

基于部分药效和毒副作用探索中药汤剂抑苦掩味伴侣剂的影响：以黄连解毒汤为例

柯秀梅¹, 周文杰^{2#}, 廖丽萍³, 肖浪浪³, 施汝欣³, 王建伟¹, 韩丽^{4*}, 张定堃^{4*}

1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016
2. 四川科伦药业股份有限公司安岳分公司, 四川 成都 611137
3. 九江学院基础医学院/九江市转化医学重点实验室, 江西 九江 332005
4. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: 目的 基于黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu Decoction, HJD) 部分药效和毒副作用评价抑苦掩味伴侣剂 [纽甜、单甲氧基聚乙二醇-左旋聚乳酸 (mPEG₂₀₀₀-PLLA₂₀₀₀)、 γ -环糊精 (γ -CD)、HJD 药液 (以生药量计 0.2 g/mL) 质量比 0.028 : 0.15 : 1.5 : 100] 对中药汤剂疗效和安全性的影响。方法 以 HJD 为例, 采用体外抗氧化 (1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基清除率、超氧阴离子清除率和羟自由基清除率)、抗二甲苯致小鼠耳肿胀和解内毒素致小鼠高热试验研究抑苦掩味伴侣剂对中药汤剂疗效的影响, 以小鼠急性毒性试验研究该伴侣剂对汤剂安全性 (毒性) 的影响, 最后采用 16S rDNA 测序技术探索抑苦掩味伴侣剂对中药汤剂作用 (可能的不良反应) 的影响。结果 抑苦掩味伴侣剂既不影响 HJD 体外抗氧化 (1,1-二苯基-2-苦基肼基自由基、超氧阴离子和羟自由基清除率) 作用, 也不影响 HJD 抗二甲苯致小鼠耳肿胀效果和抗内毒素致热作用。同时, 在实验剂量范围内, 抑苦掩味伴侣剂和 HJD 对小鼠均无急性毒性。此外, 抑苦掩味伴侣剂对小鼠肠道菌群的干扰与 HJD 并无显著性差异。结论 抑苦掩味伴侣剂在实验剂量范围内不影响 HJD 的药效和安全。

关键词: 中药; 抑苦掩味伴侣剂; 药效; 不良反应; 黄连解毒汤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3625-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.007

Exploring influence of bitter taste-masking companion of Chinese medicine decoction based on partial pharmacodynamic and toxic side effects: In a case of Huanglian Jiedu Decoction

KE Xiu-mei¹, ZHOU Wen-jie², LIAO Li-ping³, XIAO Lang-lang³, SHI Ru-xin³, WANG Jian-wei¹, HAN Li⁴, ZHANG Ding-kun⁴

1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Anyue Branch of Sichuan Kelun Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611137, China
3. Jiujiang Key Laboratory of Translational Medicine, College of Mechanical and Material Engineering, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China
4. State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of the bitter taste-masking companion [with mass ratio of neotame, mPEG₂₀₀₀-PLLA₂₀₀₀, γ -CD and Huanglian Jiedu Decoction (HJD, 黄连解毒汤) of 0.028:0.15:1.5:100] on the efficacy and safety of traditional Chinese medicine decoction, partial efficacy and toxic side effects of HJD were explored. **Methods** HJD was taken as an example in this study. Antioxidant activity *in vitro* (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging rate, hydroxyl radical scavenging rate and

收稿日期: 2021-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803745); 国家博士后科学基金面上项目 (2020M683269)

作者简介: 柯秀梅 (1987—), 女, 江西九江人, 博士, 从事中药制剂新技术、新工艺及基础研究。E-mail: 191009@edu.cqmu.cn

*通信作者: 张定堃, 博士, 副教授, 从事中药炮制, 中药制剂新技术、新工艺及基础研究。E-mail: zhangdingkun@cducm.edu.cn

韩丽, 博导, 从事中药炮制, 中药制剂新技术、新工艺及基础研究。E-mail: hanliyx@163.com

#共同第一作者: 周文杰, 硕士, 主要从事中药制剂研究工作。E-mail: 841169954@qq.com

superoxide anion radical scavenging rate), inhibition of xylene-induced ear edema and anti-endotoxin-induced fever test in mice were used to study the effect of the companion of bitter taste-masking on decoction. An acute toxicity test in mice was performed to determine the safety of the companion. Finally, the 16S rDNA sequencing technique was used to analyze the effect of companion on decoction (possible side effects) of microflora in the gut tract. **Results** The companion did not affect the antioxidant effect of HJD *in vitro* (1,1-diphenyl-2-bitter hydrazine free radical, superoxide anion and hydroxyl radical clearance), it also did not affect the role in the inhibition of xylene-induced ear edema and anti-endotoxin-induced fever effect of HJD in mice. At the same time, within the experimental scope, neither the companion nor HJD was acutely toxic to mice. In addition, the disturbance of the companion agent to the intestinal flora of mice was not significantly different from HJD. **Conclusion** The companion didn't affect the efficacy and safety of HJD within the experimental dosage range.

Key words: traditional Chinese medicine; bitter taste-masking companion; efficiency; adverse effect; Huanglian Jiedu Decoction

中医药在疾病治疗中具有综合起效、不良反应小、预后良好的优势,尤其是中药汤剂,具有随证加减、运用灵活,能个性化精准给药的特点。在2019年开始爆发的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)的防治中,中医药功不可没。临床初步证实,清热解毒解表药物及方剂如清肺排毒汤、化湿败毒方、宣肺败毒颗粒、金花清感颗粒和连花清瘟胶囊等对 COVID-19 疗效确切^[1]。此外,黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HJD)被国家卫生健康委员会及各地相关单位陆续发布的多个诊疗方案推荐治疗 COVID-19 重症期的气营两燔证^[2]。作为泻火解毒的经典方剂, HJD 广泛用于中医临床^[3-4]。现代药理研究表明, HJD 能抗肺炎^[5]、抗氧化^[6]、抗炎^[7]、解热^[8-10]、抗血栓^[11]和抗动脉粥样硬化^[12]等。然而,味苦和口感差是中药的共性问题。特别是苦味成分分散度高、难以有效矫味的中药汤剂/液体制剂^[13],口感差严重影响了患者服药顺应性,制约了其临床应用。为了开发有效的中药汤剂/液体制剂矫味剂,本课题组提出基于“霰弹理论”的中药汤剂掩味的研制思路,筛选出能有效改善中药如 HJD 口感的汤剂伴侣剂^[14]。然而,有效性与安全性是药物的基本属性,是其质量控制的核心要义。矫味伴侣剂(辅料)在抑苦掩味的同时,必须以不影响药物的疗效和安全性为前提。本研究以体外抗氧化、解热、抗炎、急性毒性和肠道菌群的变化,从药效、毒性和副作用3个方面评价伴侣剂对 HJD 的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Spectra Max i3X 酶标仪,美谷分子仪器上海有限公司;BSA124S 电子分析天平,德国 Sartorius AG 公司;SW-CJ-2F 双人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司。

1.2 试剂

黄芩、黄连、黄柏和栀子饮片均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学刘晓芬讲师鉴定,为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎,芸香科黄檗属植物黄柏 *Phellodendron chinense* Schneid 除去栓皮的干燥树皮,茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。链霉素,上海研生生化试剂有限公司,质量浓度 99%;青霉素,武汉易泰科技有限公司,质量分数 99%。脂多糖(lipopolysaccharides, LPS),批号 L2880, Sigma 公司。纽甜,郑州阿尔法化工有限公司,质量分数 95%;单甲氧基聚乙二醇-左旋聚乳酸(monomethoxy polyethylene glycol-*l*-poly lactic acid, mPEG₂₀₀₀-PLLA₂₀₀₀),济南岱罡生物工程有限公司,批号 2019071415;γ-环糊精(γ-cyclodextrin, γ-CD),郑州阿尔法化工有限公司,批号 2018122505。三羟甲基氨基甲烷盐酸[tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris-HCl] 缓冲液,北京索莱宝科技有限公司,编号 ST788。维生素 C (vitamin C, VC),北京索莱宝科技有限公司,质量浓度 99%。

1.3 动物

SPF 级昆明小鼠,体质量(20±2)g, SCXK(赣)2008-0003,购自江西省实验动物中心。所有动物实验遵循九江学院附属医院伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 HJD 的制备

课题组前期研究表明,中药汤剂抑苦掩味伴侣剂处方(纽甜、mPEG₂₀₀₀-PLLA₂₀₀₀、γ-CD、HJD 药液质量比 0.028:0.15:1.5:100)能显著改善 HJD 的口感^[13]。本实验进一步评价该抑苦掩味伴侣剂处

方对 HJD 药效和安全性的影响。

2.1.1 HJD 药液 按黄连、黄芩、黄柏、栀子 3 : 2 : 2 : 3 质量比准确称取各药味饮片共 100 g, 混合, 加 10 倍量水浸泡 0.5 h, 回流提取 3 次, 每次 1 h。合并煎液, 定容至药液质量浓度为 0.2 g/mL (按含生药量计), 即得 HJD 药液。

2.1.2 HJD+伴侣剂 按“2.1.1”项方法制备 HJD 药液, 向其中加入处方量(纽甜、mPEG₂₀₀₀-PLLA₂₀₀₀、 γ -CD、HJD 药液质量比 0.028 : 0.15 : 1.5 : 100) 的抑苦掩味伴侣剂, 超声、搅拌, 使其溶解或充分分散, 即得。

2.2 伴侣剂对 HJD 体外抗氧化的影响

2.2.1 1,1-二苯基-2-苦基肼自由基 (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) 清除率的检测 于 96 孔板中加入 190 μ L DPPH 溶液 (0.1 μ mol/L 甲醇溶液) 和 10 μ L 不同质量浓度的样品溶液 (40、20、10 mg/mL)。190 μ L DPPH 和 10 μ L 蒸馏水为空白对照, 混匀后避光震荡 30 min, 测定 517 nm 处的样品吸光度 (A_1) 值和 HJD 自身吸光度 (A_3) 值 (以甲醇替 DPPH 溶液) 及空白对照组吸光度 (A_2) 值, 每组设置 3 个复孔。测定样品对 DPPH 的清除率, 计算公式为清除率 = $1 - (A_1 - A_3) / A_2$ 。

2.2.2 超氧阴离子清除率的检测 向 96 孔板中加入 90 μ L Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值为 8.2),

分别加入不同质量浓度的样品溶液, 25 $^{\circ}$ C 温育 20 min。然后加入 6 μ L 同样预热的邻苯三酚溶液 (18 mmol/L)。5 min 后加入 2 μ L 盐酸溶液 (10 mmol/L), 每组设置 3 个复孔。测定 325 nm 处各样品的吸光度 (A_1) 值, 以蒸馏水替样品的 A_2 和以蒸馏水替邻苯三酚的 A_3 值。测定样品对超氧阴离子的清除率。计算公式为清除率 = $1 - (A_1 - A_3) / A_2$ 。

2.2.3 羟自由基清除率的检测 取系列质量浓度的样品溶液 50 μ L, 加入 6 mmol/L H₂O₂ 溶液、6 mmol/L 硫酸亚铁溶液和 10 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 测定 510 nm 处的吸光度 (A_1) 值。以 VC 为阳性对照 (A_2), 溶剂为空白对照 (A_3), 每组试验设置 3 个复孔。测定样品对羟自由基的清除率, 计算公式为清除率 = $1 - (A_1 - A_3) / A_2$ 。

2.2.4 统计学分析 组间差异采用 Student's *t* 检验, 多重检验校正采用错误发现率 (false discovery rate, FDR), Post-hoc 检验方法选择 Turkey-kramer, sum-rank test (非参数因子克鲁斯卡尔-沃利斯秩和检验) 方法, 找到显著性差异类群, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2.5 伴侣剂对 HJD 体外抗氧化的影响 结果如表 1 所示, 伴侣剂对 HJD 体外清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子无显著性影响, HJD 体外抗氧化作用具有剂量相关性。

表 1 伴侣剂对 HJD 体外抗氧化的影响结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of companion on antioxidation of HJD *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	DPPH 清除率/%			羟自由基清除率/%			超氧阴离子清除率/%		
	2 mg·mL ⁻¹	1 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	2 mg·mL ⁻¹	1 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹	2 mg·mL ⁻¹	1 mg·mL ⁻¹	0.5 mg·mL ⁻¹
HJD	24.3 ± 0.9	25.7 ± 0.5	24.3 ± 2.8	2.7 ± 0.3	1.6 ± 0.5**	1.3 ± 0.1***	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0***
HJD+伴侣剂	28.3 ± 0.2	26.0 ± 0.6	22.8 ± 1.9**	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.1*	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

与高剂量组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与中剂量组比较: *** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs high dose group; *** $P < 0.01$ vs medium dose group

2.3 伴侣剂对 HJD 抗二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

昆明小鼠, 随机分为模型组、醋酸泼尼松组 (阳性药, 9.1 mg/kg), HJD 与 HJD+伴侣剂高、中、低剂量组 (4.505、2.252、1.126 g/kg)。ig 给药, 每天 1 次, 连续 7 d。造模前 12 h 内禁食不禁水, 最后一次给药 40 min 后, 在小鼠左耳廓正、反两面涂抹二甲苯 20 μ L, 使其致炎, 右耳作为空白对照。并用打孔器分别在两耳的同一部位取下耳片 (直径 5.5 mm), 称定质量, 计算小鼠耳肿胀度和肿胀率。

肿胀度 = 左耳质量 - 右耳质量

肿胀率 = (左耳质量 - 右耳质量) / 左耳质量

结果见表 2。阳性对照 (泼尼松) 组小鼠耳肿胀度/率显著低于模型; 高剂量组抑苦掩味前后的 HJD 均能显著抑制二甲苯所致小鼠耳肿胀率, 且与阳性组无显著性差异; 高剂量组抑制耳肿胀率的效果明显优于低剂量组。最重要的是, 抑苦掩味前后的 HJD 疗效无显著差异, 表明伴侣剂对 HJD 抑制二甲苯致耳肿胀的效果无显著性影响。

2.4 伴侣剂对 HJD 抗 LPS 致小鼠高热的影响

2.4.1 LPS 注射液的制备 临用前以氯化钠注射液将脂多糖配成 20.0 mg/L 溶液。

2.4.2 造模与给药 每日测量小鼠肛温 2 次, 连续

表 2 伴侣剂对 HJD 抑制二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of companion on inhibition of xylene-induced ear edema of HJD in mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	肿胀率/%
模型	-	2.8±0.7	45.2±12.4
泼尼松	0.009 1	1.5±0.6	19.9±9.5**
HJD	4.505	2.4±0.5	23.1±12.7**
	2.252	2.3±0.3	27.4±9.1*
	1.126	3.2±0.5	44.2±11.7 $\Delta\Delta$ ***
HJD+伴侣剂	4.505	2.3±0.4	28.0±9.7*
	2.252	2.3±0.5	40.0±12.1 $\Delta\Delta$
	1.126	2.6±0.4	40.6±10.7 $\Delta\Delta$ *

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与泼尼松组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 HJD 中剂量组比较: # $P < 0.05$

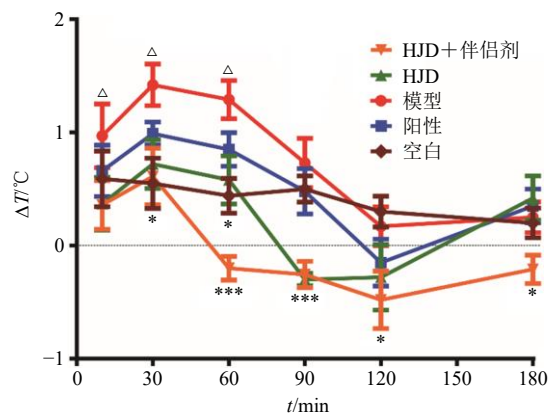
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs prednisone group; # $P < 0.05$ vs medium dose of HJD

3 d。实验前连续测定 3 次肛温, 每次间隔 60 min, 取平均值为基础体温 (T_0)。剔除单次体温超过 38 °C 或 2 次温差超过 0.5 °C 的小鼠。将符合要求的小鼠随机分为 5 组, 即对照组、模型组、阳性药物组、HJD 组和 HJD+伴侣剂组。对照组和模型组 ig 给予蒸馏水, HJD 组和 HJD+伴侣剂组分别 ig 给予 4.5 g/kg HJD 和 HJD+伴侣剂。给药 1 h 后对照组 ip 氯化钠注射液, 其他各组 ip LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 造模致热。造模 10 min 后开始测体温 (T_i), 并分别于 30、60、90、120、180 min 时间点监测体温。计算 $\Delta T (\Delta T = T_i - T_0)$, 绘制体温变化 ΔT -时间 (t) 曲线。实验结束后断颈处死小鼠。

2.4.3 伴侣剂对 HJD 抗 LPS 致小鼠高热的影响
 伴侣剂对 HJD 抗 LPS 致小鼠发热的影响结果见图 1。与对照组相比, 模型组小鼠的肛温在造模 10~60 min 后显著升高 ($P < 0.05$); 此后温度显著下降 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 各给药组均表现出不同程度的解热作用。造模 30 min 后, HJD 组和 HJD+伴侣剂组小鼠体温均有显著性差异 ($P < 0.05$), 各给药组间差异性不显著; 造模 60~90 min 后, HJD 组和 HJD+伴侣剂组小鼠肛温显著低于模型组, 且 HJD+伴侣剂组的解热效果略优于 HJD 组, 但差异不显著。并且, 模型组小鼠肛温在造模 60 min 后下降显著, 120 min 后趋于稳定; 给药组则在造模 120 min 后呈上升趋势, 且 HJD 组和阳性组温度趋同于模型组, 可能与小鼠机体的自愈功能有关。

2.5 伴侣剂对 HJD 急性毒性的影响研究

昆明小鼠, 适应性饲养 7 d 后, 随机分为 HJD



与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$
 $\Delta P < 0.05$ vs blank group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 1 伴侣剂对 HJD 抗 LPS 致小鼠发热的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of companion agent on anti-endotoxin-induced fever in mice of HJD ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

高剂量组 (37.5 g/kg)、HJD 低剂量组 (25 g/kg) [15]、HJD+伴侣剂高剂量组、HJD+伴侣剂低剂量组和对照组 (蒸馏水) 并 ig 基于相应药物。给药前 12 h 禁食不禁水, 观察 7 d, 记录受试动物的中毒症状、行为和死亡情况, 计算死亡率; 第 7 天傍晚禁食不禁水, 次日早上行眼眶取血, 分离血清, 测定血糖、尿素氮、肌酐和白蛋白指标, 评估 HJD 和抑苦掩味伴侣剂对小鼠胰腺、肾脏和肝脏功能的影响。

试验期间, 每天观察小鼠行为活动 3 次, 各实验组小鼠均无死亡, 活动正常, 行为活跃, 无躁动、过度兴奋、精神萎靡和步态异常或者腺体分泌异常等情况, 毛发整洁有光泽、无毛发脱落现象, 粪便的颜色、形状和硬度均正常。据健康小鼠血液生化指标 [16] 判定急性毒性试验中的小鼠器官损害情况, 结果见表 3。各组的白蛋白、尿酸氮、肌酐、血糖均在正常值范围内: 白蛋白 (28.70±3.00) g/L、尿酸氮 (3.46±0.98) mmol/L、肌酐 (74.27±16.80) $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、血糖 (5.12±0.06) mmol/L, HJD 和抑苦掩味伴侣剂对小鼠的胰腺、肾脏和肝脏等器官功能无明显损害。

2.6 16S rDNA 测序分析伴侣剂和 HJD 对小鼠肠道菌群的影响

2.6.1 标本收集 清洁级昆明小鼠, 随机分为对照组、双抗组 (链霉素 1 g/kg+青霉素 1 g/kg), HJD 组 (4.5 g/kg) 与 HJD+伴侣剂组 (4.5 g/kg)。ig 给药, 每天 1 次, 连续 14 d。无菌条件下取小鼠粪便, -80 °C 保存, 干冰送样, 进行 16S rDNA Amplicon 测序。

表 3 伴侣剂对 HJD 急性毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of companion on acute toxicity of HJD ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	白蛋白/(g·L ⁻¹)	尿素氮/(mmol·L ⁻¹)	肌酐/(μmol·L ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	28.44±3.06	3.70±0.91	83.41±12.27	5.21±0.56
HJD	37.5	29.44±2.74	3.68±0.75	74.39±9.01	5.13±0.05
	25.0	29.99±0.81	3.53±0.69	87.74±10.28	5.13±0.17
HJD+伴侣剂	37.5	28.28±2.11	3.82±0.23	89.70±5.72	5.36±0.28
	25.0	30.00±2.66	3.97±0.41	72.71±8.35	5.34±0.19

2.6.2 测序 样品经抽提基因组的 DNA 并质检, 设计、合成 16S rDNA 扩增的 V3-V4 通用引物区的特异性引物 [341 F: forward primer (5'-3'): CCTA CGGGRSGCAGCAG 和 806 R: reverse primer (5'-3'): GGACTACVVGTTATCTAATC], 扩增 PCR、纯化产物并进行文库质检, 对质检合格文库进行 Qubit 定量, 最后使用 Illumina Miseq PE250 进行测序。测序结果按照以下流程进行生物信息分析。对原始数据执行质量控制 (quality control, QC) 后, 采用 Usearch v11 软件对合格的数据进行去嵌合体 and 聚类分析。得到物种丰度表, 以进行后续组间和组内物种多样性、物种线性判别 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 分析。

2.6.3 伴侣剂和 HJD 对小鼠肠道菌群多样性的影响 α 多样性分析辛普森指数, 结果表明, 与对照组、HJD 组、HJD+伴侣剂组相比, 双抗组有所升高, 但无显著性差异 (图 2-A)。香农指数结果表明, 与对照组、HJD 组和 HJD+伴侣剂组相比, 双抗组指数显著下降 ($P < 0.001$, 图 2-B)。同时, Anosim 相似性分析结果表明, 组间差异显著大于组内差异 (图 2-C), 即双抗显著降低了小鼠的肠道菌群多样性, 而 HJD 对菌群多样性的影响不显著, 抑苦掩味后菌群多样性与 HJD 组、对照组差异亦不显著。

2.6.4 伴侣剂和 HJD 对小鼠肠道菌群丰度的影响 在门水平上, 各样本中丰度最高菌为拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) (表 4)。且厚壁菌门/拟杆菌门比值 (F to B ratio) 和变形菌门/拟杆菌门比值 (P to B ratio) 无显著性差异。

在属水平检测对照组与双抗组、HJD 组, 对照组与 HJD 组、HJD+伴侣剂组的菌群结构。与双抗组相比, 对照组和 HJD 组埃希菌 (*Escherichia/Shigella*) 的相对丰度显著降低 ($P < 0.001$), 另枝菌属 (*Alistipes*)、梭菌 XIVa (*Clostridium XIVa*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、厌氧芽孢杆菌 (*Clostridium*

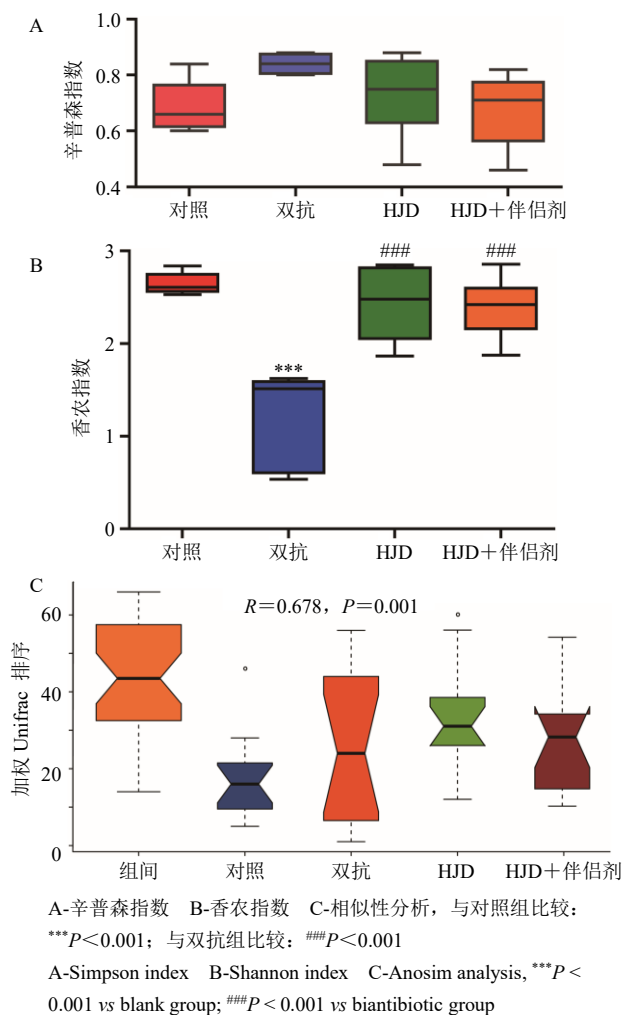


图 2 伴侣剂和 HJD 对小鼠肠道菌群多样性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of companion and HJD on intestinal flora diversity in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

sensu stricto) 相对丰度显著升高 ($P < 0.05$); 与 HJD 组相比, HJD+伴侣剂组的 *Bacteroides* 显著降低 ($P < 0.05$), 其他菌属变化不显著。

应用 LEfSe 分析软件判别伴侣剂对 HJD 多级物种差异的影响, 结果表明, 抑苦掩味伴侣剂对 HJD 给药干预 1 周的小鼠肠道菌群影响不显著。从门水平到属水平, 在 LEfSe 层级树中标注共同差异基因

表 4 伴侣剂和 HJD 对小鼠肠道菌群丰度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of companion and HJD on intestinal flora abundance in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	门水平主要菌组成变化/%				
		拟杆菌门	变形菌门	厚壁菌门	厚壁菌门/拟杆菌门比值	变形菌门/拟杆菌门比值
对照	-	56.07±1.78	2.62±2.02	39.13±2.29	0.75±0.18	0.05±0.01
HJD	4.5	67.80±1.50	2.89±1.15	29.28±3.85	0.47±0.11	0.04±0.02
HJD+伴侣剂	4.5	59.23±2.70	1.81±0.82	38.68±4.33	0.84±0.24	0.03±0.01
双抗	1+1	39.42±5.40	53.63±4.01	6.94±3.04	0.45±0.42	4.38±6.46

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	属水平主要差异菌群相对丰度统计/%						
		<i>Escherichia/Shigella</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Alistipes</i>	<i>Clostridium XIVa</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Clostridium sensu stricto</i>	<i>Oscillibacter</i>
对照	-	0.03±0.01	6.27±0.77	4.77±0.79	1.51±0.42	1.48±0.33	0.00±0.00	1.09±0.23
HJD	4.5	1.29±0.42	22.57±6.53*	1.20±0.45*	1.47±0.73	1.41±0.58	0.04±0.03	0.78±0.45
HJD+伴侣剂	4.5	0.41±0.11	5.50±1.48#	0.00±0.00*	3.04±0.85	1.59±0.78	0.00±0.00	0.87±0.24
双抗	1+1	55.23±7.32***###△△△	16.27±4.77	1.26±0.56*	0.01±0.00***###△△	0.00±0.00*#	0.00±0.00	0.00±0.00**#

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001; 与 HJD 组比较: #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001; 与 HJD+伴侣剂组比较: △△P<0.01 △△△P<0.001
*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs blank group; #P<0.05 ##P<0.01 ###P<0.001 vs HJD group; △△P<0.01 △△△P<0.001 vs HJD + taste-suppressing companion group

(图 3), 抑苦掩味伴侣剂组目水平优势菌种为脱硫弧菌 (*Desulfovibrionales*)。

3 讨论

抑苦掩味伴侣剂能有效改善^[13]中药汤剂如 HJD 的口感, 其应用有利于提高中医临床患者服药顺应性。然而, 作为辅料, 在抑苦掩味的同时, 必须以不影响药物疗效、安全性和主要有效成分的含量测定为前提。本课题组前期研究表明, 抑苦掩味伴侣剂不影响 HJD 的指纹图谱和主要有效成分的

含量测定。本研究表明, 伴侣剂未显著影响 HJD 体外抗氧化、抗耳肿胀、解热、急性毒性和对肠道菌群的作用。LPS、干酵母和 2,4-二硝基酚 (DNP) 等是发热模型常用致热原^[17]。其中, LPS 致热模型为最经典的炎性发热模型。研究发现, HJD 对 LPS 致小鼠高热模型具有良好的解热作用。在 ip 内毒素 60 min 后, 模型组小鼠肛温逐渐下降, 甚至低于基础体温, 这可能是机体自我保护作用的结果。

肠道菌群的物种多样性和丰富度是反映肠道菌

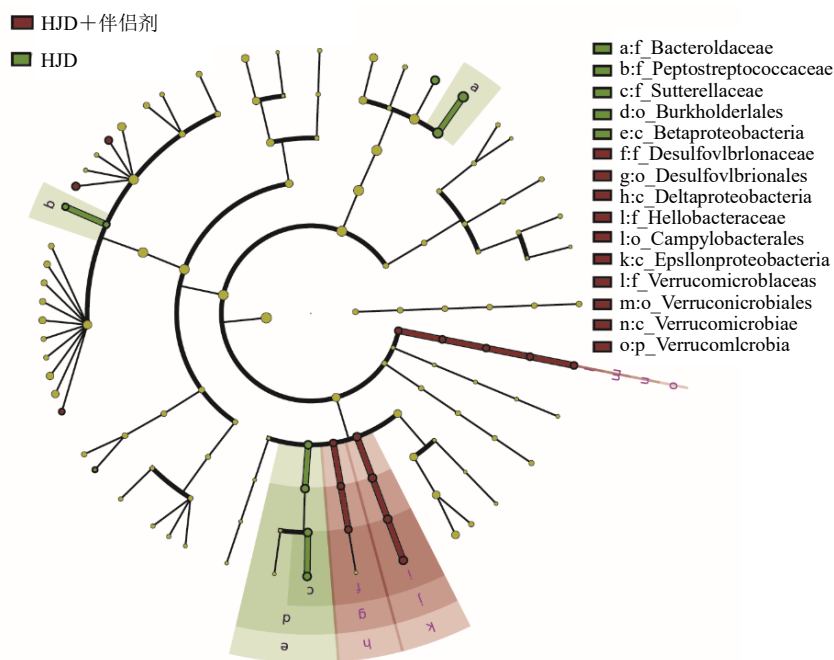


图 3 LEfSe 多级物种层级树图

Fig. 3 LEfSe multilevel species hierarchy tree

群组成的重要指标^[18]。本研究发现,青霉素与链霉素合用(双抗)显著降低了小鼠肠道菌群的种类和丰度,而HJD及其抑苦掩味伴侣剂对其影响不显著。小鼠肠道菌群90%由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门组成,厚壁菌门/拟杆菌门比值和变形菌门/拟杆菌门比值可有效反应肠道菌群的紊乱情况^[19]。本研究表明,双抗、HJD及其伴侣剂对厚壁菌门/拟杆菌门比值和变形菌门/拟杆菌门比值影响不显著。

拟杆菌属 *Bacteroides* 是肠道菌群的主要组成,参与机体多糖、胆汁酸和类固醇代谢、碳水化合物发酵以及维持肠道正常生理等多种功能^[20],为宿主提供能源^[21]。与HJD组样品相比,伴侣剂显著降低了小鼠肠道中拟杆菌的丰度 ($P < 0.05$)。脱硫弧菌 (*Desulfovibrionales*) 是一种硫酸盐还原厌氧菌,广泛存在于各种环境中,很少引起人类感染^[22]。与HJD组样品相比,它是伴侣剂组中的优势菌属。综上,抑苦掩味伴侣剂不影响HJD的药效(抗炎、抗氧化和解热)、毒性和对肠道菌群的作用,安全有效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵军宁,张翼冠,尹竹君,等.治疗新冠病毒肺炎(COVID-19)中药“药理谱-云”特点与有效性评价要素[J].*中药药理与临床*,2020,36(1):2-12.
- [2] 郭欣,孙蓉.黄连解毒汤治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)重型气营两燔证的中医方证关系及药理研究进展[J].*中草药*,2020,11(51):3070-3077.
- [3] Chen G R, Zhang G, Li M Y, et al. The effective components of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis evaluated by a lipid A-based affinity biosensor [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 369-376.
- [4] Chen Q Q, Wang F X, Cai Y Y, et al. Untargeted metabolomics and lipidomics uncovering the cardioprotective effects of Huanglian Jiedu Decoction on pathological cardiac hypertrophy and remodeling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113646.
- [5] Li X, Tang H, Tang Q, et al. Decoding the mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in treating pneumonia based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 638366.
- [6] 王宸罡,齐新,王丽,等.简述黄连解毒汤的药理作用及临床应用[J].*天津中医药大学学报*,2018,37(5):433-436.
- [7] Lu Z, Xiong W N, Xiao S M, et al. Huanglian Jiedu Decoction ameliorates DSS-induced colitis in mice via the JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 45.
- [8] 刘君财.黄连解毒汤抑制内毒素诱导的家兔发热机制研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2009.
- [9] 张保国,程铁峰,刘庆芳.黄连解毒汤现代临床新用[J].*中成药*,2010,32(2):283-287.
- [10] 高龙艳.黄连解毒汤治疗小儿高热的临床疗效观察[J].*世界最新医学信息文摘*,2017,17(90):101.
- [11] Liu H, Chen X Y, Liu Y L, et al. Antithrombotic effects of Huanglian Jiedu Decoction in a rat model of ischaemia-reperfusion-induced cerebral stroke [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 823-827.
- [12] Liang J H, Huang Y J, Mai Z X, et al. Integrating network pharmacology and experimental validation to decipher the mechanism of action of Huanglian Jiedu Decoction in treating atherosclerosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 1779-1795.
- [13] Li P, Tian Y, Ke X M, et al. Amphiphilic block copolymers: A novel substance for bitter-masking in aqueous solutions [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(5): 1586-1595.
- [14] 柯秀梅,张立胜,张定堃,等.基于“霰弹理论”的中药汤剂伴侣的研发策略与实践:以黄连解毒汤为例[J].*中草药*,2021,52(15):4443-4454.
- [15] 魏婷.黄连解毒汤提取精制工艺及安全性评价[D].重庆:西南大学,2011.
- [16] 胡建武,卢胜明,车路平,等.10种常见SPF级实验大、小鼠血液学及生化指标正常参考值的探讨[J].*实验动物科学*,2007,24(2):5-10.
- [17] 刘羽,张月娟,余毅,等.防风解热合剂解热镇痛抗炎药理作用的实验研究[J].*中国中医急症*,2019,28(9):1576-1579.
- [18] 许杰,王伊龙,王拥军.肠道菌群与高血压[J].*中国卒中杂志*,2017,12(2):175-178.
- [19] Eckburg P B, Bik E M, Bernstein C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.
- [20] 刘柄岢,陈毅光,李雯翀,等.2型糖尿病患者肠道菌群的变化及其与代谢指标的关系[J].*实用医学杂志*,2019,35(20):3208-3213.
- [21] Wexler H M. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(4): 593-621.
- [22] A H H, B K K, B I N, et al. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia: A case report and literature review-Science Direct [J]. *Anaerobe*, 2018, 49: 112-115.

[责任编辑 郑礼胜]