床疗效的质量评价方法。

生物活性测定法是以药物的生物效应为基础,以生物统计为工具,运用特定的实验设计,测定药物有效性的一种方法,从而达到控制药品质量的作用。其测定方法包括生物效价测定法和生物活性限值测定法^[9]。近年来,生物活性测定方法因其直接关联药效,已在多种中药开展了探索性研究,如水蛭^[10]、麝香^[11]、金银花^[12]、板蓝根^[13]、穿心莲^[14]等。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)是细胞内重要的第二信使分子,可调节细胞内的多种信号传递和生理活动,如介导炎症细胞因子的产生与释放。磷酸二酯酶(PDE)是一类可水解cAMP和cGMP的酶,目前已知的PDE由11种各具特性的同工酶组成^[15],其中PDE4被认为是一种新型抗炎靶标,主要用于肺部的炎症治疗。清金化痰汤是治疗肺系病的经典名方,本课题组前期研究发现,清金化痰汤水提物具有抑制PDE活性的作用。因此,本实验拟建立基于抑制PDE的清金化痰汤生物活性测定方法,以进一步完善该经典名方的质量控制体系。

1 材料

e2695-2998型高效液相色谱仪(美国Waters公司),LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司),5424R型超高速离心机(德国Eppendorf),DB-02型干式恒温器(美国精骐有限公司),AE240型1/10万电子天平和ME104E型1/1万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],PB-10型pH计(德国赛多利斯公司)。

清金化痰汤水提物冻干粉(QJHTT,天津药物研究院有限公司,批号分别为19112601、19112602、19112603、19112604、19112605、19112606、19112607、19112608、19112609、19112610),PDE(瑞士Enzo Life Sciences,批号08112006),cAMP对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号Z07M11J109387,纯度98%),3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx,上海碧云天生物技术有限公司,批号080520210419),水为娃哈哈纯净水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 实验原理 cAMP可通过高效液相色谱法(HPLC)在紫外-可见光范围内进行检测,抑制剂可抑制cAMP与PDE的结合,从而抑制cAMP分解生成5'-腺嘌呤核苷酸(5-AMP),在HPLC中反映为峰面积值的变化。在体外酶活性抑制实验中,化合物与PDE结合后会导致PDE对cAMP的降解作用减弱,峰面积值也会随之产生变化,若对PDE活性抑制越强,则相应的cAMP峰面积就越大,反之亦然。

2.2 溶液配制

2.2.1 钙/镁磷酸盐缓冲液(Ca/Mg PBS) 称取氯化钠8.00 g、氯化钾0.20 g、磷酸二氢钾0.20 g、十二水磷酸氢二钠3.15 g,加水800 mL使溶解,用4%氢氧化钠溶液将pH调至7.4,加入氯化钙0.11 g、六水氯化镁0.20 g,最后加水定容至1 L,高温、高压灭菌30 min,过0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.2 10 U·mL⁻¹ PDE溶液 将4 U的PDE溶于

0.40 mL的Ca/Mg PBS中,待溶解后混匀,配制过程在冰浴中进行。

2.2.3 QJHTT溶液 称取各批QJHTT样品适量,用Ca/Mg PBS使溶解,离心处理(4 °C, 1万 r·min⁻¹, 10 min, 离心半径8.3 cm,下同),取上清液用Ca/Mg PBS稀释,得质量浓度分别为1.11、3.33、10.00、30.00 g·L⁻¹的溶液。

2.2.4 IBMX溶液 称取IBMX 2.22 mg,用Ca/Mg PBS使溶解并定容至5 mL,配成444.00 mg·L⁻¹母液,分别用Ca/Mg PBS稀释至不同质量浓度(5.48、16.44、49.33、148.00 mg·L⁻¹)。

2.3 影响因素考察

2.3.1 cAMP标准曲线的建立 精密称取cAMP对照品3.29 mg,置100 mL量瓶中,加Ca/Mg PBS使溶解并定容,摇匀,配成100 μmol·L⁻¹ cAMP溶液,并逐级稀释,配制得到浓度分别为1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 μmol·L⁻¹的cAMP对照品溶液,待测,记录cAMP峰面积。

2.3.2 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相选择甲醇-0.5%乙酸水溶液(5:95),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,柱温30 °C,进样量20 μL。

2.3.3 cAMP底物浓度考察 在冰浴条件下,空白管和测试管中分别加入cAMP溶液(终浓度分别为25、37.5、50、62.5、75 μmol·L⁻¹)37.5 μL;此外,测试管加入PDE溶液(终浓度4 U·mL⁻¹)30 μL,空白管加入Ca/Mg PBS 30 μL,各管均用Ca/Mg PBS补足至75 μL。将各组样品置于37 °C金属浴中恒温孵育30 min后于100 °C水浴3 min终止反应,随后用水稀释2倍,离心,取上清液用于检测。

2.3.4 酶反应时间考察 根据2.3.3项下考察结果确定最佳cAMP底物浓度。在冰浴条件下,测试管中分别加入cAMP溶液37.5 μL与PDE溶液(终浓度4 U·mL⁻¹)30 μL,用Ca/Mg PBS补足至75 μL。将各管置于37 °C金属浴中分别恒温孵育0、30、45、60、75、90 min,于100 °C水浴3 min终止反应,用水稀释2倍,离心,取上清液用于检测。

2.4 PDE抑制率的检测 在冰浴条件下,空白组、对照组、药物组[药物组分为QJHTT组和阳性药组(IBMX组)]分别加入cAMP溶液37.5 μL;对照组、QJHTT组和IBMX组各加入PDE溶液(终浓度保持4 U·mL⁻¹)30 μL, QJHTT组再加入不同质量浓度的QJHTT溶液7.5 μL, IBMX组则再加入IBMX溶液7.5 μL,各管均用Ca/Mg PBS补足至75 μL。将各

组置于37 °C金属浴中恒温孵育60 min,于100 °C水浴3 min终止反应,用水稀释2倍,离心,取上清液用于检测。计算抑制率,计算公式为抑制率=(药物组cAMP峰面积-对照组cAMP峰面积)/(空白组cAMP峰面积-对照组cAMP峰面积)×100%。

2.5 QJHTT和IBMX抑制PDE活性的量效关系考察 考察不同批次不同质量浓度QJHTT(批号为19112602、19112607、19112608,终质量浓度分别为0.11、0.33、1.00、3.00 g·L⁻¹)和不同质量浓度IBMX(终质量浓度分别为0.55、1.64、4.93、14.80 mg·L⁻¹)对PDE活性的抑制情况。按2.4项下方法进行加样与检测,计算抑制率。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 取12.5 μmol·L⁻¹ cAMP溶液,按2.3.2项下色谱条件连续进样6次,记录cAMP峰面积,计算相对标准偏差(RSD)。

2.6.2 稳定性试验 取批号19112602的QJHTT溶液(终质量浓度1 g·L⁻¹)和IBMX溶液(终质量浓度4.93 mg·L⁻¹)按2.4项下方法制备空白组溶液、对照组溶液、QJHTT组溶液和IBMX组溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h按2.3.2项下色谱条件测定,记录cAMP峰面积,计算RSD。

2.6.3 重复性试验 取批号19112602的QJHTT溶液(终质量浓度1 g·L⁻¹)和IBMX溶液(终质量浓度4.93 mg·L⁻¹)按2.4项下方法制备空白组溶液、对照组溶液、QJHTT组溶液和IBMX组溶液,共重复操作6次,记录cAMP峰面积,计算抑制率,以考察方法的重复性。

2.6.4 中间精密度考察 取批号19112602的QJHTT溶液(终质量浓度1 g·L⁻¹)和IBMX溶液(终质量浓度4.93 mg·L⁻¹)按2.4项下方法制备空白组溶液、对照组溶液、QJHTT组溶液和IBMX组溶液,分别在实验室不同仪器上进行分析,记录cAMP峰面积,计算PDE抑制率;由2个实验人员分别制备空白组溶液、对照组溶液、QJHTT组溶液和IBMX组溶液,记录cAMP峰面积,计算PDE抑制率,以考察方法的中间精密度。

2.6.5 方法适用性考察 取待检批号19112601、19112603、19112604、19112605、19112606、19112609、19112610的QJHTT按2.2.3项下方法配制溶液,按2.4项下方法计算PDE抑制率,考察方法适用性。

3 结果

3.1 影响因素考察

3.1.1 cAMP标准曲线的建立 以cAMP峰面积为

纵坐标, cAMP溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得cAMP线性回归方程 $Y=15\ 448X(R^2=0.999\ 9)$, 线性范围 $1.56\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.2 cAMP底物浓度考察 在30 min反应时间内, 随着cAMP浓度的增大, cAMP减少量逐渐增大, 这可能与酶反应速率有关。当cAMP底物浓度分别为 $25, 37.5, 50, 62.5, 75\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, cAMP减少量分别为 $4.09, 6.82, 9.11, 10.09, 11.04\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明当cAMP浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, cAMP减少速率变缓, 故底物浓度选择 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.3 酶反应时间考察 在90 min内, 随着酶反应时间的增加, cAMP减少量增加。当酶反应时间分

别为30、45、60、75、90 min时, cAMP减少量分别为 $8.02, 13.97, 19.34, 23.05, 27.45\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 考虑到时间成本, 选择反应时间60 min。

3.2 基于PDE抑制作用的QJHTT生物活性测定

3.2.1 QJHTT对PDE活性抑制作用的量效关系考察 QJHTT体外对PDE活性的影响结果表明, 当QJHTT终质量浓度为 $0.11\sim 3.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着给药质量浓度的增大, 其对PDE的抑制率增大, 且呈现线性关系。当QJHTT溶液的终质量浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3个批号药物对PDE的抑制效果稳定, 故确定选择 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为QJHTT抑制PDE活性的检测质量浓度, 结果见表1。

表1 不同质量浓度QJHTT对PDE抑制率的影响($n=3$)

Table 1 Effect of QJHTT with different concentration on inhibition rate of PDE ($n=3$) %

质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	批号 19112602		批号 19112607		批号 19112608	
	抑制率($\bar{x}\pm s$)	RSD	抑制率($\bar{x}\pm s$)	RSD	抑制率($\bar{x}\pm s$)	RSD
0.11	34.26 ± 8.63	25.2	36.12 ± 3.42	9.5	41.09 ± 7.53	18.3
0.33	37.28 ± 1.80	4.8	48.36 ± 1.83	3.8	47.03 ± 8.73	18.6
1.00	47.22 ± 2.37	5.0	52.13 ± 2.96	5.7	56.52 ± 5.67	10.0
3.00	73.73 ± 1.70	2.3	71.39 ± 0.81	1.1	82.22 ± 3.51	4.3

3.2.2 IBMX抑制PDE活性的量效考察 IBMX对PDE活性影响的结果表明, 当IBMX终质量浓度为 $0.55, 1.64, 4.93, 14.80\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其对PDE的抑制率分别为 $12.86\%\pm 10.65\%, 29.04\%\pm 10.05\%, 50.27\%\pm 4.47\%, 68.05\%\pm 5.25\%$; RSD依次为 $82.8\%, 35.0\%, 8.9\%, 7.7\%$ 。说明随着给药浓度的增大, PDE抑制率增大, 但质量浓度越低, 实验误差越大。综合考虑, 选择IBMX质量浓度为 $4.93\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 QJHTT抑制PDE活性的方法学考察

3.3.1 精密度试验 $12.50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ cAMP对照品溶液连续进样6次的峰面积RSD 0.9%, 表明仪器精密度良好。

3.3.2 稳定性试验 稳定性试验结果表明在24 h内, 空白组、对照组、QJHTT组和IBMX组cAMP峰面积的RSD分别为 $0.3\%, 0.4\%, 0.6\%, 0.1\%$, 表明各组溶液在24 h内稳定性良好。

3.3.3 重复性试验 重复性考察时发现, $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ QJHTT溶液对PDE的抑制率为 $51.09\%\pm 3.18\%$, RSD 6.2%; $4.93\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBMX溶液对PDE的抑制率为 $41.99\%\pm 5.14\%$, RSD 12.3%, 表明该方法重复性良好。

3.3.4 中间精密度考察 对重复性试验的样品在不同品牌液相仪器上重新进样检测, 测得cAMP面

积, 计算 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ QJHTT溶液和 $4.93\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBMX溶液对PDE的抑制率分别为 $53.27\%\pm 6.33\%, 42.52\%\pm 4.83\%$, RSD依次为 $11.9\%, 11.4\%$ 。与3.3.3项下数据进行对比发现, 不同仪器对测定结果影响的差异并无统计学意义。由实验室另外1名人员对同一批次的QJHTT进行测定, 结果 $1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ QJHTT溶液和 $4.93\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBMX溶液对PDE的抑制率分别为 $67.78\%\pm 1.60\%, 51.90\%\pm 2.75\%$, RSD依次为 $2.4\%, 5.3\%$ 。综合2位操作者共12次测定结果, 结果发现IBMX和QJHTT抑制PDE活性稳定, RSD依次为 $14.19\%, 14.66\%$ 。说明不同实验人员对测定结果的影响不大, 中间精密度较好。

3.3.5 方法适用性考察 7批QJHTT(19112601、19112603、19112604、19112605、19112606、19112609、19112610)对PDE活性的抑制率分别为 $51.37\%\pm 2.13\%, 52.79\%\pm 4.36\%, 50.88\%\pm 5.59\%, 58.18\%\pm 1.06\%, 66.14\%\pm 3.91\%, 52.63\%\pm 7.85\%, 48.55\%\pm 5.57\%$, RSD依次为 $4.2\%, 8.3\%, 11.0\%, 1.8\%, 5.9\%, 14.9\%, 9.4\%$, 7批样品的PDE抑制率均 $>45\%$, RSD均 $<15\%$, 判断合格。

4 讨论

质量稳定可控是保证中药有效性和安全性的前提, 而经典名方的功效往往是其所含成分的整体

作用结果,是多成分、多靶点、多途径交互作用的综合体现。中药复方配伍成分间的协同和拮抗作用更为多样,仅检测1个或几个化学成分并不能完全反应经典名方的整体疗效。因此,建立关联其临床疗效的质量评价方法具有重要意义。生物活性检测法^[16]适用于成分复杂、具有多种活性成分和未知药效或毒性成分的药物。2010年版《中华人民共和国药典》正式将《中药生物活性测定指导原则》纳入^[17]。

目前,针对清金化痰汤开展质量控制的方法主要以化学成分含量测定为主,如刘静等^[18]建立了超高效液相色谱法(UPLC)同时测定清金化痰汤中新芒果苷、栀子苷、芒果苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸、山栀子苷B含量的方法,尚缺少能够关联该复方药效的质量控制方法。现代研究表明清金化痰汤可降低血清、肺组织或肺泡灌洗液中炎症因子水平,减轻气道炎症反应^[19-23],结合清金化痰汤的抗炎效应,本课题组尝试探索建立基于PDE抑制活性的清金化痰汤生物活性测定方法,对其现有质控方法进行补充和完善^[18,24]。本文研究发现QJHTT质量浓度在0.11~3.0 g·L⁻¹时,其对PDE表现出明显的抑制作用,并呈浓度依赖关系;但低浓度药物对PDE抑制率的RSD较大。结合不同浓度药物对PDE抑制率的稳定性,笔者选择1.0 g·L⁻¹作为待检质量浓度,不再对更低质量浓度进行考察。IBMX是一个广谱的竞争性PDE抑制剂^[25],在本研究条件下,4.93 mg·L⁻¹ IBMX对PDE(4 U·mL⁻¹)的抑制率50.27%±4.47%, RSD<10%,故选择4.93 mg·L⁻¹ IBMX作为阳性药用于评价评价体系的稳定性。以拟建立的生活活性评价方法考察多批QJHTT对PDE活性的抑制情况,综合多次检测结果,1 g·L⁻¹ QJHTT对PDE(4 U·mL⁻¹)抑制率均>45.0%,即1 mg的QJHTT可中和1.8 U PDE活性。方法适用性考察结果显示,7批QJHTT 1 mg可中和至少1.8 U PDE活性,判定为合格。

在PDE体外抑制率实验中,酶的活性是影响实验结果可靠性和稳定性的关键因素,每次实验时PDE溶液应现配现用,同时在冰浴条件下操作,避免过度震荡。目前测定PDE活性方法主要有3种,分别为放射性同位素法^[26-27]、分子荧光分析法^[28]及HPLC^[29]。放射性同位素法具有灵敏度高和可同时测定多个样品的优点,但对环境和安全操作要求严格。分子荧光分析法具有检出限低、灵敏度高等优点,但易受干扰,荧光淬灭快,实验成本高。HPLC

相对于其他2种方法分析时间长,但实验操作简单、快速、准确,利于在药检部门推广。基于PDE抑制活性的生物活性测定方法是对清金化痰汤质量控制体系建立的补充。另外,如葛根、毛冬青、桑枝等其他中药^[29-35]也具有抑制PDE活性的作用,可以尝试将这种方法推广应用在这些药材的质量控制中,为中药质量控制方法的建立提供新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张伯礼,吴勉华. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2017.
- [2] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会. 咳嗽中医诊疗专家共识意见(2011版)[J]. 中医杂志, 2011,52(10):896-899.
- [3] 孙迎节,张洪春,张红. 肺系病常用经典名方的专家共识[J]. 中医杂志,2017,58(12):1079-1080.
- [4] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录(第一批)[EB/OL]. (2018-04-16) [2019-11-09]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [5] 魏钢,牛永亮. 清金化痰汤联合西药治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床研究[J]. 陕西中医,2017,38(12):1662-1663,1702.
- [6] 韩利峰. 清金化痰汤联合西药治疗社区获得性肺炎临床研究[J]. 新中医,2019,51(10):60-63.
- [7] 王晶波,姚金彤,张超,等. 加味清金化痰汤治疗急性支气管扩张症的临床研究[J]. 中医药导报,2019,25(4):98-100.
- [8] 周永红. 清金化痰汤治疗慢性支气管炎急性发作40例[J]. 浙江中医学院学报,2005,29(4):31.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:488.
- [10] 金家金,王志斌,苏斌,等. 水蛭体外抗凝血实验研究及其生物活性测定方法反应体系的筛选[J]. 中国药理学杂志,2014,49(22):1997-2001.
- [11] 罗云,谭婷,梁新丽,等. 基于抗凝血酶活性效价的麝香质量生物评价方法研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):2112-2117.
- [12] 徐容. 基于生物抑菌活性的金银花颗粒效价测定方法[J]. 中国药师,2016,19(2):369-371.
- [13] 李寒冰,鄢丹,王伽伯,等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质的生物评价[J]. 药学学报,2009,44(2):162-166.
- [14] 王丛,张慧,李慕睿,等. 基于抗菌抗病毒效价检测的穿心莲药材质量评价研究[J]. 中药材,2015,38(9):1858-1861.

- [15] 陈昌亮,黄爽. 磷酸二酯酶及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):283-286.
- [16] 王亚敏. 生物检定在药品质量标准中的作用[J]. 中国生化药物杂志,2007,28(2):133-136.
- [17] 张定堃. 中药质量整合评控模式和方法研究[D]. 成都:成都中医药大学,2017.
- [18] 刘静,刘然,李丹丹,等. UHPLC法测定经典名方清金化痰汤物质基准中多指标成分的含量[J]. 药学学报,2020,55(8):1872-1876.
- [19] 赵媚,许光兰,李娇,等. 清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热郁肺型大鼠肺组织 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. 中医杂志,2019,60(8):696-700.
- [20] 许光兰,赵媚,钟云青,等. 清金化痰颗粒对 COPD 急性期(痰热郁肺型)大鼠肺组织 STAT1, STAT3 的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):91-97.
- [21] 孟倩,宋春梅,陈丽军. 清金化痰汤调节 ERK/p38MAPK 信号通路改善哮喘大鼠模型气道炎症的研究[J]. 四川中医,2019,37(10):51-55.
- [22] 吴瑶. 清金化痰汤对慢性阻塞性肺疾病急性加重期(痰热蕴肺)患者的临床疗效及相关炎症因子的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2014.
- [23] 王霖. 清金化痰汤治疗社区获得性肺炎临床疗效观察及对患者血清 IL-1 β , TNF- α 表达的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2011.
- [24] 张琼玲,孙正霄,肖顺丽,等. 基于巨噬细胞吞噬及分泌功能的清金化痰汤生物限值测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(24):10-16.
- [25] GUPTA A, PANDEY A N, SHARMA A, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: Possible therapeutic drugs for female fertility regulation [J]. Eur J Pharmacol,2020,883:173293.
- [26] 区瑞莹. 桑辛素 M 结构优化及其抑制磷酸二酯酶 4 活性研究[D]. 广州:广州中医药大学,2016.
- [27] SAVANY A, ABRIAT C, NÉMOZ G, et al. Activation of a cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 (PDE4) from rat thymocytes by phosphatidic acid [J]. Cell Signal,1996,8(7):511-516.
- [28] REINECKE D, SCHWEDE F, GENIESER H G, et al. Analysis of substrate specificity and kinetics of cyclic nucleotide phosphodiesterases with *N'*-methylanthraniloyl-substituted purine and pyrimidine 3', 5'-cyclic nucleotides by fluorescence spectrometry [J]. PLoS One,2013,8(1):e54158.
- [29] 滕飞,李博,谢静,等. 葛根中抑制磷酸二酯酶 4 活性成分的筛选研究[J]. 分子科学学报,2018,34(1):40-44.
- [30] 刘子琛. 毛冬青相关有效成分筛选及其抑制磷酸二酯酶活性的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [31] 杨璐. 桑枝化学成分及其抑制磷酸二酯酶 4 活性的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2015.
- [32] 谭冰心,黄仪有,彭光天,等. 不同产地枇杷叶粗提物抑制磷酸二酯酶 4 活性研究[J]. 药物评价研究,2017,40(6):769-772.
- [33] 杨璐,张天华,白旭,等. 14 种紫珠属植物醇提取物抑制磷酸二酯酶 4 活性初探[J]. 广东药学院学报,2015,31(3):328-331.
- [34] 孙曙光,张淑霞,王红霞,等. 中药补骨脂化学成分及磷酸二酯酶 V 抑制活性测定[J]. 理化检验:化学分册,2007,43(11):958-960.
- [35] 尉小慧,陈玥,夏广新,等. 银杏叶化学成分及其对磷酸二酯酶 5 抑制活性研究[J]. 中草药,2006,37(7):993-995.

[责任编辑 刘德文]