

## · 疏风解毒专栏 ·

## 疏风解毒胶囊二次开发的系统研究

张铁军<sup>1</sup>, 朱强<sup>2</sup>, 许浚<sup>1</sup>, 曹勇<sup>2</sup>, 申秀萍<sup>1</sup>, 李翔宇<sup>2</sup>

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

**摘要:** 中药大品种二次开发研究是中药创新研究的重要内容, 是继承和发展中医药理论, 突破制约中医药理论和中药产业发展瓶颈的重要途径。以疏风解毒胶囊为研究对象, 进行了系统的二次开发研究, 通过药材、成品以及口服入血成分的辨识和表征, 阐释了疏风解毒胶囊的化学物质组, 进一步通过 UPLC-Q/TOF-MS 整合核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 双荧光素酶报告基因系统、G-蛋白偶联受体结合实验以及网络药理学分析和谱-效筛选方法, 筛选和明确了主要药效物质基础; 基于传统功效, 以整体动物模型、基因组学等方法, 从抗炎免疫、解热等方面阐释其作用机制, 并阐明主要成分的药动学及组织分布规律, 阐释了疏风解毒胶囊的作用机制; 通过拆方研究并与同类中药以及化学药比较, 阐释了该药的组方特点和配伍规律, 提炼和发现了其作用特点、比较优势和临床核心价值; 通过多批样品、多指标成分的含量测定以及指纹图谱共有模式的建立等方面进行系统研究, 建立疏风解毒胶囊的药材与成品的质量控制体系, 对原有的质量标准进行了全面提升, 保证了产品的质量均一、稳定、可控。为该品种的临床推广应用和指导临床实践提供了重要的理论和实验依据, 并为其他中药大品种的二次开发研究提供了可参考的思路与模式。

**关键词:** 中药大品种; 疏风解毒胶囊; 质量标志物; 二次开发; 系统研究; 网络药理学; 谱-效关系

**中图分类号:** R28      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2019)15-3517-09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.001

## Systematic research of secondary development of Shufeng Jiedu Capsule

ZHANG Tie-jun<sup>1</sup>, ZHU Qiang<sup>2</sup>, XU Jun<sup>1</sup>, CAO Yong<sup>2</sup>, SHEN Xiu-ping<sup>1</sup>, LI Xiang-yu<sup>2</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

**Abstract:** The study of secondary development of major Chinese materia medica varieties is the important content of Chinese materia medica (CMM) innovation research, and it is also the important approach of inheriting and developing traditional Chinese medicine (TCM) theory and breaking the bottleneck restricting of the development of TCM theory and CMM industry. In this paper, the secondary development of Shufeng Jiedu Capsule (SJC) was systematically studied. The chemical components of SJC were elucidated by the identification and characterization of herbs, SJC and components ingested into the blood. The main effective components were further screened and cleared by integrating UPLC-Q/TOF-MS, NF- $\kappa$ B double luciferase reporter gene system, binding experiments of G protein coupled receptors, network pharmacology analysis, and spectrum-efficiency screening method. Based on the traditional efficacy, the mechanism of SJC was explained in terms of anti-inflammatory immunity, antipyretic effect, pharmacokinetics and tissue distribution of the main components based on the methods of animal model and genomics. The formula features, compatibility regularity were clarified and the action properties, comparative advantages and core clinical value were found and refined by the research of decomposed recipes and the comparison with the similar CMM recipes and chemical drugs. The quality control systems of SJC and related herbs were established by content determination of multi-target ingredients and multi-batch samples, and the establishment of the characteristic mode of HPLC fingerprint. The original quality standards were promoted comprehensively to ensure the uniformity, stability and controllability of product quality. This study not only provided important theoretical and experimental basis for clinical application and guidance of clinical practice, but also provided research

收稿日期: 2019-07-12

基金项目: 国家中药标准化专项资助项目 (ZYBZH-C-AH-02); 国家自然科学基金资助项目 (81430096); 国家自然科学基金资助项目 (81703802)

作者简介: 张铁军, 研究员, 主要从事中药新药研发及中药大品种二次开发。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

ideas and modes for the secondary development of other major CMM varieties.

**Key words:** major Chinese materia medica varieties; Shufeng Jiedu Capsule; Q-marker; secondary development; systematic research; network pharmacology; spectrum-activity relationship

疏风解毒胶囊为治疗急性上呼吸道感染中药大品种,由虎杖、连翘、柴胡、板蓝根、马鞭草等 8 味药材组成,具有清热解毒、疏风解表的作用,临床用于治疗急性上呼吸道感染风温肺热证<sup>[1-2]</sup>。该方源于湘西土家族名老中医的经验方,疗效显著,得到业内专家的高度认可,被推荐为《风温肺热病(病毒性肺炎)(轻症)中医诊疗方案》(2017 年)、《外感发热(上呼吸道感染)诊疗方案》(2017 年)等 12 个重大疾病的治疗指南和推荐用药,对流感等重大公共健康事件做出贡献。为《国家医保目录》和《基本药物目录》收载品种。然而,同大多数中药品种一样,该品种存在基础研究薄弱,药效物质基础与作用机制不清楚,质量控制水平低等问题,制约了其进一步临床推广和市场拓展。为了深入挖掘该品种的临床核心价值,本课题组自 2013 年起,持续对该品种进行二次开发研究,从药效物质基础、作用机制、配伍规律及质量标准提升等方面进行系统研究,以期为该品种的临床推广应用提供重要的理论和实验依据。

## 1 化学物质组的系统辨识研究

中药化学成分是其功效表达的物质基础,是反映中药质量的客观实质。中药不同于化学药物,其原料来源于生物有机体,并且,经历药材采收加工、饮片炮制、提取纯化以及制剂成型工艺等复杂的药物制备过程,药物传输及体内过程也具有多组分的交互作用的特点。基于化学物质组的“传递与溯源”的特点,本课题组对疏风解毒胶囊的原料药材、制剂、入血成分及其代谢产物的化学物质组进行了系统地表征和辨识,明确了疏风解毒胶囊的化学物质基础及其传递规律<sup>[3-6]</sup>。为阐释该药的药效物质基础与作用机制,以及制订科学的质量控制方法和质量控制体系提供了前提和依据。

### 1.1 原料药材化学物质组研究

疏风解毒胶囊共由 8 味药材组成,本课题组采用 HPLC-Q/TOF-MS 方法,分别对虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.、连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl、板蓝根 *Isatis indigotica* Fort.、柴胡 *Bupleuri Radix*、败酱草 *Patriniae Herba*、马鞭草 *Verbena officinatis* L.、芦根 *Phragmitis Rhizoma*、甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 8 味药材的化学物

质组进行了辨识研究<sup>[4-6]</sup>。从虎杖药材中共检测出 13 种化合物,包括 4 个二苯乙烯类化合物,5 个蒽醌类化合物,1 个黄酮类成分,1 个儿茶素类酚酸类成分,2 个决明松类成分;从连翘中识别了 25 个化合物,包括 12 个苯乙醇苷类成分,8 个木脂素类成分,5 个黄酮类化合物;从板蓝根中识别了 22 个化合物,包括 8 个氨基酸类成分,1 个生物碱类成分,3 个糖类成分,3 个木质素类成分,3 个黄酮类成分和 4 个小分子酚酸类成分;从柴胡中辨识 19 个成分,分别是绿原酸、芦丁、异绿原酸 A、异绿原酸 B、7-甲氧基异鼠李素、草柴胡皂苷、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B2、3"-乙酰化柴胡皂苷 A、3"-乙酰化柴胡皂苷 B2、丙二酰基柴胡皂苷、2"-乙酰化柴胡皂苷、柴胡皂苷 D、6"-乙酰化柴胡皂苷 A、6"-乙酰化柴胡皂苷 B2、丙二酰基柴胡皂苷 D、2",3"-乙酰化柴胡皂苷 A、2",3"-乙酰化柴胡皂苷 B2、5-羟基-7-乙酰氧基黄酮;从马鞭草中鉴定了 22 个化合物,其中 5 个环烯醚萜类成分,7 个苯丙素类成分,9 个黄酮类化合物和 1 个小分子酸性成分;从败酱草中鉴定了 21 个化合物,其中包括 4 个环烯醚萜类成分,2 个香豆素类成分,5 个黄酮苷类成分,6 个木脂素类成分和 4 个三萜类成分;从芦根药材中共辨识出 9 个化合物,包括 3 个生物碱,2 个酚酸,1 个木脂素,3 个其他类化合物;从甘草中鉴定了 40 种化合物,包括 26 个黄酮类成分,11 个三萜皂苷类成分,2 个香豆素类化合物和 1 个其他类化合物。

### 1.2 疏风解毒胶囊化学物质组研究

通过 HPLC-Q/TOF-MS 法从疏风解毒胶囊的指纹图谱中共识别了 96 个离子流色谱峰,分析确定了其中 94 个化合物,其中氨基酸 7 个、糖类 1 个、环烯醚萜类 7 个、苯乙醇苷类 11 个、二苯乙烯类 2 个、黄酮类 25 个、木脂素类 5 个、蒽醌类 6 个、三萜类 18 个、香豆素类 1 个、酚酸类 4 个、生物碱类 5 个、其他小分子化合物 2 个。对所有化合物分别进行了药材来源归属,结果分别来源于处方中的虎杖 12 个、连翘 18 个、板蓝根 14 个、柴胡 8 个、败酱草 14 个、马鞭草 11 个、芦根 5 个、甘草 21 个<sup>[3]</sup>。

### 1.3 疏风解毒胶囊入血成分及其代谢产物研究

运用 UPLC-Q/TOF-MS 的技术方法,对口服给予疏风解毒胶囊后大鼠血浆中的吸收原型成分及其

代谢产物进行辨识研究,结果在大鼠血浆中共鉴定得到 46 个疏风解毒胶囊相关的外源性化合物,包括 27 个吸收原型药物成分(黄酮类 8 个、蒽醌类 4 个、二苯乙烯类 4 个、环烯醚萜类 2 个、木脂素类 2 个、萜类 2 个、苯乙醇苷类 1 个、三萜皂苷类 1 个和其他化合物 3 个)和 19 个代谢产物。在给药大鼠血浆中检测到的吸收原型成分及其代谢产物,可能是复方潜在真正的活性成分,并与疏风解毒胶囊的药理作用直接相关。

## 2 药效物质基础研究

疏风解毒胶囊可治疗急性上呼吸道感染,本课题组首先以炎症为切入点,通过体外筛选实验,明确了疏风解毒胶囊的抗炎活性物质。进一步利用网络药理学方法,对筛选出的抗炎活性物质进行了反向对接,得到其抗炎网络药理图,阐述了其抗炎作用机制;并基于 G-蛋白偶联受体和相关酶进行实验验证。最后,通过谱-效分析方法,从疏风解表和清热解热 2 个方面,筛选和确定了疏风解毒胶囊的药效物质基础。

### 2.1 基于 UPLC-Q/TOF-MS 整合 NF- $\kappa$ B 双荧光素酶报告基因系统的抗炎药效物质基础的筛选

利用 UPLC-Q/TOF-MS 整合 NF- $\kappa$ B 双荧光素酶报告基因系统的筛选体系,快速准确地筛选鉴定疏风解毒胶囊中潜在的抗炎活性成分,明确其抗炎药效物质基础。通过活性筛选实验,确定了样品中 10 个活性单体,按照结构类型分类,主要有苯乙醇苷类(连翘酯苷 E、连翘酯苷 A、异连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷)、环烯醚萜苷类(戟叶马鞭草苷、马鞭草苷)、木脂素类(连翘苷)、黄酮类(3-羟基光甘草酚、牡荆苷)和蒽醌类(大黄素)化合物<sup>[7]</sup>。

### 2.2 基于网络药理学的抗炎活性成分作用靶点、通路预测分析

对筛选鉴定出的 10 个抗炎活性单体(连翘酯苷 E、连翘酯苷 A、异连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、连翘苷、3-羟基光甘草酚、牡荆苷、大黄素)利用 PharmMapper 和 KEGG 等生物信息学手段对其进行靶点及作用通路的预测分析,预测 10 种成分可能通过 HRAS、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1)、丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 (MAP2K1) 等 31 个靶点作用于炎症反应的黏着斑 (focal adhesion)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、Fc epsilon RI、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、B 细

胞受体和 T 细胞受体信号等 19 条通路,最后利用 Cytoscape 软件构建了疏风解毒胶囊抗炎活性成分的“分子-靶点-通路”的网络预测图<sup>[7]</sup>。

### 2.3 基于 G-蛋白偶联受体的药效物质基础验证研究

为进一步研究和阐明疏风解毒胶囊的药效物质基础,在化学物质组、抗炎活性筛选以及网络药理学研究的基础上,并结合相关文献报道<sup>[8-10]</sup>,选取了与发汗、抗炎和免疫调节作用密切相关的多个受体 [M<sub>3</sub> 乙酰胆碱受体 (M3)、 $\beta_2$  肾上腺素受体 (ADRB2)、 $\alpha_1$  肾上腺素受体 (ADRA1B)] 及磷酸二酯酶 PDE4B 为研究对象,通过运用胞内钙离子荧光检测技术和酶抑制剂检测技术,评价了疏风解毒胶囊及 14 个代表性单体虎杖苷、大黄酸、大黄素、白藜芦醇 (虎杖); 连翘酯苷 A、松脂素-4-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、连翘苷 (连翘); 马鞭草苷、戟叶马鞭草苷、毛蕊花糖苷 (马鞭草); 柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D (柴胡) 和甘草酸、甘草苷 (甘草) 给药后对 M3 和 ADRB2 的激动作用,对 ADRA1B 及 PDE4B 的抑制活性,从而揭示疏风解毒胶囊的药效物质基础及作用机制。

实验选取了与“发汗”密切相关的 M3、ADRB2 和 ADRA1B 为研究载体,评价了疏风解毒胶囊及代表性化合物对 3 个受体的激动或拮抗作用。结果显示,疏风解毒胶囊对 M3、ADRB2 有显著的激动作用,对 ADRA1B 受体也显示出显著抑制活性;方中大黄酸、柴胡皂苷 A 及柴胡皂苷 D 对 M3、ADRB2 激动作用明显,大黄素、白藜芦醇、松脂素-4-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷以及柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 对 ADRA1B 有显著抑制作用,初步揭示了疏风解毒胶囊发挥发汗解热作用的物质基础可能为虎杖药材中的大黄酸、大黄素、白藜芦醇,连翘药材中的松脂素-4-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷以及柴胡药材中的柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D。

在抗炎作用方面,选择与抗炎作用可能密切相关的磷酸二酯酶 4B (PDE4B) 亚型,研究考察了疏风解毒胶囊和 14 个代表性化合物对 PDE4B 的抑制活性。结果显示,疏风解毒胶囊对 PDE4B 抑制率达到 75.11%,显示出较强的抑制活性,并且在化合物对该酶抑制作用的进一步实验中发现,大黄酸、大黄素、连翘酯苷 A、松脂素-4-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、毛蕊花糖苷对该酶都显示出显著的抑制活性。由此推断,疏风解毒胶囊可能是通过抑制 PDE4B 的活性,阻断细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的降解,从

而抑制炎症反应,发挥治疗作用。其药效物质基础可能为虎杖药材中的大黄酸、大黄素,连翘药材中的连翘酯苷 A、松脂素-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷,以及马鞭草药材中的毛蕊花糖苷。

#### 2.4 基于谱-效筛选方法的疏风解毒胶囊药效物质基础研究

基于疏风解毒胶囊的传统功效,选择与传统功效密切相关的药效表达模型进行“谱-效”关联分析。运用均匀设计对疏风解毒胶囊的 8 味药材进行配比,以配比的 22 个组合为研究对象,选择与疏风解表、清热解毒相关的体外药效模型(如乙酰胆碱受体、脂多糖诱导的炎症模型),采用“谱-效”关系研究方法,对不同组合的疏风解毒胶囊进行 LC-MS 谱分析和体外细胞活性实验。利用人工神经网络(ANN)分析等数理统计方法对获取的图谱数据和体外活性数据进行整合分析,建立其“谱-效”关系,筛选得到与发汗、抗炎作用密切相关成分,从疏风解表和清热解毒 2 方面,阐释疏风解毒胶囊的药效物质基础。

结果表明, M3 控制由副交感神经节后纤维所支配的平滑肌收缩和腺体分泌,与发汗密切相关。M3 模型所识别的 15 个化学成分类型为三萜皂苷类(甘草酸、二氢败酱苷、柴胡皂苷 D)、苯乙醇苷类(连翘酯苷 E、连翘酯苷 I、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷)、木脂素类(连翘苷、松脂素- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷)、蒽醌类(大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酸)、二苯乙烯类(反式-虎杖苷)、黄酮类(甘草素、甘草苷、7-甲氧基异鼠李素),以上成分可能是疏风解毒胶囊疏风解表作用的物质基础。

抗炎模型所识别的 13 个化学成分类型为环烯醚萜类(马鞭草苷)、黄酮类(甘草素、异甘草苷、芹糖基-异甘草苷)、木脂素类(松脂素- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷)、二苯乙烯类(反式-虎杖苷)、三萜皂苷类(羟基甘草酸、柴胡皂苷 D)、蒽醌类(大黄素、大黄酸)、苯乙醇苷类(毛蕊花糖苷、连翘酯苷 A、连翘酯苷 E)、蒽醌类(决明酮-8-*O*-葡萄糖苷)。以上成分可能是疏风解毒胶囊清热解毒作用的物质基础。

### 3 作用机制研究

疏风解毒胶囊具有清热解毒、疏风解表的作用,临床用于治疗急性上呼吸道感染风温肺热证。基于传统功效,以整体动物模型、基因组学等方法,从抗炎免疫、解热等方面阐释其作用机制,并阐明主要成分的药动学及组织分布规律。

### 3.1 抗炎、免疫作用机制研究

**3.1.1 基于大鼠肺炎模型的抗炎作用机制研究<sup>[11]</sup>**  
采用肺炎链球菌致肺炎模型,观察疏风解毒胶囊给药后对淋巴细胞分类,细胞因子白细胞介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、 $\alpha$  干扰素(IFN- $\alpha$ )、 $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )含量,免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 M(IgM)、免疫球蛋白 G(IgG)含量,胸腺、脾脏、肺脏质量的影响。结果显示,疏风解毒胶囊能显著降低模型组大鼠外周血 B 细胞和 CD8<sup>+</sup>比例,降低血清 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IgM、IgG 水平,降低胸腺、脾脏、肺脏质量,升高外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值及 NK 细胞比例。表明疏风解毒胶囊有显著的免疫调节作用,其通过降低 B 细胞、CD8<sup>+</sup>比例,IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IgM、IgG 水平,以及胸腺、脾脏、肺脏质量,升高 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值及 NK 细胞比例对肺炎模型大鼠有显著的治疗作用。

**3.1.2 基于小鼠急性肺炎模型基因组学研究<sup>[12]</sup>**  
通过建立小鼠肺炎模型,并给予疏风解毒胶囊干预,首先考察了疏风解毒胶囊对肺损伤小鼠的保护作用。进一步选取空白组、阳性药组和疏风解毒胶囊给药组小鼠的肺样本,采用基因芯片技术对其进行分析,得到显著差异表达基因和相关作用通路。然后利用 PharmMapper 和 KEGG 等生物信息学手段对疏风解毒胶囊的抗炎活性物质进行反向分子对接预测到的靶点蛋白和相关作用通路进行比对,分析疏风解毒胶囊可能的作用通路及相关机制。并结合前期化学物质组研究结果和虚拟评价等方法,系统阐释其治疗肺炎的作用物质基础及作用机制。

结果显示,疏风解毒胶囊中源自连翘的连翘酯苷 A、E 和连翘苷,源自虎杖的大黄素,源自马鞭草的戟叶马鞭草苷、马鞭草苷等成分均能不同程度、多渠道地发挥抗炎、调节免疫作用。其中连翘中活性成分与 MAPK10、HRAS、原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)、PDPK1 等受体结合能较强,上述受体作用广泛,为 MAPK、B cell receptor、PPAR、Fc epsilon RI、focal adhesion、gap junction、ErbB、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、VEGF 等信号通路中关键蛋白;虎杖中活性成分与苏氨酸蛋白激酶(BRAF)受体结合能较强,此受体为 ErbB、mTOR 信号通路中关键蛋白;马鞭草中活性成分与 HRAS 受体结合能较强,此受体为 MAPK、B cell receptor、Fc epsilon

RI、focal adhesion、gap junction、ErbB、VEGF 等信号通路中关键蛋白。MAPK、B cell receptor、PPAR、Fc epsilon RI、focal adhesion、gap junction、ErbB、mTOR、VEGF 等信号通路均为炎症反应、免疫调节中的关键通路。

结果表明,连翘酯苷 A、连翘酯苷 E、连翘苷、大黄素、戟叶马鞭草苷、马鞭草苷等成分为疏风解毒胶囊抗炎、调节免疫作用的主要物质基础,其多种成分可以通过多靶点、多通路的模式共同调控炎症与免疫反应,进而发挥治疗风热上感作用。另外,基因组学研究显示,疏风解毒胶囊作用也与调节能量代谢、微循环等方面有一定关联,可能还在不同途径发挥治疗作用。

### 3.2 解热作用机制研究<sup>[13]</sup>

采用酵母致发热大鼠模型评价疏风解毒胶囊的解热作用及作用机制,结果显示,疏风解毒胶囊能显著降低体温,有显著的解热作用。疏风解毒胶囊能显著降低炎症因子前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 及细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平,显著降低致热介质 cAMP 及 cAMP/环磷酸鸟苷 (cGMP) 水平,显著降低 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase,减少产热,显著升高内源性解热介质精氨酸加压素 (AVP) 的含量。

PGE<sub>2</sub> 是体温调节有关的最主要介质,尤其是在感染性发热中。发热时动物脑脊液内 PGE<sub>2</sub> 水平增高。和体温调节有关的其他中枢介质也和 PGE<sub>2</sub> 有关。PGE<sub>2</sub> 与其受体结合后,通过信号转导通路改变体温调节中枢体温调节点水平,从而引起机体产热和散热变化,使体温升高。本研究实验结果显示,模型组大鼠血清及下丘脑 PGE<sub>2</sub> 显著升高,而疏风解毒胶囊能降低 PGE<sub>2</sub> 含量,发挥解热作用。

TNF 是一个重要的内源性致热原,TNF- $\alpha$  作为一个内源性致热原不同病因所致发热机制中的一个共同环节。模型组大鼠血清及下丘脑 TNF- $\alpha$  显著升高,从而导致动物体温升高,而疏风解毒胶囊能显著降低 TNF- $\alpha$  含量,表明疏风解毒胶囊能通过降低 TNF- $\alpha$  含量从而发挥解热作用。

IL-1 是重要的致热细胞因子,分为 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  2 种类型,其中 IL-1 $\beta$  是目前公认的内生致热源之一,其机制是通过与终板血管器的血管内皮细胞及其周围的巨噬细胞、小胶质细胞膜上的 IL-1 受体结合,促进靶细胞内 PGE<sub>2</sub> 的合成,生成 PGE<sub>2</sub> 以旁分泌形式诱导下丘脑温度敏感神经元细胞膜上的 PGE<sub>2</sub> 受

体与之结合,进而引起后续细胞信号的转导。实验结果显示,模型组大鼠下丘脑 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  均显著升高,从而导致动物体温升高,而疏风解毒胶囊能降低 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量,发挥解热作用。

IL-6 是多种发热的中间物质,目前已知多种细胞可以自发或在不同刺激后产生 IL-6,其生物学效应呈现多样性,在发热机制中具有举足轻重的作用。实验结果显示,模型组大鼠血清及下丘脑 IL-6 显著升高,从而导致动物体温升高,而疏风解毒胶囊能显著降低 IL-6 含量从而发挥解热作用。

AVP 是一种 9 肽神经递质,分布于中枢神经系统 (CNS) 的细胞体、轴突和神经末梢,包括其作用部位脑腹中膈区 (VSA) 和中杏仁核的神经末梢,机体发热时其含量增多。众多研究表明,AVP 具有明显的抑热作用,AVP 被认为是一种内源性解热物质。其中枢作用于 VSA 的 V1 亚型受体发挥解热或限热作用。AVP 可能是通过影响位于 POAH 区的温度敏感神经元的放电频率而影响体温,VSA 中 AVP 含量下降,表明 AVP 释放增多,刺激 AVP 的内源性释放可抑制发热。模型组大鼠下丘脑 AVP 显著升高,提示发热模型动物体温升高,激活机体自身体温调节系统,引起内源性解热物质 AVP 分泌增加,但其增加幅度不足以抵抗致热因子引起的发热,而疏风解毒胶囊能进一步促进 AVP 分泌,发挥解热作用。阳性药阿司匹林组 AVP 含量降低可能与阿司匹林发挥解热作用引起大鼠体温降低从而使内源性解热物质 AVP 分泌减少有关。

cAMP 是接近体温调节终末环节的发热介质<sup>[14]</sup>,大多数学者认为 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> 上升诱导下丘脑内 cAMP 的含量上升是多种致热原引起发热的共同中介环节。发热动物模型脑脊液及下丘脑组织中,cAMP 含量增多与体温升高呈显著正相关。cAMP 和 cGMP 是公认的生物控制的关键因子,对细胞的内调节起正负影响。一般认为 cAMP 和 cGMP 的比值比两者任何一种的实际浓度更为重要,体温随 cAMP 和 cGMP 比值的变化而变化。Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase 也称钠泵,维持细胞内外钠钾离子浓度,在机体产热生成中占非常重要的地位。模型组大鼠下丘脑 cAMP、cAMP/cGMP、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase 均显著升高,疏风解毒胶囊能显著降低 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 值,降低 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase,表明疏风解毒胶囊能通过降低 cAMP 含量及 cAMP/cGMP 值,降低 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATPase 活力,减少产热,从而发挥解热作用。

#### 4 主要成分药动力学及组织分布研究

药物的体内暴露、组织分布及其动力学规律是其发挥疗效的重要依据,为了系统阐释疏风解毒胶囊的作用规律,本课题组又对其主要成分的药动力学及组织分布进行了研究,药动力学研究结果显示,大鼠血浆中大黄素药物浓度的达峰时间( $t_{max}$ )为 8.82 h、峰浓度( $C_{max}$ )为 76.70  $\mu\text{g/L}$ 、消除半衰期( $t_{1/2}$ )为 6.88 h、滞留时间( $MRT_{0\sim t}$ )为 11.27 h 和药时曲线下面积( $AUC_{0\sim t}$ )为 985.47  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ;马鞭草苷药物浓度的 $t_{max}$ 为 4.20 h、 $C_{max}$ 为 92.15  $\mu\text{g/L}$ 、 $t_{1/2}$ 为 3.47 h、 $MRT_{0\sim t}$ 为 5.22 h 和  $AUC_{0\sim t}$ 为 649.49  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ 。大鼠 ig 给予疏风解毒胶囊供试药溶液后,大黄素吸收较快,在 15 min 内即达到较高浓度,血药浓度-时间曲线呈现双吸收峰,其在体内可能存在肝肠循环,体内滞留时间较长;马鞭草苷的吸收相对较慢,与大黄素相比,其半衰期较小,体内滞留时间较短,不存在药物肝肠循环现象。

肺组织分布研究结果显示,大鼠肺组织中大黄素药物浓度的 $t_{max}$ 为 2.05 h、 $C_{max}$ 为 66.37 ng/g、 $t_{1/2}$ 为 3.14 h、 $MRT_{0\sim t}$ 为 4.40 h 和  $AUC_{0\sim t}$ 为 386.43 ng·h/g。

蒽醌类成分大黄素为疏风解毒胶囊的主要活性成分,且在体内具有较大暴露量。通过测定给药后不同时间点肺组织中的药物浓度,对大黄素的肺组织分布特性进行研究,反映了疏风解毒胶囊在肺靶器官的组织分布过程,为阐明其药效作用机制和促进临床应用提供了科学依据。

#### 5 配伍规律研究

##### 5.1 基于大鼠急性肺炎模型的配伍规律研究

中药的配伍理论是中医药理论的精华,是体现方证对应、临证治法的核心内容。疏风解毒胶囊具有疏风解表、清热解毒的作用,故从功能配伍进行拆方研究,研究清热解组(虎杖、板蓝根、败酱草、马鞭草、甘草)、解表组(连翘、柴胡、芦根)及其配伍组合分别对急性肺炎模型大鼠血清细胞因子含量的影响,从而分析疏风解毒胶囊配伍合理性。结果显示,疏风解毒胶囊全方、解表组、清热解组均能显著降低 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-10 含量,且全方组大鼠在 IL-1 $\beta$  含量这个指标上  $Q$  值(用于判断两药在配伍使用后的效果是否优于单独给药的参数) > 1;疏风解毒胶囊全方、解表组、清热解组均能显著降低 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  含量,疏风解毒胶囊全方、解表组能显著

降低 IFN- $\alpha$  含量;且全方组大鼠在 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  含量这 2 个指标上  $Q$  值 > 1。

细胞因子全程参与肺炎的发生发展过程,承接固有免疫反应及适应性免疫应答反应,肺炎急性期 IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等致炎性细胞因子含量显著增加<sup>[15]</sup>。解表组虎杖含羟基大黄素与白藜芦醇,可通过抑制蛋白激酶 B (Akt) 和氨基末端激酶 (JNK) 通路抑制炎症细胞分化增殖,降低 NF- $\kappa$ B 表达<sup>[16]</sup>;连翘主要活性成分连翘苷、连翘酯苷等均有抗炎活性,连翘可以通过影响 NF- $\kappa$ B 信号转导通路、酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK-STAT) 通路和 MAPK 通路 3 条信号通路,调控炎症过程中的多种酶及炎症介质的产生,发挥抗炎功效<sup>[17]</sup>;板蓝根中总苯丙素部位、总有机酸部位、总生物碱部位等有机成分均有抑菌和解热药效,板蓝根多糖可抑制脂多糖刺激引起的 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合活性的升高<sup>[18]</sup>。

疏风解毒胶囊解表组分和清热解组有显著的协同作用,2 组分配伍用药能显著协同降低细胞因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  含量,抑制肺炎发展进程,这与 2 组分配伍通过多靶点、多途径、多环节协同发挥抗炎作用有关,从而在抗菌、抗炎、增强免疫等方面发挥治疗效果。

##### 5.2 基于网络药理学方法的配伍规律研究

采用网络药理学的方法,对疏风解毒胶囊中清热解组、解表组和甘草组的 32 个化合物的作用靶点和通路进行预测和筛选,通过数据整合分析,剖析该方的作用特点及配伍规律。结果显示,32 个化合物可作用于 94 个相关靶点和 34 条相关通路,主要涉及炎症反应、细菌脂多糖反应、免疫反应等相关过程。3 组既有共同的作用靶点群及通路群,又各有偏重,协同发挥治疗作用。

清热解组涉及 58 个靶点蛋白主要与免疫反应、防御反应、细菌脂多糖反应和炎症反应等过程相关。其中 34 个蛋白与免疫反应相关,包括一氧化氮合酶 2 (NOS2)、转化生长因子  $\beta$ 1 (TGFB1)、巨噬细胞集落刺激因子 (CSF2)、IL-4 等;33 个蛋白与防御反应相关,包括酪氨酸蛋白激酶 (BTK)、转录因子 p56 (HCK)、半胱天冬酶 9 (CASP9) 等;32 个蛋白与脂多糖、细菌反应相关,包括 IL-8、IL-1 $\beta$ 、前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、一氧化氮合酶 3 (NOS3) 等;21 个蛋白与炎症反应相关,包括 IL-6、前列腺素 E 合酶 (PTGES)、胞间黏着

分子 1 (ICAM1)、环前列腺素合酶 (PTGIS) 等。

解表组 12 个化合物作用于 43 个靶点, 其中包括连翘药材中 5 个化合物的 22 个作用靶点, 柴胡药材中 5 个化合物的 24 个作用靶点, 芦根药材中 3 个化合物的 18 个作用靶点。43 个靶点蛋白主要与防御反应、细菌脂多糖反应、炎症反应和发汗解热等过程相关。其中 23 个蛋白与防御反应相关; 20 个蛋白与脂多糖、细菌反应相关; 16 个蛋白与炎症反应相关; 13 个蛋白与发汗解热相关, 包括乙酰胆碱酯酶抑制剂 (ACHE)、IL-1 $\beta$ 、 $\alpha$ 1A 肾上腺素受体 (ADRA1A)、转录因子 AP-1 (JUN)、PDPK1 等。

甘草组 5 个化合物作用于 19 个靶点蛋白, 主要与免疫反应、糖皮质激素反应、脂多糖反应等生理过程相关。其中在 19 个靶点蛋白中, 有 14 个蛋白与免疫反应相关; 7 个与糖皮质激素反应有关, 包括糖皮质激素受体 (NR3C1)、糖皮质激素 11 $\beta$ -脱氢酶同工酶 2 (HSD11B2)、IL-6 等; 6 个与脂多糖反应有关。

分析发现, 清热解组可作用于与炎症反应、细菌脂多糖反应、防御反应和免疫反应相关的蛋白靶点, 表明清热解组药材可以通过直接干预细菌脂多糖等的入侵, 起到解毒、阻止炎症过程发展的作用, 同时通过激发机体防御体系, 增强机体免疫力, 起到辅助治疗的作用。解表组药材同样可作用于与炎症、细菌脂多糖和防御反应相关的蛋白靶点, 与清热解组药材协同发挥治疗作用。另外, 解表组亦可通过参与多条途径作用于发汗解热过程。如通过间接作用于中枢性发热正向调节介质——cAMP, 抑制其产生与释放, 抑制体温调定点的上移, 使体温下降, 干预机体发热过程; 通过乙酰胆碱酯酶 (AChE) 抑制剂, 使胆碱能神经末梢释放的乙酰胆碱 (ACh) 堆积, 表现 M 样作用增强而发挥兴奋胆碱受体, 起到发汗作用; 通过作用于主要分布在血管平滑肌 (如皮肤、黏膜血管, 以及部分内脏血管) 的  $\alpha$ <sub>1</sub> 肾上腺素受体, 扩张血管, 增强皮肤血液循环, 促进发汗。甘草组可作用于与免疫反应、糖皮质激素反应、脂多糖反应等过程相关的靶点, 从抗炎、增强机体免疫等方面起到辅助治疗作用。

清热解组、解表组和甘草组既有共同的作用靶点群及通路群, 又各有偏重, 作用靶点涉及炎症反应、免疫反应、细菌内毒素反应、防御反应、发汗解热、糖皮质激素反应等各个环节, 各通路群间通过共有靶点连接, 显示出不同成分间的多靶点、

多途径的协同作用。

## 6 质量标准提升研究

为了全面提升疏风解毒胶囊的质量控制水平, 本课题基于原料药材到成品的质量传递、溯源及全程质量控制理念, 从多批样品、多指标成分的含量测定、指纹图谱共有模式的建立等方面进行系统研究, 建立疏风解毒胶囊的药材与成品的质量控制体系, 对原有的质量标准进行了全面提升<sup>[19]</sup>。

### 6.1 疏风解毒胶囊主要组成药材质量研究

**6.1.1 指纹图谱研究<sup>[20-21]</sup>** 建立了虎杖、连翘、柴胡、板蓝根、马鞭草、败酱草、芦根和甘草 8 味原料药材/饮片的指纹图谱质量控制方法, 并通过系统聚类分析、主成分分析和相似度评价系统建立各个药材/饮片对照指纹图谱共有模式; 分别对虎杖等 8 味原料药材/饮片的 112 个批次药材/饮片样品建立指纹图谱进行质量评价。

采用化学对照品法及 HPLC-MS 方法分别对虎杖、连翘、柴胡、板蓝根、马鞭草、败酱草、芦根和甘草 8 味原料药材/饮片指纹图谱中的主要特征峰进行了指认。

**6.1.2 多指标成分含量测定研究** 建立 HPLC 法同时测定马鞭草中鞣马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷 3 个成分的定量测定方法, 并进行了系统的方法学研究, 包括色谱条件优化、供试品溶液制备方法考察、专属性研究、线性范围、精密度、稳定性、重现性和加样回收率实验, 结果均符合要求。所建立的方法简便、准确, 重复性好, 能够有效控制马鞭草的质量。采用建立的多指标测定方法对 14 批马鞭草饮片进行评价。依据《中国药典》2015 年版一部虎杖、连翘、甘草、柴胡、板蓝根的含量测定方法, 测定了 5 味药材共 70 批次的含量。

### 6.2 疏风解毒胶囊质量标准提升研究

疏风解毒胶囊原质量标准较为粗泛, 只有马鞭草、连翘及柴胡 TLC 鉴别及 TLCS 法测定大黄素含量, 方法简单, 难以全面控制产品的质量, 本课题对其质量标准进行系统提升研究。

**6.2.1 指纹图谱研究<sup>[22]</sup>** 建立了疏风解毒胶囊指纹图谱质量控制分析方法, 采用所建立的方法对 14 批疏风解毒胶囊样品进行了指纹图谱测定, 采用相似度、聚类分析及主成分分析等数据处理方法进行指纹图谱的模式识别研究, 确定 22 个共有峰, 以 21 号峰为参照峰计算各峰相对保留时间和相对峰面积, 稳定性试验、重现性试验和精密度试验 RSD

值均在 5% 以下, 表明该方法稳定、可靠、专属性强、重现性好。

**6.2.2 多指标成分含量测定**<sup>[23]</sup> 建立了疏风解毒胶囊 HPLC 多指标成分含量测定的方法, 同时测定虎杖苷、大黄素、连翘酯苷 A、戟叶马鞭草苷、马鞭草苷、毛蕊花糖苷、甘草酸 7 个有效成分含量, 该方法简便、快捷、重复性好, 可同时测定 7 种成分。建立了基于“有效性”的疏风解毒胶囊定量控制标准, 以保证本品的有效性及其稳定均一性。为疏风解毒胶囊质量控制提供了保障。对 14 批疏风解毒胶囊中的 7 种成分进行了含量测定。结合药理学和药动学, 所确定的 7 种成分为本品质量标志物研究提供了实验依据。

综上所述, 本课题从全过程质量控制的角度, 通过化学成分研究及质控指标的确定、多指标成分含量测定、指纹图谱等质控手段和方法, 建立了从原料药材到成品的全过程的质量控制体系, 对疏风解毒胶囊质量研究进行了全面的提升。

## 7 结语

### 7.1 中药大品种二次开发是突破制约中医药理论和中药产业发展瓶颈的重要路径

通过二次开发研究, 以现代科学方法、客观指标和实验证据阐明中药复杂体系的药效物质基础和作用机制, 发现和提炼中药大品种的作用特点和比较优势, 挖掘其临床核心价值, 指导临床实践, 提高临床疗效; 并建立科学、有效的质量控制方法, 保证药品的质量均一、稳定、可控。

### 7.2 化学物质组研究是中药大品种二次开发研究的基础工作

基于中药复杂体系及其产业链长的特点, 化学物质组的辨识应对原料药材、制剂、入血成分及其代谢产物的化学物质组进行系统表征和辨识, 阐明化学物质基础在整个药物形成过程的传递规律。为阐释药效物质基础与作用机制以及制订科学的质量控制方法和质量控制体系提供了前提和依据。

### 7.3 药效物质基础的确定是认识中药有效性表达方式的前提条件

基于“系统-系统”的系统生物学方法和“成分-靶点”的化学生物学方法都是行之有效的方法; “谱-效”分析方法基于处方背景, 又通过数学模型统计分析, 关联谱(成分)-功效的对应关系, 也是药效物质基础筛选的可行路径。

### 7.4 作用机制研究是打开中药功效“黑箱”的钥匙

作用机制研究应紧紧围绕研究对象组成、功效及其适应症, 特别是基于配伍环境, 以方证对应的角度, 阐释中药治疗疾病的科学内涵。

通过对疏风解毒胶囊进行了系统的二次开发研究, 系统辨识了其化学物质组, 筛选和明确了主要药效物质基础; 阐明了作用机制; 通过拆方研究阐释了该药的组方特点和配伍规律, 提炼和发现了其作用特点、比较优势和临床核心价值; 基于中药质量标志物五元素关联研究分析, 对原有的质量标准进行了全面的提升, 为保证产品的质量均一、稳定、可控奠定了基础。本课题研究为该品种的临床推广应用和指导临床实践提供了重要的理论和实验依据, 并为其他中药大品种的二次开发研究提供了可参考的思路与模式。

## 参考文献

- [1] 叶祥庆, 曾德志, 罗世芳, 等. 疏风解毒胶囊治疗感冒风热证临床观察 [J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 664-666.
- [2] 胡蓉, 王丽华, 张珺珺, 等. 疏风解毒胶囊治疗急性咽喉炎风热证的临床观察 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 460-462.
- [3] 张铁军, 朱月信, 刘岱琳, 等. 疏风解毒胶囊药效物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2019-2026.
- [4] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柴胡化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2044-2052.
- [5] 张晨曦, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于液质联用技术的连翘化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2053-2060.
- [6] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [7] Tao Z G, Meng X, Han Y Q, *et al.* Therapeutic mechanistic studies of ShuFengJieDu Capsule in an acute lung injury animal model using quantitative proteomics technology [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(11): 4009-4019.
- [8] 刘国清, 王涛, 余林中, 等. 麻黄汤的发汗作用与 M 受体的关系研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(16): 1210-1211.
- [9] Bovell D L, Holub B S, Odusanwo O, *et al.* Galanin is a modulator of eccrine sweat gland secretion [J]. *Exp Dermatol*, 2013, 22(2): 141-143.
- [10] Souness J E, Aldous D, Sargent C. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors [J].

- Immunopharmacology*, 2000, 47(2/3): 127-162.
- [11] 马莉, 黄妍, 侯衍豹, 等. 疏风解毒胶囊对大鼠肺炎模型的抗炎机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4591-4595.
- [12] Li Y M, Chang N W, Han Y Q, *et al.* Anti-inflammatory effects of Shufengjiedu capsule for upper respiratory infection via the ERK pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 758-766.
- [13] 刘静, 马莉, 陆洁, 等. 疏风解毒胶囊解热作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2040-2043.
- [14] 谢新华, 董军. 细胞因子与发热机制研究进展 [J]. 广东医学, 2005, 26(8): 1156-1158.
- [15] 姜小丽, 杨宝辉, 杨婷, 等. 肺炎链球菌感染小鼠早期肺组织细胞因子变化研究 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(6): 484-489.
- [16] 肖文渊, 王思芦, 郝应芬, 等. 虎杖乙醇提取物的抗炎及免疫活性初探 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(6): 34-36.
- [17] 龚莉虹, 余琳媛, 胡乃华, 等. 连翘抗炎药效物质基础及其作用机理研究进展 [J]. 中药与临床, 2019, 10(1): 43-49.
- [18] 文飞翔. 板蓝根抗炎活性部位抗炎作用的药理机制研究 [J]. 中国医药指南, 2013, 11(30): 41-42.
- [19] 张铁军, 朱月信, 刘素香, 等. 疏风解毒胶囊的系统质量标准提升研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2027-2033.
- [20] 刘素香, 刘毅, 白雪, 等. 败酱草指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2074-2077.
- [21] 刘素香, 白雪, 刘毅, 等. 马鞭草 HPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2069-2073.
- [22] 曹勇, 郭倩, 田成旺, 等. 疏风解毒胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2034-2039.
- [23] 郭倩, 田成旺, 朱月信, 等. HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1174-1177.