

## 5 种中药组分配伍体外清除多环芳烃和自由基的研究

吴彦<sup>1</sup>, 杨鸿<sup>2\*</sup>, 黄泰松<sup>1</sup>, 邹克兴<sup>1</sup>, 王萍娟<sup>1</sup>, 白家峰<sup>1</sup>, 李卫真<sup>3</sup>, 马琰岩<sup>2</sup>, 李晶哲<sup>2</sup>, 吕俊海<sup>2</sup>

(1. 广西中烟工业有限责任公司技术中心, 南宁 530001;

2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 3. 深圳市福田区中医院, 广东 深圳 518034)

**[摘要]** **目的:** 研究中药方剂组分配伍体外清除多环芳烃(PAHs)和自由基等致癌物质的作用。**方法:** 按照均匀试验设计-药效试验-数学建模(模型验证)药效评价程序进行银杏叶提取物、甘草总黄酮、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷和麦冬总皂苷 5 个中药组分不同配伍剂量体外清除 PAHs 和自由基的研究。**结果:** 以清除 1,1-二苯基-2-苦肟基(DPPH)、PAHs、羟自由基和超氧阴离子自由基的综合作用为指标, 5 味中药组分配伍后药效作用要强于单味药组分, 其最佳配比剂量为甘草总黄酮 0.8 g·L<sup>-1</sup>、银杏叶提取物 3.144 g·L<sup>-1</sup>、淫羊藿总黄酮 0.024 g·L<sup>-1</sup>、黄芪总苷 0.036 g·L<sup>-1</sup> 和麦冬总皂苷 0.024 g·L<sup>-1</sup>。配伍最佳比例约为 33:131:1:1.5:1。**结论:** 中药组分配伍可进一步提高特定中药组分体外清除多环芳烃和自由基等致癌物质的作用, 可使中药组分在减少此类物质对人群的危害方面发挥更好的作用。

**[关键词]** 中药方剂组分配伍; 自由基; 多环芳烃; 均匀设计

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0183-05

## Research of Active Ingredients of Chinese Herbal on Cavenging Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Radicals *in vitro*

WU Yan<sup>1</sup>, YANG Hong<sup>2\*</sup>, HUANG Tai-song<sup>1</sup>, ZOU Ke-xing<sup>1</sup>, WANG Ping-juan<sup>1</sup>, BAI Jia-feng<sup>1</sup>,  
LI Wei-zhen<sup>3</sup>, MA Yan-yan<sup>2</sup>, LI Jing-zhe<sup>2</sup>, LV Jun-hai<sup>2</sup>

(1. Technical Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co. Ltd, Nanning 530001, China;

2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;

3. Traditional Chinese Medical Hospital of Futian District, Shenzhen 518034, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the scavenging effect of active ingredient compatibility from Chinese herbal on carcinogens such as radicals and polycyclic aromatic hydrocarbons *in vitro*. **Method:** The active ingredient formula of Chinese herbal were composed of ginkgo biloba extract (GBE), total flavonoids of glycyrrhiza (TFG), total flavonoids of epimedium (TFE), astragalosides (AST) and total saponins of ophiopogon (TSO). Uniform design and comprehensive weight coefficient method was used to analyze the effect of the formula on scavenging polycyclic aromatic hydrocarbons and radicals *in vitro*. **Result:** According to the comprehensive action, the pharmacodynamic actions of five active ingredient formula was stronger than any single ingredient. The best effect was in the ratio of GBE 3.144 g·L<sup>-1</sup>, TFG 0.8 g·L<sup>-1</sup>, TFE 0.024 g·L<sup>-1</sup>, AST 0.036 g·L<sup>-1</sup> and TSO 0.036 g·L<sup>-1</sup>. The optimum proportion was 33:131:1:1.5:1. **Conclusion:** Active ingredient compatibility of Chinese herbal could strengthen the scavenging effect of single active ingredients on carcinogens such as radicals and polycyclic aromatic hydrocarbons, which may play the role of reducing the damage of carcinogens on human

**[收稿日期]** 20120110(011)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划课题(桂科攻 11194005)

**[第一作者]** 吴彦, 医学博士, 副研究员, 从事新药临床前药理学及卷烟减害增香研究, Tel: 15878818598, E-mail: wu\_yan2003@hotmail.com

**[通讯作者]** \* 杨鸿, 博士后, 副研究员, 从事中医证候的系统生物学研究及中药复方及其配伍的分子机制研究, Tel: 13911891173, E-mail: leslie18029@163.com

being.

[Key words] active ingredients assembling of Chinese herbal; radicals; polycyclic aromatic hydrocarbons; uniform design

随着工业化和城市化的进展,燃烧产生的大气污染(如汽车尾气和卷烟烟气等)状况越来越不乐观。燃烧产生大气污染的过程非常复杂,无异于一个小型化工厂,其污染物的成分也极为复杂,许多都有致癌作用,目前研究认为其中主要包括多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)和自由基等。PAHs 属于强致癌物质,由于它具有的致癌性、致畸性、致突变性和脂溶性等特点,使其易于通过呼吸、摄食、皮肤等途径接触进入人体并形成积累,从而对人体产生巨大危害<sup>[1-2]</sup>;而自由基可以直接和间接攻击细胞成分,是引起各种疾病的重要原因<sup>[3]</sup>。因此降低燃烧产生的大气污染物水平对人体保健具有重要意义。

本研究团队前期对 10 余种中药组分体外清除有害物质的作用作了筛选,结果表明银杏叶提取物、甘草总黄酮、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷、麦冬总皂苷等多味中药组分对自由基及多环芳烃类有害物质综合清除作用较好,通过卷烟烟气这一主要大气污染物的验证平台检测表明,这些组分添加后可以明确降低受试物的细胞毒性<sup>[4]</sup>。作者选取甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷和麦冬总皂苷组成了中药有效组分复方,全方具有阴阳双补,健脾祛痰,活血通络,止咳平喘功效,适用于燃烧产生的大气污染物侵袭人体造成的体征。以清除多环芳烃和自由基能力为指标,采用均匀试验设计-药效试验-数学建模及模型验证-综合药效评价程序<sup>[5-6]</sup>,进行组分不同配伍体外清除自由基和多环芳烃等致癌物质作用的研究,定量分析各中药组分的清除作用,综合优选验证配比的优化结果,从而确定 5 种中药组分的最优剂量配比关系,为减少燃烧性污染物对人群的危害和预防由此引起的疾病的发生提供中药组分配伍的研究依据。

## 1 材料

**1.1 试剂** 羟自由基试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20101207),抗超氧阴离子自由基试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20101210),蒽(anthracene, 99%, 美国 ACROS ORGANICS, 批号 A0250314), 1, 1-二苯基-2 苦肼基(DPPH, 美国 Sigma 公司, 批号 S90790-379), 无水乙醇, 丙酮, 乙酸(冰醋酸), 均为国产分析纯。

**1.2 受试药品** 甘草总黄酮(90%)、银杏叶提取物(30%)、黄芪总苷(70%)、淫羊藿总黄酮(50%)均为南京朗泽医药科技有限公司产品,批号均为 20091102。麦冬总皂苷(90%)为上海海灿生物科技有限公司产品,批号 20091112。

**1.3 仪器** F7000 荧光分光光度计,日本日立公司产品;BT25S 1/10 万电子分析天平,德国 Sartorius 公司产品;DU730 型蛋白核酸分析仪,美国 BECKMAN 公司产品。

## 2 方法

**2.1 清除 DPPH 自由基的测定方法**<sup>[7]</sup> 将 DPPH 用无水乙醇配置成  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  备用。在试管中依次加入 2 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 70% 乙醇溶液(样品溶解溶剂),混匀后用 1 cm 比色皿在 517 nm 波长处测吸光值(A),记为  $A_0$ ;加入 2 mL DPPH 溶液和 0.5 mL 待测中药组分试液,混匀后在黑暗处静置 30 min,测定记为  $A_i$ ;加入 2 mL 无水乙醇溶液和 0.5 mL 待测中药组分试液,混匀后测定值,记为  $A_j$ ,按下式计算自由基清除率。

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

**2.2 中药组分清除羟自由基和超氧阴离子自由基的测定方法** 采用南京建成羟自由基和超氧阴离子自由基试剂盒测定,依据试剂盒说明书方法进行检测获得抑制率。

**2.3 清除多环芳烃的检测方法**<sup>[8]</sup> 将多环芳烃蒽配置成  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的丙酮溶液使用。将中药提取物配成不同体积分数的 70% 乙醇溶液。设置荧光分光光度计扫描参数:激发和发射单色仪狭缝带通宽度均为 5 nm,扫描速度  $240 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。激发波长 265 nm,发射波长 400 nm。将试液倒入石英液池,置于仪器样品室。用 1 mL 丙酮加 1 mL 70% 乙醇调零。计算添加中药组分前后蒽荧光强度  $F$  的变化,获得清除率。

**2.4 运用均匀设计进行中药有效组分配伍筛选** 首先采用均匀设计  $U_{12}(12^4)$  表,将银杏叶提取物、甘草总黄酮、淫羊藿总黄酮和黄芪总苷作为 4 个考察因素,每个因素取 12 个水平,以各组分原始药物在 70% 乙醇中的最大溶解度、 $\text{IC}_{50}$  为依据,按照均匀设计表格安排各因素和水平,根据清除 DPPH 和多环芳烃的作用,采用 LARS 算法分别获得 4 组分配

伍清除 DPPH 和多环芳烃的回归方程。根据回归方程,结合实际生产,获得优化的 4 味药物配伍比例并进行验证实验;

根据 4 味中药的最优组合结果和企业实际生产设计要求,在上述研究基础上加入麦冬总皂苷,剂量为  $0.024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;按照 2.1 ~ 2.3 方法检测清除 DPPH、羟基自由基、超氧阴离子自由基和多环芳烃的作用,综合优选出这 5 味药的最佳配比。均匀设计详见表 1。

表 1  $U_{12}(12^4)$  均匀设计试验安排  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

试验编号	甘草总黄酮	银杏叶提取物	淫羊藿总黄酮	黄芪总苷
1	0.450	1.350	0.360	0.810
2	0.675	2.700	0.540	0.270
3	0.900	1.125	0.900	0.810
4	1.125	2.475	1.080	0.270
5	1.350	0.900	0.180	0.990
6	1.575	2.250	0.540	0.450
7	1.800	0.675	0.720	0.990
8	2.025	2.025	1.080	0.450
9	2.250	0.450	0.180	1.170
10	2.475	1.800	0.360	0.630
11	2.700	0.225	0.720	1.170
12	2.925	1.575	0.900	0.630

### 3 结果

**3.1 4 味中药组分配比的均匀实验筛选** 4 味中药组分配比清除 DPPH 自由基和 PAHs 作用的均匀设计研究结果见表 2。根据实验结果,采用 LARS(改进最小角回归)算法分别获得其回归方程,其中甘草总黄酮为  $X_1$ ,银杏叶提取物为  $X_2$ ,淫羊藿总黄酮为  $X_3$ ,黄芪总苷为  $X_4$ ,平均清除率为  $Y$ 。

**3.1.1 4 组分配伍清除 DPPH 的回归方程**

$$Y = (1\ 348.410)X_1 + (1\ 902.850)X_2 + (0.432)X_3 + (-20.861)X_4 + (-11\ 511.569)X_1X_2 + (6\ 495.115)X_1X_3 + (18\ 840.578)X_2X_4 + (1\ 287.767)X_1X_4$$

**3.1.2 4 组分配伍清除 PAHs 的回归方程**

$$Y = (4\ 344.308)X_1 + (3\ 367.760)X_2 + (1\ 932.363)X_3 + (-1\ 025.303)X_4 + (85\ 119.491)X_2X_3 + (111\ 733\ 5.085)X_3X_4 + (28\ 672.475)X_1X_4 + (40\ 296.366)X_2X_4$$

**3.1.3 预测结果及验证实验** 根据以上回归方程结合实际生产,获得优化配伍的预测组合,并进行了优化配伍组合和实际检测最佳组合清除 DPPH 和多环芳烃的验证实验;实验结果与通过 LARS 分析获得的预测结果趋势一致。见表 3 ~ 4。

表 2 4 味中药组分均匀设计实验组合对 DPPH 和 PAHs 的清除率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

实验组合序号	DPPH 清除率/%	PAHs 清除率/%
实验 1	58.84 ± 1.34	32.48 ± 8.86
实验 2	71.21 ± 1.59	42.87 ± 3.05
实验 3	45.22 ± 0.55	38.74 ± 1.49
实验 4	62.10 ± 0.44	39.67 ± 0.91
实验 5	51.72 ± 0.51	32.18 ± 4.84
实验 6	64.32 ± 0.71	40.93 ± 2.83
实验 7	46.18 ± 0.21	38.15 ± 3.60
实验 8	59.54 ± 1.05	41.81 ± 3.60
实验 9	49.32 ± 0.30	35.40 ± 6.21
实验 10	62.61 ± 0.26	40.68 ± 0.22
实验 11	44.25 ± 1.65	37.35 ± 4.93
实验 12	56.55 ± 0.25	44.19 ± 2.66

**3.2 5 味中药组分组合清除多种自由基和 PAHs 作用研究** 在上述研究基础上添加麦冬总皂苷后, DPPH 和 PAHs 清除率均比相应 4 味药物组合有所提高;根据不同组合对 DPPH、羟基自由基、超氧阴离子自由基和 PAHs 的清除效率,依据这 4 个药效指标在综合药效评价中具有同等重要性,确定 4 者的权重系数为 0.25:0.25:0.25:0.25,获得综合清除率,结果显示这 5 味药的组合以实验 13\* 为最佳,其配比剂量为甘草总黄酮  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、银杏叶提取物  $3.144 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、淫羊藿总黄酮  $0.024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、黄芪总苷  $0.036 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和麦冬总皂苷  $0.024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验配置比例和结果见表 5 ~ 6。

### 4 讨论

多环芳烃是目前环境中最重要的有机致癌物,因与人类生活关系密切早已引起了大家的关注,其污染已经成为危害我国乃至全人类健康最主要的原因之一。已有研究证实 PAHs 可致胃癌、肺癌和皮肤癌、白血病等多种癌症<sup>[1-2]</sup>;高活性的自由基,包括多种有害的超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^- \cdot$ )和羟基自由基( $\text{OH} \cdot$ )<sup>[3]</sup>,被国际癌症研究会定为 I 级致癌物。研究认为<sup>[9]</sup>高浓度的活性氧自由基与致癌有关,一旦通过呼吸道进入人体,就会消耗人体内的抗氧化剂,产生氧化胁迫,并且攻击不饱和脂肪酸、蛋白质、氨基酸和 DNA,造成人体在分子、细胞及器官等水平的各种损伤;而另一方面可以通过在高温下的不断地聚合,形成不同的多环芳烃,从而更加速机体损害并诱发肺气肿、肺癌、肺间质纤维化等各种疾

表 3 4 味中药组分均匀设计实验优化组合清除 DPPH 的预测和验证

实验组合序号	甘草总黄酮	银杏叶提取物	淫羊藿总黄酮	黄芪总苷	预测清除率	验证清除率
	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/%	/%
实验 13 (DPPH 预测最佳)	0.800	3.144	0.024	0.036	84.214	90.716
实验 14 (DPPH 预测次佳)	0.800	2.984	0.116	0.104	81.277	88.996
实验 2 (DPPH 实际最佳)	0.645	2.581	0.516	0.258	71.581	84.127
实验 12 (PAHs 实际最佳)	1.940	1.045	0.597	0.418	56.981	65.431
实验 13-1 (PAHs 预测最佳)	3.144	0.800	0.024	0.036	69.638	82.701
实验 14-1 (PAHs 预测次佳)	2.984	0.800	0.116	0.104	67.392	80.946

注:上述剂量为原始药物配置浓度(表 4~5 同)。

表 4 4 味中药组分均匀设计实验优化组合清除 PAHs 的预测和验证

实验组合序号	甘草总黄酮	银杏叶提取物	淫羊藿总黄酮	黄芪总苷	预测清除率	验证清除率
	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/g·L <sup>-1</sup>	/%	/%
实验 13 (DPPH 预测最佳)	0.800	3.144	0.024	0.036	47.878	43.944
实验 14 (DPPH 预测次佳)	0.800	2.984	0.116	0.104	44.700	42.194
实验 2 (DPPH 实际最佳)	0.645	2.581	0.516	0.258	41.577	41.939
实验 12 (PAHs 实际最佳)	1.940	1.045	0.597	0.418	42.345	42.003
实验 13-1 (PAHs 预测最佳)	3.144	0.800	0.024	0.036	51.877	51.116
实验 14-1 (PAHs 预测次佳)	2.984	0.800	0.116	0.104	50.044	49.761

表 5 5 味中药组分均匀设计实验优化组合配置剂量比例

实验组合序号	甘草总黄酮	银杏叶提取物	淫羊藿苷	黄芪总苷	麦冬总皂苷
	g·L <sup>-1</sup>				
实验 13* (DPPH 预测最佳)	0.800	3.144	0.024	0.036	0.024
实验 14* (DPPH 预测次佳)	0.800	2.984	0.116	0.104	0.024
实验 2* (DPPH 实际最佳)	0.645	2.581	0.516	0.258	0.024
实验 12* (PAHs 实际最佳)	1.940	1.045	0.597	0.418	0.024
实验 13-1* (PAHs 预测最佳)	3.144	0.800	0.024	0.036	0.024
实验 14-1* (PAHs 预测次佳)	2.984	0.800	0.116	0.104	0.024

注:\* 4 味药物组合 + 麦冬总皂苷。

表 6 5 味中药组分均匀设计实验优化组合清除多种自由基和 PAHs 作用

实验组合序号	清除率/%				
	DPPH	PAHs	羟自由基	超氧阴离子自由基	综合平均
实验 13* (DPPH 预测最佳)	92.185	44.334	46.521	84.931	66.993
实验 14* (DPPH 预测次佳)	92.086	49.184	42.758	79.936	65.991
实验 2* (DPPH 实际最佳)	84.645	47.731	43.608	80.398	64.096
实验 12* (PAHs 实际最佳)	69.998	48.800	46.678	73.355	59.708
实验 13-1* (PAHs 预测最佳)	83.594	51.470	47.654	72.142	63.715
实验 14-1* (PAHs 预测次佳)	81.202	53.400	46.064	74.480	63.787

注:\* 5 味药物组合。

病<sup>[10-13]</sup>。因此研究有效的中药及其配伍清除燃烧性大气污染物中这些有害物质水平对人体保健具有重要意义。

在国家重点基础研究项目(973)《方剂关键科学问题的基础研究》中,以王永炎和张伯礼二位院

士为首的课题组创建了基于组效关系的有效部位配伍研制现代中药的理论模式和相关技术体系,为现代中药的发现与设计开拓了思路和途径,为方剂关键科学问题研究中的基础理论研究取得了突破性进展,他们提出的中医方剂组分配伍新模式,可以使中

医方剂达到成分清楚、作用靶点明确、作用环节及机制清楚的水平,并已经得到实验数据的支持<sup>[14-16]</sup>。

根据前期研究结果,遵循中药方剂组分配伍理论,结合祖国医学对燃烧性大气污染物侵袭机体后体征的认识,本研究选取了甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷、麦冬总皂苷等体外清除卷烟有害物质作用较强的5个中药组分,进行了中药方剂组分清除自由基及清除多环芳烃作用最佳配伍和剂量关系的研究;首先,按照均匀试验设计-药效试验-数学建模(模型验证)程序,分析甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮和黄芪总苷4种成分组合清除DPPH自由基和多环芳烃的最佳配伍比例,并经过试验验证其可靠性:以清除DPPH为指标最佳配比约为33:131:1:1.5;以清除多环芳烃为指标最佳配比约为131:33:1:1.5;在此基础上,添加麦冬总皂苷于上述4味药物比例中,DPPH和多环芳烃清除率均比相应4味药物组合有所提高;以清除DPPH、多环芳烃、羟自由基和超氧阴离子自由基的综合作用为指标,该5味中药组分配伍后药效作用要强于单味药组分,甘草总黄酮、银杏叶提取物、淫羊藿总黄酮、黄芪总苷、麦冬总皂苷配伍最佳比例约为33:131:1:1.5:1。

#### [参考文献]

[1] Paolo Boffetta, Nadia Jourenkova, Per Gustavsson. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Cancer Causes and Control*, 1997,8:444.

[2] 王晶,伦立民,王清. 胃癌组织中多环芳烃水平变化及意义[J]. *山东医药*,2008,48(15):20.

[3] 赵报路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1999:183.

[4] 吴彦,杨鸿,刘红,等. 中药组分清除烟气有害物质及降低细胞毒性的研究[J]. *中国中药杂志*,2011,36

(22):3184.

[5] 李振坤,陈建新,杨洪军,等. 基于LARS算法的川芎成分组合与血管活性关系分析[J]. *中国实验方剂学杂志*,2009,15(3):24.

[6] 吴宏伟,杨洪军,李德凤,等. 丹参成分组合与抗氧化活性相关性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*,2009,15(8):6.

[7] 勾明明,刘梁,张春枝. 采用DPPH法测定26种植物的抗氧化活性[J]. *食品与发酵工业杂志*,2010,36(3):148.

[8] 柯亨林,赵珠,朱瑞瑞,等. 降低卷烟烟气中多环芳烃和自由基的中药添加剂[J]. *华东理工大学学报*,2002,28(1):74.

[9] PRYOR W A. Cigarette smoke and the involvement of free radical reactions in chemical carcinogenesis [J]. *Br J Cancer*,1987,55(S8):19.

[10] Cayuela M M. Oxygen free radicals and human disease [J]. *Biochimie*,1995,77:147.

[11] Marnett L J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage [J]. *Toxicology*,2002,(2):181.

[12] FREI B, FORSTNER T M, AMES B N, et al. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma; Protective effects of ascorbic acid [J]. *Biochem J*,1991,277:133.

[13] Ryor W A, Haujs B J, Premobic P, et al. The radicals in cigarette tar: Their nature and suggested physiological implications [J]. *Science*,1983,220(4595):425.

[14] 张伯礼,王永炎. 方剂关键科学问题的基础研究—以组分配伍研制现代中药[J]. *中国天然药物*,2005,3(5):258.

[15] 王阶,郭丽丽,王永炎. 中药方剂有效成分(组)分配伍研究[J]. *中国中药杂志*,2006,31(1):5.

[16] 张伯礼,王永炎,商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方法[J]. *继续医学教育*,2006,20(19):89.

[责任编辑 聂淑琴]