

利用中效原理评价虎杖苷与大黄素配伍对高尿酸血症模型大鼠的保护作用^Δ

张怡^{1,2*}, 杨馨悦¹, 屈勇¹, 陈运中^{1#} (1.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2.华润武钢总医院药学部, 武汉 430080)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)21-2603-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.21.08

摘要 目的:研究虎杖苷与大黄素配伍对高尿酸血症(HUA)模型大鼠的保护作用,筛选两者最优配伍比例,并探讨其可能机制。方法:将SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、苯溴马隆组(阳性对照,8 mg/kg)、虎杖苷单用组、大黄素单用组和两药合用A、B、C组,每组各剂量均设置5只大鼠。正常对照组和模型组大鼠均灌胃等体积0.3%羧甲基纤维素钠溶液,各给药组大鼠灌胃相应药物,灌胃体积均为0.1 mL/10 g,每日1次,连续7 d。除正常对照组外,其余各组大鼠均于末次给药1 h前单次腹腔注射氧嗪酸钾(300 mg/kg)以复制HUA模型。末次给药1 h后,检测正常对照组、模型组、苯溴马隆组以及虎杖苷单用组、大黄素单用组(剂量均分别为0.625、1.25、2.5、5、10 mg/kg)和合用A组[虎杖苷+大黄素剂量分别为(0.625+0.625)、(1.25+1.25)、(2.5+2.5)、(5+5)、(10+10) mg/kg]大鼠血清中尿酸的含量;利用中效原理计算上述单用组和合用组的效应(Fa)和联合指数(CI),绘制两成分单用及合用的量效关系曲线以及经模拟后的Fa-CI曲线,评价两药的合用效果。同法检测单用组和合用B、C组[虎杖苷+大黄素剂量分别为(0.625+0.625)、(0.625+1.25)、(0.625+2.5)、(0.625+5)、(0.625+10) mg/kg和(0.625+0.625)、(1.25+0.625)、(2.5+0.625)、(5+0.625)、(10+0.625) mg/kg]大鼠血清中尿酸的含量并计算Fa值,筛选两药的最佳配伍比例。检测正常对照组、模型组、苯溴马隆组以及虎杖苷、大黄素单用组(剂量均为10 mg/kg)和最佳配伍比例合用组大鼠血清中黄嘌呤氧化酶(XOD)的含量,初步分析其作用机制。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠尿酸含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,除虎杖苷单用0.625 mg/kg组外,其余各给药组大鼠尿酸含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。两药单用及合用时,其Fa值均与药物剂量成正相关(截距 >0 ,相关系数 >0.9),且合用组的Fa值高于任一药物单用组;当模拟Fa值 $>15\%$ 时,其对应CI值 <1 ,两药合用可表现出协同作用。当虎杖苷与大黄素的配伍比例为1:4时,其Fa值(53.10)与合用A组(53.73)相当,且药物剂量更小[(0.625+2.5)mg/(kg·d) vs. (2.5+2.5)mg/(kg·d)]。与正常对照组比较,模型组大鼠血清XOD含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清XOD含量均显著降低,且最佳比例配伍组显著低于虎杖苷、大黄素单用组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:虎杖苷和大黄素单用或合用均可一定程度地通过抑制XOD的生成来降低HUA模型大鼠血清中尿酸的含量;两者具有一定的协同作用,其最佳配伍比例为1:4。

关键词 虎杖苷;大黄素;中效原理;高尿酸血症;协同效应;黄嘌呤氧化酶;作用机制;大鼠

Protective Effect of Polydatin Complicated with Emodin on Hyperuricemia Model Rats with Median Effect Principle

ZHANG Yi^{1, 2}, YANG Xinyue¹, QU Yong¹, CHEN Yunzhong¹ (1. School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Dept. of Pharmacy, CR & WISCO General Hospital, Wuhan 430080, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effect of polydatin complicated with emodin on hyperuricemia (HUA) model rats, and to screen the optimal complication proportion and investigate the potential mechanism. **METHODS:** SD rats were randomly divided into normal control group, model group, benzbromarone group (positive control, 8 mg/kg), polydatin alone group, emodin alone group and drug combination group A, B, C, with 5 rats in each group of each dosage. Normal control group and model group were given constant volume of 0.3% CMC-Na solution, administration groups were given relevant medicine intragastrically. Each group was given 0.1 mL/10 g intragastrically once a day, for consecutive 7 d. Expect for normal control group, other groups were given intraperitoneal injection of potassium oxonate 300 mg/kg 1 h before last medication to induce HUA model. One hour after last medication, the serum contents of uric acid (UA) were determined in normal control group, model group, benzbromarone group, polydatin/alone group (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/kg) and drug combination group A [the dose of polydatin+emodin were (0.625+0.625), (1.25+1.25), (2.5+2.5), (5+5), (10+10) mg/kg]. The effect (Fa) and combination index (CI) of above single drug groups and combination groups were calculated by the median effect principle. The dose-effect relationship curves of two components alone or combination were drawn; Fa-CI curves

^Δ 基金项目:国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1701003)

* 副主任药师, 硕士。研究方向:中药及复方的药效物质基础。E-mail:331523309@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:中药及复方的药效物质基础。E-mail:chyzh6204@126.com

after simulation were also drawn to evaluate the effect of two-drug combination. Serum contents of UA in rats were determined and Fa value was calculated in single drug groups and drug combination group B, C [the dose of polydatin+emodin were (0.625+0.625), (0.625+1.25), (0.625+2.5), (0.625+5), (0.625+10) mg/kg and (0.625+0.625), (1.25+0.625), (2.5+0.625), (5+0.625), (10+0.625) mg/kg]. The optimal complication proportion of two drugs were screened. The serum contents of xanthine oxidase (XOD) in rats were determined in normal control group, model group, benzbromarone group, polydatin/emodin alone group (10 mg/kg) and the optimal complication proportion groups. The mechanism was analyzed primarily. RESULTS: Compared with normal control group, the content of UA in model group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, except for 0.625 mg/kg polydatin alone group, the content of UA in other administration groups were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). When the two drugs were used alone or in combination, Fa value was positively correlated with drug dose (intercept >0 , correlation coefficient >0.9), and Fa value of the combination group was higher than that of any single drug group; when the simulated Fa value was more than 15%, the corresponding CI value was less than 1, two-drug combination showed synergistic effect. When the complication proportion of polydatin and emodin was 1:4, the Fa value (53.10) was similar to that of drug combination group A (53.73), and the dose of them were less [(0.625+2.5) mg/(kg·d) vs. (2.5+2.5) mg/(kg·d)]. Compared with normal control group, serum content of XOD in model group was increased significantly ($P<0.01$); compared with model group, serum content of XOD in administration groups were decreased significantly, and the optimal complication proportion group was significantly lower than polydatin alone group and emodin alone group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: The polydatin and emodin used alone or in combination can reduce the serum content of UA in HUA model rats by inhibiting the generation of XOD. They have a certain synergistic effect, and the optimal complication proportion is 1:4.

KEYWORDS Polydatin; Emodin; Median effect principle; Hyperuricemia; Synergistic effect; Xanthine oxidase; Mechanism; Rats

高尿酸血症(Hyperuricemia, HUA)是一种代谢性疾病,由尿酸合成增多和(或)排泄减少所引起的^[1],是我国中老年男性的常见病,且发病率有随生活水平的提高而逐渐上升的趋势^[2]。有研究表明,长期的高尿酸水平可诱发痛风,并可能会损害肾脏及心血管等器官,从而引发高血压、高血脂、糖尿病等并发症^[3],故HUA已成为威胁人类健康的重要疾病之一。目前,临床常用的苯溴马隆、别嘌醇等化学药在治疗HUA方面虽有确切的降尿酸作用,但存在停药后复发率高、副作用多等不足^[4],其临床应有受到了一定的限制。我国传统中医药在疾病早期干预等方面独具优势,且兼具毒副作用少的优点,故中医药治疗HUA受到越来越多学者的关注,已有多个研究证实虎杖、高良姜等中药具有降低尿酸的功效^[5-6]。但由于中药成分复杂,且不同成分叠加后的作用效果难以预测,因此如何利用有效方法对中药有效组分配伍关系进行研究显得尤为重要。

中效原理(Chou-Talalay法)又称中位药效法(Median-drug effect analysis)、联合指数法(Combination index method),是由美国学者Chou TC和Talalay P于1984年所建的用于定量分析药物联合作用的方法^[7]。该法以两药(或活性成分)合用后不同效应(以Fa表示)下的联合指数(CI)来评价其联合应用的效果,在国内外相关领域的研究中应用广泛^[7]。

虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc 为多年生蓼科灌木状草本植物,具有止咳化痰、散瘀止痛、利胆退黄、清热解毒之功效^[8]。虎杖苷与大黄素是虎杖中两种含量较高的有效成分,且两者均具有一定的降尿酸作用^[9-10]。鉴于两种成分的药理活性,将其进行配伍并优化其配伍比例将有助于中药活性成分组方的筛选,为临

床用药提供新的选择。为此,本课题组拟对虎杖苷与大黄素进行成分配伍研究,并利用中效原理定量分析两药联合应用的效果并筛选最优配伍比例,同时初步探讨其作用机制,为中药成分的药效物质基础研究提供参考,为防治HUA的新药开发提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

BP121S型万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司); Milli-Q型超纯水系统(美国Millipore公司); XMark™型全波长酶标仪(美国Bio-Rad公司); UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司); Type 16700 Mixer型旋涡混匀器(美国Thermolyne公司); 1580R型高速离心机(香港基因有限公司)。

1.2 药品与试剂

虎杖苷原料药(批号:AF8071101,纯度:≥98%)、大黄素原料药(批号:AF7112009,纯度:≥98%)均购自成都埃法生物科技有限公司;苯溴马隆原料药(阳性对照,批号:C10240927,纯度:≥99%)、氧嗪酸钾(OA,批号:C10504744)均购自湖北伽玛生物科技有限公司;尿酸检测试剂盒(批号:20190509)、黄嘌呤氧化酶(XOD)检测试剂盒(批号:20190613)均购自北京索莱宝科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠130只,雄性,7~8周龄,体质量180~220 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

2 方法

2.1 分组与给药

所有大鼠均适应性饲养1周后开始实验。按体质量

将其分为正常对照组、模型组、苯溴马隆组(阳性对照,8 mg/kg)、虎杖苷单用组(0.625、1.25、2.5、5、10 mg/kg)、大黄素单用组(0.625、1.25、2.5、5、10 mg/kg)、合用A组[虎杖苷+大黄素剂量分别为(0.625+0.625)、(1.25+1.25)、(2.5+2.5)、(5+5)、(10+10) mg/kg]、合用B组[虎杖苷+大黄素剂量分别为(0.625+0.625)、(0.625+1.25)、(0.625+2.5)、(0.625+5)、(0.625+10) mg/kg]、合用C组[虎杖苷+大黄素剂量分别为(0.625+0.625)、(1.25+0.625)、(2.5+0.625)、(5+0.625)、(10+0.625) mg/kg],每组各剂量均设5只大鼠。苯溴马隆组剂量参考成人临床用量并按体表面积法换算而得,虎杖苷、大黄素单用及合用组剂量参考本课题组前期研究设置;溶剂均为0.3%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液。其中,合用A组用以评价两成分的合用效果,合用B、C组用以筛选两成分的最佳配伍比例。正常对照组和模型组大鼠均灌胃等体积0.3% CMC-Na溶液,各给药组大鼠均灌胃相应药物;灌胃体积均为0.1 mL/10 g,每日1次,连续7 d。

2.2 HUA大鼠模型的建立

参考相关文献^[11-13],除正常对照组外,其余各组大鼠均于末次给药前1 h单次腹腔注射OA(300 mg/kg,以0.3% CMC-Na溶液为溶剂),正常对照组大鼠单次腹腔注射等体积0.3% CMC-Na溶液。若大鼠血清尿酸含量较正常对照组显著升高,则表明模型复制成功。

2.3 大鼠血清尿酸含量的测定

按“2.1”“2.2”项下方法分组[正常对照组、模型组、苯溴马隆组、虎杖苷单用组(0.625、1.25、2.5、5、10 mg/kg)、大黄素单用组(0.625、1.25、2.5、5、10 mg/kg)和合用A组]、给药、造模。末次给药1 h后,于各组大鼠尾静脉取血适量,静置后,以3 000 r/min离心10 min,分离血清。采用微量法以酶标仪检测各组大鼠血清中尿酸含量,严格按照相应试剂盒说明书方法操作。

2.4 虎杖苷与大黄素合用效果的评价

根据“2.3”项下各组大鼠血清尿酸含量(UA),计算各给药组的Fa值: $Fa(\%) = (\Delta UA_{\text{模型组}} - \Delta UA_{\text{给药组}}) / \Delta UA_{\text{模型组}} \times 100\%$ (式中, $\Delta UA_{\text{模型组}}$ 、 $\Delta UA_{\text{给药组}}$ 分别表示模型组、给药组与正常对照组大鼠尿酸含量差值的平均值)^[14-15]。根据中效方程 $Fa/Fu = (D/D_{50})^m$ (式中,Fa为药物作用效应;Fu=1-Fa;D为药物浓度;D₅₀为中效浓度,即发挥50%效应时的药物浓度;m为中效曲线方程斜率)进行中效作图($y = \ln Fa/Fu, x = \ln D, y = bx + a$),计算出两成分单用及合用时的中效剂量($\ln D_{50} = -a/m, b = m$)及方程相应参数(斜率及相关系数等);然后,再计算出两者合用的CI值: $CI = (D_1/D_{x1}) + (D_2/D_{x2}) + \alpha(D_1 D_2 / D_{x1} D_{x2})$ (式中,D₁、D₂为两药合用时产生x效应各自所需的浓度,D_{x1}、D_{x2}为两药单用时产生x效应所需的浓度;若两药作用机制相同则 α 计为1,两药作用机制不同则 α 计为0)^[14-15]。当CI=1时,表示两成分具有相加效应;当CI>1时,表示两成分具有拮抗效应;当CI<1时,表示

两成分具有协同效应^[16]。采用GraphPad Prism V8.0软件,以药物剂量为横坐标、Fa值为纵坐标绘制两药单用及合用后的量效关系曲线;采用CompuSyn V1.0软件、中效方程对合用A组的数据进行模拟计算,然后采用GraphPad Prism V8.0软件以模拟后的Fa值为横坐标、其对应的CI值为纵坐标绘制Fa-CI曲线,以综合评价两药合用的相互作用关系。

2.5 虎杖苷与大黄素最佳配伍比例的筛选及其对HUA模型大鼠血清XOD含量的影响

按“2.1”“2.2”项下方法分组(正常对照组、模型组、苯溴马隆组和合用B、C组)、给药、造模,按“2.3”项下方法检测各组大鼠血清中尿酸的含量,再按“2.4”项下方法计算各给药组的Fa值,并将合用B、C组与合用A组的Fa值进行比较:若某组Fa值与合用A组相当,且该组用药剂量较A组更少,则将该组配伍比例作为最佳配比;若Fa值不及合用A组,则以合用A组的配伍比例为最佳配比^[17]。

在此基础上,进一步按“2.1”“2.2”项下方法分组[正常对照组、模型组、苯溴马隆组、虎杖苷单用组(剂量等同于“2.3”项下Fa值最高的虎杖单用组的剂量)、大黄素单用组(剂量等同于“2.3”项下Fa值最高的大黄素单用组的剂量)和上述最佳配比组]、给药、造模,按“2.3”项下方法分离血清,并采用微量法以紫外-可见分光光度计检测各组大鼠血清中XOD的含量,严格按照相应试剂盒说明书方法操作。

2.6 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用Student's *t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 虎杖苷、大黄素单用及合用对HUA模型大鼠血清尿酸含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清尿酸含量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,除虎杖苷单用0.625 mg/kg组外,其余各给药组大鼠血清尿酸含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且有随剂量增加而降低的趋势,详见表1。

3.2 虎杖苷和大黄素的合用效果

虎杖苷、大黄素单用及合用时,其对应的Fa值均有随药物剂量增加而升高的趋势,且合用后的Fa值均高于任一药物单用,详见表1、图1。

计算两药单用及合用中效曲线方程的斜率(m)、中效浓度(D_{50})和相关系数(r),结果见表2;以经模拟计算后所得的Fa值(5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%)为横坐标、其对应CI值(1.18、1.04、0.96、0.90、0.86、0.82、0.79、0.76、0.74、0.71、0.69、0.66、0.64、0.62、0.59、0.57、0.53、0.50、0.44、0.40)为纵坐

表1 虎杖苷、大黄素单用组及合用组大鼠血清尿酸含量检测及Fa计算结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of UA content determination and Fa calculation in the serum of rats in polydatin and emodin alone or combination groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	UA, $\mu\text{mol/L}$	Fa, %
正常对照组		94.23 ± 15.32	
模型组		336.42 ± 18.43**	
苯溴马隆组	8	127.80 ± 17.54**	
虎杖苷单用组	0.625	317.52 ± 22.29	7.80
	1.25	298.26 ± 28.75*	15.76
	2.5	282.60 ± 30.64**	22.22
	5	259.02 ± 23.01**	31.96
	10	161.37 ± 20.14**	72.28
大黄素单用组	0.625	307.35 ± 20.39*	12.00
	1.25	302.76 ± 19.52*	13.90
	2.5	287.01 ± 21.92**	20.40
	5	215.28 ± 18.96**	50.02
	10	136.71 ± 18.78**	82.46
合用组A (虎杖苷+大黄素)	0.625+0.625	288.36 ± 35.24*	19.84
	1.25+1.25	262.35 ± 29.01**	30.58
	2.5+2.5	206.28 ± 21.15**	53.73
	5+5	127.80 ± 19.98**	86.14
	10+10	111.60 ± 19.12**	92.83

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,** $P<0.01$

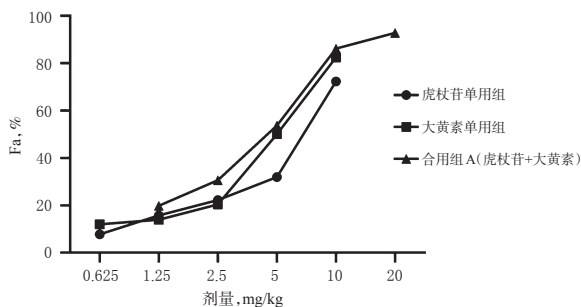


图1 虎杖苷、大黄素单用及合用组量效关系曲线($n=5$)
Fig 1 Dose-response curves of polydatin and emodin alone or combination groups($n=5$)

标绘制Fa-CI曲线,结果见图2。由表2、图2可见,两药单用及合用时,Fa值与药物剂量均呈正相关(m 均大于0, r 均大于0.9);两药合用时的中效浓度(3.687 mg/kg)小于两药单用时的中效浓度之和(10.710 mg/kg);且随着Fa值的增大,CI值逐渐减小;当Fa>15%时,CI<1,表明两药合用可产生协同效应。

3.3 虎杖苷、大黄素合用的最佳配伍比例

与模型组比较,不同配伍比例虎杖苷和大黄素合用组大鼠血清尿酸含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。当虎杖苷和大黄素的配伍比例为1:4时,其Fa值(53.10)与合用A组(53.73)相当,且药物用量更少[(0.625+2.5) mg/(kg·d) vs. (2.5+2.5) mg/(kg·d)],故

虎杖苷与大黄素的最佳配伍比例为1:4,详见表3。

表2 虎杖苷、大黄素单用及合用组的 m 、 D_{50} 、 r 计算结果
Tab 2 Calculation results of m , D_{50} and r in polydatin and emodin alone or combination groups

组别	m	D_{50} ,mg/kg	r
虎杖苷单用组	1.122	6.312	0.960
大黄素单用组	1.285	4.398	0.943
合用A组	1.524	3.687	0.987

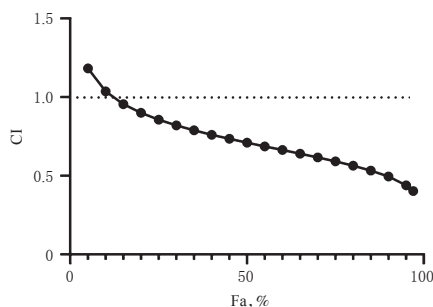


图2 Fa-CI曲线
Fig 2 Fa-CI curve

表3 虎杖苷、大黄素不同配伍比例合用组大鼠血清尿酸含量检测及Fa计算结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Results of UA content determination and Fa calculation in the serum of rats in different complication proportion groups of polydatin and emodin ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	配伍比例	尿酸, $\mu\text{mol/L}$	Fa, %
正常对照组			94.23 ± 15.32	
模型组			336.42 ± 18.43**	
苯溴马隆组	8		127.80 ± 17.54**	
合用B组 (虎杖苷+大黄素)	0.625+0.625	1:1	288.36 ± 35.24*	19.84
	0.625+1.25	1:2	271.35 ± 30.06**	26.87
	0.625+2.5	1:4	207.81 ± 24.91**	53.10
	0.625+5	1:8	177.30 ± 35.18**	65.70
	0.625+10	1:16	126.63 ± 24.03**	86.62
合用C组 (虎杖苷+大黄素)	0.625+0.625	1:1	288.36 ± 35.24*	19.84
	1.25+0.625	2:1	285.93 ± 33.03*	20.85
	2.5+0.625	4:1	269.01 ± 26.77**	27.83
	5+0.625	8:1	185.13 ± 20.12**	62.47
	10+0.625	16:1	148.14 ± 20.92**	77.74

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$,** $P<0.01$

3.4 虎杖苷、大黄素单用及最佳配伍比例合用对HUA模型大鼠血清XOD含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清XOD含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清XOD含量均显著降低,且最佳配伍比例组显著低于虎杖苷、大黄素单药组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表4。

4 讨论

4.1 单味中药成分配伍研究的意义

单味中药是中医治疗最为原始和简单的方式之

表4 虎杖苷、大黄素单用组及最佳配伍比例合用组大鼠血清XOD含量检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 Content determination results of XOD in the serum of rats in polydatin and emodin alone or optimal complication proportion groups ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	XOD,U/L	组别	剂量,mg/(kg·d)	XOD,U/L
正常对照组		5.10±1.03	虎杖苷单用组	10	10.35±2.03 [†]
模型组		15.09±3.13 ^{**}	大黄素单用组	10	9.73±2.37 ^{##}
苯溴马隆组	8	6.30±1.52 ^{##}	最佳配伍比例合用组	0.625+2.5	6.72±1.11 ^{##□}

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[†] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与虎杖苷单用组比较,[△] $P<0.05$;与大黄素单用组比较,[□] $P<0.05$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, [†] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. polydatin alone group, [△] $P<0.05$; vs. emodin alone group, [□] $P<0.05$

一。笔者认为,可将单味中药看作一个由多种成分组成的复方,其中的成分比例是相对固定的,而针对某种疾病发挥作用的仅仅是某一种或几种成分,其他成分则为无效成分,甚至可能具有干扰或拮抗的作用。因此,若将其有效成分进行配比调整,则有可能获得药效更优的有效成分配方。

中药有效成分配伍作为中药配伍的新模式,是现代中药研究的重要内容之一,同时也是创新中药研究的一种途径,可更深刻地揭示中药的药效物质基础,目前已取得了积极的进展^[18-19]。已有研究表明,虎杖对HUA具有一定的治疗作用^[20],且虎杖苷、大黄素是虎杖中可减少尿酸分泌且含量较高的有效成分^[9-10,13],若将这两个成分配伍使用,将有可能减少临床用药剂量,有助于减轻毒副作用,可为中药有效成分防治HUA的临床应用提供参考,具有一定的临床开发前景,故本研究对这两种成分进行了成分配伍研究。

4.2 造模方法及给药方式的选择

HUA是嘌呤代谢紊乱性疾病,过量糖、脂肪、蛋白质、盐的摄入和体内酒精水平过高,均与此疾病的发生密切相关^[21]。目前对于HUA动物模型的建立,国内外还没有统一的方法。由于大鼠体内有尿酸酶,不容易形成尿酸堆积,故成为现有研究常用的HUA模型动物之一^[11]。OA作为尿酸酶抑制剂,在体内外均具有很强的活性,可显著提高实验动物血液和尿液中尿酸的含量^[22]。有文献报道,长期腹腔注射OA对尿酸酶的抑制效应会产生反馈性升高等副作用^[12]。因此,本课题组在参考其他文献方法^[11-13]后,采用了单次腹腔注射OA(300 mg/kg)的造模方式,这样既可以快速地提高正常大鼠体内血清尿酸含量,又可避免因长期给药所导致的副作用,适用于急性HUA大鼠模型的复制。此外,本研究所选用的急性HUA模型大鼠,其体内的尿酸高水平仅能维持4 h左右,而中药有效成分很难在如此短的时间内达到有效血药浓度,故本研究采用了预先多次给药的方式。

4.3 成分配伍研究结果分析

近年来,随着虎杖相关研究的日益深入,学者发现将其有效成分作预防性应用可充分体现虎杖“治未病”的价值^[23]。基于此,本研究采用了中效原理对虎杖苷、大黄素进行了成分配伍研究。中效原理因具有数学模型完备、操作简便等优点,已成为药物配伍研究中应用最广泛的方法之一^[7,24]。Martin N等学者于2005年研发了名为“CompuSyn”的分析软件,该软件是基于Chou-Talalay数学模型开发出的第3代药物联合作用软件,是目前国际上较为认可的药物协同作用定量分析软件^[25]。CompuSyn软件以中效方程作为中介,挖掘药物-药物之间以及药物-一级动力学-多级动力学代谢参数之间的关联,其所得参数CI不仅能用于定量描述两药合用是相加、协同还是拮抗作用,同时还能在给定的剂量-效应水平下进行定性描述,其结果由Fa-CI曲线展示^[25-26]。

本研究结果显示,模型组大鼠血清尿酸含量较正常对照组显著升高,提示模型复制成功。经药物预处理后,除虎杖苷单用0.625 mg/kg组外,其余各给药组大鼠血清尿酸含量均显著降低,提示虎杖苷、大黄素单用和合用均可不同程度地降低HUA模型大鼠血清中尿酸的含量,且其Fa值均与药物剂量成正相关($m>0, r>0.9$),表明药物的剂量与效应之间具有良好的线性关系,实验设计符合多药物联用效应定量分析的要求^[17]。从本研究所得两药合用的量效关系曲线和Fa-CI曲线可以看出,当Fa>15%时,CI<1,表明两药合用为协同作用;当Fa<15%时,CI>1,表明两药合用为拮抗作用。这说明两药低剂量合用时表现为拮抗作用,而较高剂量合用时表现为协同作用,且随着剂量的增大其协同效应有所增强。此外,在研究过程中笔者发现,两药单用时,大黄素的D₅₀值低于虎杖苷,说明大黄素的降尿酸效果要比虎杖苷好,与已有文献^[9]报道的基本一致;且两药合用的D₅₀值低于单药及单药合计,说明只需较低剂量的联合用药即可发挥药效,可有助于降低因剂量过大致不良反应的发生概率^[27]。

4.4 虎杖苷与大黄素的最佳配伍比例及作用机制分析

为确定虎杖苷和大黄素联合用药时的最佳配伍比例,本研究以苯溴马隆(降尿酸作用明显)为阳性对照,设计了不同剂量配伍比例的降尿酸实验。结果表明,两药经不同比例配伍后均具有显著的降尿酸效果,且当两药配伍比例为1:4(合用剂量为3.125 mg/kg)时,Fa值与合用A组(合用剂量为5 mg/kg)的相当,且该配伍比例的剂量更小,故虎杖苷与大黄素的最佳配伍比例为1:4。

本研究进一步考察了虎杖苷、大黄素高剂量单用和最佳配伍比例合用对HUA模型组大鼠血清XOD的影响。尿酸是嘌呤代谢产物,而XOD是尿酸生成过程中具有重要作用的关键酶,是调控尿酸生成的关键环节。有研究表明,嘌呤先被酶水解为次黄嘌呤,后经XOD催化生成黄嘌呤和尿酸,尿酸的合成会随着XOD含量的

增加而增多^[28]。可见,XOD直接调控着体内尿酸含量的高低。本研究结果显示,模型组大鼠血清XOD含量较正常对照组显著升高,提示其血清尿酸含量的升高可能与XOD有关。与模型组比较,各给药组大鼠血清XOD含量均显著降低,且最佳比例配伍合用组显著低于虎杖苷、大黄素单用组,提示无论是两药单用还是合用均可抑制大鼠体内XOD的生成,且合用效果强于任一成分单用;也提示影响XOD的活性可能是虎杖苷和大黄素降尿酸的药效机制之一,且两药合用后可通过协同效应来进一步发挥抑制XOD生成的作用。

综上所述,虎杖苷和大黄素单用或合用均可一定程度地通过抑制XOD的生成来降低HUA模型大鼠血清中尿酸的含量;两者配伍合用后具有协同作用,其最佳配伍比例为1:4。本课题组后续将重点围绕两药的配伍开展相关制剂学研究,为其临床应用提供更多依据。

参考文献

[1] 高尿酸血症相关疾病诊疗多学科共识专家组.中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识[J].中华内科杂志,2017,56(3):235-248.

[2] SONG P, WANG H, XIA W, et al. Prevalence and correlates of hyperuricemia in the middle-aged and older adults in China[J]. *Sci Rep*, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22570-9.

[3] BILLIET L, DOATY S, KATZ JD, et al. Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome[J]. *ISRN Rheumatol*, 2014. DOI: 10.1155/2014/852954.

[4] LIU D, LIANG X, ZHANG H. Effects of high glucose on cell viability and differentiation in primary cultured schwann cells: potential role of ERK signaling pathway[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(6):1281-1290.

[5] 徐熠,徐玲玲.中医药治疗痛风的研究进展[J].中国药房,2010,21(23):2195-2197.

[6] 陈刚,贾萍.茶多酚对果糖诱导的高尿酸血症大鼠血尿酸水平的影响及机制[J].食品科学,2017,38(23):219-223.

[7] CHOU TC, TALALAY P. Quantitative analysis of dose-effects relationships: the combined effects of multiple drugs on enzyme inhibitors[J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984. DOI: 10.1016/0065-2571(84)90007-4.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:208-209.

[9] 侯建平,王艳,孟建国,等.虎杖对实验性高尿酸血症小鼠降尿酸有效部位的研究[J].现代中医药,2011,31(3):49-51.

[10] CHEN L, LAN Z, LIN Q, et al. Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013. DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.037.

[11] 王陈芸,李哲丽,叶尤松,等.氧嗪酸钾致Wistar大鼠高尿酸血症急性模型的剂量探讨[J].中药药理与临床,2018,

34(5):21、141-143.

[12] 吴燕升,万强,史丽强,等.多种方法探索高尿酸血症大鼠模型的建立[J].中国中西医结合肾病杂志,2018,19(1):7-10.

[13] 吴昊,吴汉斌,蒋红.虎杖苷的降尿酸作用及其机制研究[J].药学学报,2014,49(12):1739-1742.

[14] CHOU TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3):621-681.

[15] 徐文杰.麻黄类药对组成规律的基础研究:麻黄桂枝药对 I [D].广州:南方医科大学,2012.

[16] FU J, ZHANG N, CHOU JH, et al. Drug combination in vivo using combination index method: taxotere and T607 against colon carcinoma HCT-116 xenograft tumor in nude mice[J]. *Synergy*, 2016, 3(3):15-30.

[17] 陆洪娣,汤为学,周剑芳.利用中效原理对化疗联合用药的效应分析:英文[J].中国药学:英文版,1999,8(4):229-232.

[18] 盛华刚.中药组分配伍模式的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(16):349-352.

[19] 陈银芳,余日跃,业康,等.大黄厚朴组分配伍对大鼠AP的治疗作用及其机制的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(10):122-126.

[20] 闫云霞,杨中林,萧伟,等.虎杖降尿酸作用初步研究[J].亚太传统医药,2015,11(8):7-9.

[21] 李新强,王丽英.中医药治疗高尿酸血症的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):226-228.

[22] KHOSLA UM, ZHARIKOV S, FINCH JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(5):1739-1742.

[23] 吴建方.中药虎杖在开发保健品、化妆品和药品中的应用前景[J].北方药学,2013,10(10):92-93.

[24] 王士群,朱宇珍,郑学宝. Chou-Talalay 在抗肿瘤联合用药中的研究应用概况[J].中国现代应用药学,2013,30(4):449-453.

[25] CHOU TC, MARTIN N. *CompuSyn for drug combinations and for general dose-effect analysis user's guide*[M]. 2th edition. New York: ComboSyn, Inc., 2005: 1-35.

[26] CHOU TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2):440-446.

[27] 韦美金,黄娟,白俊其,等.大黄素对大鼠血清肝功能、肝脏转运蛋白及代谢酶UGT1A1表达的影响[J].时珍国医国药,2018,29(7):1551-1555.

[28] KUMAR R, SHARMA S, SINGH R. Xanthine oxidase inhibitors: a patent survey[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(7):1071-1108.

(收稿日期:2020-02-26 修回日期:2020-06-03)

(编辑:张元媛)