利用改良等高线法评价甘草皂苷与桔梗皂苷合用的相互作用

刘 彬, 齐 云*, 宋 杨, 蔡润兰, 王 敏, 谢 忱, 罗秀珍
(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

[摘要] **目的**: 考查甘草皂苷与桔梗皂苷祛痰和抗炎作用的相互作用性质。**方法**: 采用气管酚红排泌、二甲苯致耳肿胀及磷酯酶 A_2 致足跖肿胀模型, 运用改良的等高线法对两者合用的相互作用进行评价。**结果**: 随着合用剂量的减少, 相互作用评价结果呈现从拮抗到协同的趋势, 在较低有效剂量范围内, 表现为相加和协同的结果。**结论**: 在固定配比下, 合并效应与剂量大小密切相关。

[关键词] 甘草皂苷; 桔梗皂苷; 祛痰; 抗炎; 改良的等高线法; 强度协同
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0040-04

Application of Modified Isobologram Method in Quantitative Analysis for the Interaction of Saponins of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and *Platycodon grandiflorum* A. DC

*LIU Bin, QI Yun**, *SONG Yang, CAI Run-lan, WANG Min, XIE Chen, LUO Xiu-zhen*
(*Research Center for Pharmacology and Toxicology, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing* 100094, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To evaluate the expectorant and anti-inflammatory effects of the combinations of saponins of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (GS) and *Platycodon grandiflorum* A. DC (PS). **Methods**: The phenol drain model, xylene-induced mouse ear edema model and PLA_2-induced mouse paw edema model were used, and the interaction between these two agents was evaluated by modified isobologram method. **Result**: With the decrease of total dose, the trend of interaction from antagonism to synergism was observed, and synergism or additivity was obtained at low effective doses. **Conclusion**: At fixed ratio, the total dose would affect the herbal interactive effects.

[**Key words**] Saponins of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (GS); saponins of *Platycodon grandiflorum* A. DC (PS); expectorant effect; anti-inflammatory effect; modified isobologram method; synergism in effect potency

两药合并效应的评价, 国外常用的数十种相互作用评价方法主要围绕强度展开[1], 并多用于化学药物间或植物药单体成分与化学药物联合使用中。中药药对(或其有效部位)的合并用药评价, 很少涉及到这些评价方法。“甘桔汤”出自张仲景《伤寒论》之“桔梗汤”, 其主要物质基础——甘草皂苷与桔梗皂苷单用及合用有明显抗炎祛痰作用[2-4]。本文即以甘桔“药对”的有效部位(甘草皂苷和桔梗皂苷)为研究对象, 采用国外的药物相互作用评价方法——改良的等高线法[5]研究两者合用的祛痰作用和抗炎作用特点。

[收稿日期] 2006-08-31
[基金项目] 北京市自然基金资助课题(7042039)
国家中医管理局资助课题(04-05ZL04)
[通讯作者] * 齐云, Tel: (010)-62829207; E-mail: yunqichai@sohu.com

1 材料

1.1 试验药物 桔梗总皂苷(Platycodon grandiflorus saponins, PS)和甘草总皂苷(Glycyrrhiza uralensis saponins, GS)均为本所植物化学室提供,皂苷含量分别为 66% 和 60%。

1.2 动物 ICR 小鼠,体重 18~22 g,雌性;ICR 小鼠,体重 28~32 g,雄性;ICR 小鼠,体重 25~30 g,雄性。所有动物由北京维通利华实验动物中心提供,合格证:SCXK(京)2002-0003 号。

1.3 仪器与试剂 电子天平,Libror EB-280M,Shimadzu 产品;UV755B 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产品;小鼠足趾测定仪,由本实验室自制;猪胰磷脂酶 A_2(PLA_2)为 Sigma 公司产品,其它试剂皆为国产分析纯。

2 方法

2.1 对小鼠气管酚红排泌的影响[6] 根据药效及毒性预试验,确定甘草皂苷与桔梗皂苷合用比例为 8∶1。取雌性小鼠 18~22 g,随机分组见表 1,各组动物连续灌胃给药 4 d,正常对照组给予相同体积的生理盐水。末次给药后,小鼠腹腔注射 2.5% 酚红 $NaHCO_3$ 溶液 0.5 mL。30 min 后处死小鼠,剪下自甲状软骨下至气管分支处的一段气管,置于 2 mL 生理盐水的试管中,加入 0.1mL 1 mol/L NaOH,振摇 10 min,室温放置 2 h,离心,波长 546 nm 处测定 *OD* 值。根据酚红标准曲线换算出气管分泌酚红的量。

2.2 对二甲苯致耳肿胀的影响[7] 雄性小鼠 28~32 g,随机分组(见表 2),各组动物连续灌胃给药 4 d,正常对照组给予相同体积的生理盐水。末次给药后 20 min 将 40 μL 二甲苯涂于小鼠右耳廓两侧致炎,左耳不涂为对照,致炎后 40 min 处死小鼠,用直径 8 mm 的打孔器在两耳对称位置取下左右耳片称重,以左右耳片重量差作为耳肿胀度,计算肿胀度抑制百分率。肿胀度抑制率=(对照组肿胀度-给药组肿胀度)/对照组肿胀度×100%

2.3 对 PLA_2 致足趾肿胀的影响[8] 预实验确定 PLA_2 剂量及反应时间。取雄性小鼠 25~30 g,随机分组(见表 3),ig 给药,连续 5 d。末次给药后 1 h,各小鼠右后足趾皮下注射 50 μL PLA_2 溶液(5 U/足)致炎,分别在致炎前和致炎后 120 min,用小鼠足趾测定仪测量右后足体积,以致炎前后体积差值作为肿胀度,肿胀度抑制率=(对照组足肿胀度-给药组足肿胀度)/对照组足肿胀度×100%。

2.4 统计学处理 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Excel 软件进行 t 检验。

2.5 相互作用结果判定 采用 Tallarida 的改良等高线法[5,9,10],该法运用 Probit 回归将量效曲线变为直线,通过计算假定相加作用时的量效曲线和实际所得的合并用药的量效曲线间的关系来确定药物相互作用的相加,协同和拮抗。本法实际是等效线法(Isobologram)的一种扩展。采用相互作用指数(Interaction Index)α 对协同或拮抗程度进行定量化评价,若 α>1 则说明二药拮抗,若 α=1 说明二药相加,若 α<1 则说明二药协同。实际应用时,可直接采用其软件“Pharmtoolspro(*The MacCary Group, Inc*)”进行处理并进行合并用药效果判定而无需进行繁复的数学运算。

3 结果

3.1 对小鼠气管酚红排泌的影响及相互作用评价结果 在一定剂量范围内,甘草皂苷与桔梗皂苷单用及合用皆能显著提高小鼠气管酚红排泌量,并呈现一定的剂量依赖关系。合并效应评价显示(表 1),随着合用剂量的减少,甘桔皂苷从高剂量(405 mg/kg 以及 202.5 mg/kg)的拮抗逐渐转化为低剂量的相加作用。

表 1 甘草皂苷、桔梗皂苷及二药配比(8∶1)对酚红排泌的影响($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	酚红排泌量(μg/mL)	α±*SE*
对照	-	1.86±0.27	-
甘草皂苷	360	2.77±0.45$^{1)}$	-
	180	2.42±0.53$^{2)}$	-
	90	1.92±0.23	-
桔梗皂苷	45	3.29±0.30$^{2)}$	-
	22.5	2.40±0.54$^{1)}$	-
	11.25	2.06±0.26	-
甘草与桔梗皂苷(8∶1)	405(360∶45)	3.46±0.65$^{2)}$	1.46±0.24
	202.5(180∶22.5)	2.59±0.46$^{2)}$	1.26±0.13
	101.25(90∶11.25)	2.36±0.42$^{2)}$	1.10±0.10
	50.62(45∶5.62)	1.78±0.20	1.12±0.15
	25.31(22.5∶2.81)	1.77±0.29	0.87±0.15

注:与对照组相比:$^{1)}P<0.05$,$^{2)}P<0.01$。(下同)

3.2 对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响及相互作用评价结果 甘草皂苷、桔梗皂苷单用及合用在一定剂量范围内,皆可以显著抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀,并呈剂量依赖关系。合并效应评价显示(表 2),随着合用剂量的减少,二药相互作用逐渐从拮抗(810 mg/kg)变为相加(405 mg/kg),最终转化为协同作用

(202.5 mg/kg~ 67.5 mg/kg) 。

表 2 甘草皂苷、桔梗皂苷及二药配比(8∶1)对二甲苯致耳肿胀的影响(n= 12, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	耳肿胀度	抑制率(%)	α±SE
对照	—	15.87±4.30	—	-
甘草皂苷	720	11.5±3.29$^{2)}$	27.56	-
	360	12.08±3.75$^{1)}$	23.88	-
	180	15.92±3.45	0	-
桔梗皂苷	90	7.50±5.43$^{2)}$	52.76	-
	45	10.17±4.17$^{2)}$	35.96	-
	22.5	13.92±5.30	12.34	-
甘草与桔梗皂苷(8∶1)	810(720: 90)	6.92±3.03$^{2)}$	56.43	1.35±0.28
	405(360: 45)	9.58±2.02$^{2)}$	39.63	1.02±0.17
	202.5(180: 22.5)	11.33±3.77$^{2)}$	28.61	0.78±0.10
	135(120: 15)	11.58±4.11$^{1)}$	27.03	0.61±0.06
	67.5(60: 7.5)	13.18±3.87	16.96	0.45±0.05

3.3 对 PLA_2 致小鼠足跖肿胀的影响及相互作用评价结果 一定剂量的甘草皂苷、桔梗皂苷以及两者合用皆可以明显抑制 PLA_2 诱导的小鼠足跖肿胀,并呈现剂量依赖关系(表 3)。合并效应评价显示,甘桔皂苷合用在选用剂量范围内,各点皆表现为 $\alpha-SE_\alpha< 1$, $\alpha+ SE_\alpha> 1$,与相加线有重合,两者合用效应可以视同为相加。

表 3 甘草皂苷、桔梗皂苷及二药配比(8∶1)对 PLA_2 致小鼠足跖肿胀的影响(n= 12, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	致炎后足肿胀度(μL)	抑制率(%)	α±SE
对照	-	50.0±16.8		-
甘草皂苷	360	31.9±18.3$^{1)}$	36.3	-
	180	32.7±15.0$^{1)}$	34.5	-
	90	39.3±13.1	21.4	-
桔梗皂苷	45	32.9±11.2$^{2)}$	34.2	-
	22.5	33.4±10.4$^{1)}$	33.2	-
	11.25	38.2±11.7	23.6	-
甘草与桔梗皂苷(8∶1)	405(360: 45)	28.8±18.1$^{2)}$	42.5	1.17±0.50
	202.5(180: 22.5)	33.2±6.0$^{2)}$	33.6	1.19±0.29
	101.25(90: 11.25)	35.2±11.2$^{1)}$	29.5	1.22±0.24

4 讨论

本文尝试性地采用国外应用成熟的相互作用评价方法—Tallarida 的改良的等高线法对中药药对有效部位的合并用药结果进行了评价。与国内用于配伍规律研究的析因分析法[11]、正交分析法[12]等相比,该方法具有样本数要求少,但可全面定量评价相互作用性质的特点,适合于具备良好量效曲线的单用及合用系统。该法较为完善的数学论证体系,以及严格的协同判定标准,提高了判定"协同"的门槛,为寻找真正意义的"协同"组合提供了可能。

甘桔皂苷合用,无论是祛痰,还是对二甲苯致耳肿胀的抑制,均随着合用剂量的减少,合并效应呈现从拮抗到相加或协同的趋势。这种趋势在中药药对中是否具有普遍性是相当值得研究的问题。

中药合并用药的评价,不仅仅涉及到强度上的协同或相加,还存在毒性、时间等方面的相互作用与影响。因此,对它的评价不能照搬化药的模式。必须结合多因素进行综合考虑与权衡,最终才可能得出正确结论。仅就强度协同而言,甘桔药对在抗炎祛痰方面并非无条件的呈现协同关系,随着剂量的变化(配比固定),两药在药效强度上呈现出了不同的情况,这一实验结果可能是对"中医不传之秘在于剂量"的最好注解。

[参考文献]

[1] William R, Greco, Gregory B, *et al*. The search for synergy: a critical review from a response surface persective [J]. Pharmacol Rev, 1995, 47: 334-344.

[2] 齐云, 沈映君, 王文魁, 等. 甘桔汤总皂苷抗炎作用研究[J]. 中华现代临床医学杂志, 2004, 2(6A): 775-778.

[3] 李茯梅, 曹清平, 卢新华. 仲景"桔梗汤"的药理研究[J]. 湖南中医学院学报, 1993, 13(3): 46-47.

[4] Shin C Y, Lee W J, Lee E B, *et al*. Platycodin D and D3 increase airway mucin release in vivo and in vitro in rats and hamsters[J]. Planta Med. 2002, 68(3): 221-225.

[5] Tallarida R J. Drug synergism: its detection and application [J]. J pharmacol. Exp Ther, 2001, 298, 865-872.

[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 642.

[7] 徐叔云, 卞如濂、陈修. 药理实验方法学[M]. 第 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002. 905-937.

[8] Marshall L A, Chang J Y, Calhoun W, *et al*. Preliminary studies on phospholipase A_2-induced mouse paw edema as a model to evaluate anti-inflammatory agents [J]. J Cell Biochem. 1989, 40: 147-155.

[9] Tallarida R J. Stone D J, Raffa R B. Efficient designs for studying synergistic drug combination[J]. Life Sci, 1997, 61: PL417-25.

[10] Ronald J, Tallarida R J. The interaction index: a measure of drug synergism[J]. Pain, 2002, 98: 163-168.

[11] 王双, 张永祥. 中药复方拆方研究的现状与分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(3): 56-59.

[12] 吴翠珍. 正交设计在中药方剂研究中的重要意义[J]. 山东中医杂志, 1999, 18(9): 426.