

## 基于自组装体系研究双黄连主要成分与环丙沙星的分子互作

李江玲<sup>1</sup>, 刘爽<sup>2,3</sup>, 谢以清<sup>4</sup>, 龙江兰<sup>2,3</sup>, 王真真<sup>2,3</sup>, 王爱婷<sup>2,3\*</sup>,  
马强<sup>4\*</sup>, 鄢丹<sup>2,3\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050;  
3. 北京市临床药学研究所, 北京 100050; 4. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

**摘要:** 双黄连注射液(双黄连)与环丙沙星注射液(环丙沙星)在临床联合用药的情况时有发生,但联合用药合理性评价手段薄弱。本研究采用等温滴定量热技术和紫外光谱初步发现双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星均存在分子互作;采用扫描电镜、红外光谱、冷喷雾电离质谱技术证实这种分子互作与绿原酸、新绿原酸能和环丙沙星通过分子间弱键诱导形成自组装超分子体系有关;进一步利用铜绿假单胞菌评价其药物分子互作生物效应(抑菌活性),发现双黄连、绿原酸、新绿原酸与环丙沙星互作后对铜绿假单胞菌的抑菌能力均显著降低;通过分子对接研究发现,其抑菌能力降低与药物分子在铜绿假单胞菌DNA旋转酶B亚单位(DNA gyrase B, GyrB)有相同结合位点而产生竞争性结合密切相关。本研究从分子自组装角度,揭示了双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星存在分子间互作且会导致抑菌能力降低,为双黄连与环丙沙星临床联合用药合理性评价提供了参考依据。

**关键词:** 双黄连注射液; 环丙沙星注射液; 自组装体系; 分子互作; 抑菌能力

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)08-2445-08

## Molecular interactions between the main components of Shuanghuanglian injection and ciprofloxacin injection based on self-assembly

LI Jiang-ling<sup>1</sup>, LIU Shuang<sup>2,3</sup>, XIE Yi-qing<sup>4</sup>, LONG Jiang-lan<sup>2,3</sup>, WANG Zhen-zhen<sup>2,3</sup>,  
WANG Ai-ting<sup>2,3\*</sup>, MA Qiang<sup>4\*</sup>, YAN Dan<sup>2,3\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing 100050, China; 4. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

**Abstract:** The combination of Shuanghuanglian injection (SHLI) and ciprofloxacin injection (CIPI) is frequently prescribed in clinical practice, but the basis for the combination is weak. In this study, isothermal titration calorimetry and ultraviolet-visible absorption spectrometry were applied to identify the molecular interactions of SHLI and its main components, chlorogenic acid and neochlorogenic acid with CIPI. Scanning electron microscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy, and cold-spray ionization mass spectrometry were performed to confirm that this molecular interaction was related to the formation of self-assembled supramolecular systems induced by chlorogenic acid and neochlorogenic acid with CIPI through weak intermolecular bonds. The antibacterial activity toward

收稿日期: 2022-06-06; 修回日期: 2022-06-22.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(82130112); 北京市医院管理中心“登峰”计划专项(DFL20190702).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63139318, E-mail: wat09ing@163.com;

Tel: 86-10-53897463, E-mail: maqiang@caiq.org.cn;

Tel: 86-10-63139318, E-mail: danyan@cemu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0696

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) was evaluated via molecular interactions, and the inhibitory ability of SHLI, chlorogenic acid and neochlorogenic acid against *P. aeruginosa* was significantly reduced after interaction with CIPI. A molecular docking study demonstrated that the reduced antibacterial ability was closely related to the competitive binding of drug molecules to the same binding site of the DNA gyrase B (GyrB) subunit of *P. aeruginosa*. The present study uncovered the intermolecular interactions of SHLI and its main components chlorogenic acid and neochlorogenic acid with CIPI from the perspective of molecular self-assembly and contribute to the reduction of its antibacterial ability, providing a basis for the clinical combination of SHLI and CIPI.

**Key words:** Shuanghuanglian injection; ciprofloxacin injection; self-assembly; molecular interaction; antibacterial effect

药物相互作用 (drug-drug interaction, DDI) 在临床真实世界普遍存在, 已受到国家药品监督管理局和业界广泛关注<sup>[1,2]</sup>。双黄连注射液 (双黄连) 由金银花、黄芩、连翘组成, 具有清热解毒、清宣风热的功效, 临床上常用于治疗呼吸道感染性疾病<sup>[3]</sup>。其主要成分绿原酸是《中国药典》收录的双黄连制剂质量标准的质控成分<sup>[4]</sup>。环丙沙星注射液 (环丙沙星) 是喹诺酮类抗菌药物, 具有广谱的抗菌作用而广泛应用于临床<sup>[5]</sup>。在临床真实世界中, 双黄连与环丙沙星联合用药治疗感染的情况时有发生<sup>[6]</sup>, 但二者联合用药的 DDI 评价研究薄弱<sup>[7]</sup>。

自组装是将系统从无序的单元组合成有序、高度排列结构的过程, 通过非共价相互作用, 它赋予了结构体独特的性质<sup>[8]</sup>。近年来, 超分子自组装技术取得了长足的进步<sup>[9]</sup>, 已引起越来越多的学者关注。研究表明, 弱键诱导形成的自组装超分子体系是中药配伍的物质基础<sup>[10,11]</sup>。因此, 本研究猜想联合用药分子互作引发的 DDI 可能与超分子自组装体系有关。具体地, 从超分子自组装和生物活性角度出发, 采用等温滴定量热技术和紫外光谱提示双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星的分子互作, 采用扫描电镜、红外光谱和冷喷雾电离质谱技术对药物分子互作形成的超分子体系进行确证, 进一步通过铜绿假单胞菌模型评估其药物分子互作的生物效应, 以期为临床联合用药 (分子互作) 合理性评价研究提供参考。

## 材料与方法

**药品与试剂** 双黄连 (批号: 2001013, 1 mL 相当于 1 g 生药), 河南福森药业有限公司; 环丙沙星 (批号: 3141481), 广州南新制药有限公司; 0.9% 氯化钠注射液 (0.9% NaCl, 批号: 200927), 佛山双鹤药业有限责任公司; 绿原酸 (批号: MUST-21070910) 和新绿原酸 (批号: MUST-21030108), 成都曼思特生物科技有限公司, 纯度大于 98%; 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, BNCC337005), 商城北纳创联生物科技有限公司; MH

肉汤 II (阳离子调节, 批号: LA6740) 和二甲基亚砜 (DMSO, 批号: D8370), 北京索莱宝科技有限公司。

**仪器** NANO ITC LV 等温滴定量热仪 (美国 TA 公司); SYNERGY H1 多功能微孔板检测仪 (美国 BioTek Instruments 公司); SU8020 场发射扫描电子显微镜 (日本日立公司); Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪和 Q-Exactive 高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LRH-250 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

**等温滴定量热 (isothermal titration calorimetry, ITC) 检测** 量取双黄连、环丙沙星适量, 参照临床给药剂量分别以超纯水稀释至所需浓度<sup>[12]</sup>, 绿原酸、新绿原酸均以 5% DMSO 溶解并稀释, 即得供试品溶液。以双黄连、绿原酸、新绿原酸溶液分别滴定环丙沙星溶液, 温度为 25 °C, 搅拌速率为 300 r·min<sup>-1</sup>, 连续滴定 25 滴。滴定结束后, 在数据采集软件 Nano Analyze 中输入实验样品浓度, 即可得溶液混合时的热力学参数吉布斯自由能  $\Delta G$ 、焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$ 。

**紫外光谱检测** 将双黄连、环丙沙星稀释液等比例混合, 绿原酸、新绿原酸溶液分别与环丙沙星稀释液等比例混合, 即得混合溶液。设置酶标仪的检测波长为 240~500 nm, 以 0.9% NaCl、1% DMSO 作为空白溶剂, 进行全波长扫描。

**场发射扫描电子显微镜观察** 取绿原酸、新绿原酸、环丙沙星及绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星混合溶液适量滴于硅片上, 室温自然干燥, 喷金处理后置于场发射扫描电子显微镜下, 工作电压 5.0 kV, 拍照并观察绿原酸、新绿原酸与环丙沙星反应后的微观形貌。

**红外光谱检测** 取绿原酸、新绿原酸、环丙沙星溶液及绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星混合溶液适量, 冻干, 备用。称取绿原酸、新绿原酸、环丙沙星及绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星结合体粉末适量, 与无水溴化钾粉末研磨均匀, 并压制成片状。傅里叶变换红外光谱仪的波数范围为 4 000~1 000 cm<sup>-1</sup>, 光

谱分辨率为  $4\text{ cm}^{-1}$ , 空气为背景。光谱软件 (OMNIC 8.2) 记录和存储红外光谱。采用 AutoDock Vina 1.1.2 进行绿原酸、新绿原酸与环丙沙星的平面分子对接, 佐证红外光谱的结果。

**冷喷雾电离质谱 (cold-spray ionization mass spectrometry, CSI-MS) 检测** 精密称取绿原酸和新绿原酸适量, 分别以甲醇溶解并稀释后与环丙沙星以 1:5 浓度混合均匀, 即得混合溶液。电喷雾离子源为正离子模式; 辅助气加热器温度  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 辅助气流速  $0.667\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 将通过冷凝装置的氮气接入质谱代替原鞘气; 喷雾电压  $3.7\text{ kV}$ ; 透镜电压  $55\text{ V}$ ; 毛细管电压  $50\text{ V}$ ; 进样方式为针泵进样; 进样量为  $200\text{ }\mu\text{L}$ 。

**最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 测定** 采用微量肉汤稀释法测定双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸及环丙沙星对 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 的抑菌活性。倍比稀释配制双黄连、绿原酸、新绿原酸和环丙沙星溶液。96 孔板每孔分别加入  $200\text{ }\mu\text{L}$  药物溶液和  $20\text{ }\mu\text{L}$  菌悬液 ( $1\times 10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 16 h。采用酶标仪于  $600\text{ nm}$  处测定其吸收度  $A$ 。实验重复 3 次。按照公式抑制率 (%) =  $[1 - (A_{\text{样品}} - A_{\text{溶剂}}) / (A_{\text{空白菌}} - A_{\text{溶剂}})] \times 100\%$  计算 MIC, MIC 为抑制率  $> 80\%$  的最低浓度<sup>[13]</sup>。

**体外联合抑菌实验** 采用棋盘稀释法测定双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星联用对 *P. aeruginosa* 的抑菌效应。将双黄连、绿原酸、新绿原酸、环丙沙星分别配备成 2~1/4MIC 浓度待用。按照棋盘法设计, 分别将双黄连、绿原酸、新绿原酸与环丙沙星组合加入 96 孔板中, 每种溶液各  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 每孔再加入  $20\text{ }\mu\text{L}$  菌悬液 ( $1\times 10^5\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。将上述 96 孔板

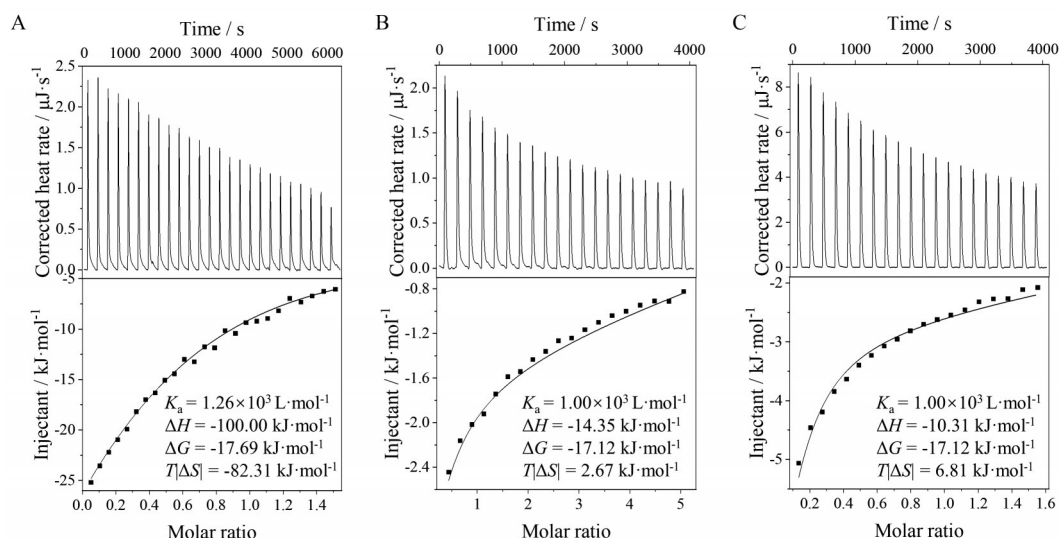
置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h, 读取结果并记录联合用药时的 MIC。每种组合重复 3 次。采用部分抑菌浓度指数 (fractional inhibitory concentration index, FICI) 判定联合抑菌效果。  $\text{FIC} = \text{MIC}_{\text{甲药联用}} / \text{MIC}_{\text{甲药单用}} + \text{MIC}_{\text{乙药联用}} / \text{MIC}_{\text{乙药单用}}$ 。评价标准:  $\text{FICI} \leq 0.5$  为协同作用;  $0.5 < \text{FICI} \leq 1$  为相加作用;  $1 < \text{FICI} \leq 2$  为无关作用;  $\text{FICI} > 2$  为拮抗作用。

**分子对接** PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 DNA 旋转酶 B 亚单位 (DNA gyrase B, GyrB) 晶体 PDB (PDB ID: 1KZN) 文件, PubChem 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 下载绿原酸、新绿原酸和环丙沙星 SDF 文件。AutoDock Tools 1.5.6 优化蛋白和小分子结构, 利用软件 AutoDock Vina 1.1.2 进行分子对接。

## 结果

### 1 双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星分子互作的热力学特征

应用 ITC 技术表征双黄连及其主要成分与环丙沙星的分子互作。双黄连及主要成分绿原酸、新绿原酸滴定环丙沙星的相容性与反应活性谱如图 1 所示。从反应活性图谱可见, 双黄连及主要成分绿原酸、新绿原酸滴定环丙沙星均为放热过程, 且放热明显。由图中热力学参数可见, 双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星的反应均为自发反应 ( $\Delta G < 0$ ), 且滴定过程中  $|\Delta H| > T|\Delta S|$ 。因此, 推断两种溶液混合以焓驱动反应为主, 即发生了化学反应<sup>[14]</sup>。结果提示, 双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星均存在分子互作。



**Figure 1** Energy maps and fitted curves of isothermal titration calorimetry (ITC). A: Ciprofloxacin injection (CIPI) titrated with Shuanghuanglian injection (SHLI); B: CIPI titrated with chlorogenic acid; C: CIPI titrated with neochlorogenic acid

## 2 双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星分子互作的紫外光谱特征

双黄连与环丙沙星混合前后的紫外吸收光谱见图2A。双黄连的特征吸收峰出现在276、316 nm处,环丙沙星的特征吸收峰出现在276 nm处,其混合体系兼具二者的特征峰,且混合体系中双黄连、环丙沙星的吸光度明显升高。绿原酸、新绿原酸与环丙沙星混合前后的紫外吸收光谱见图2B。绿原酸、新绿原酸的特征吸收峰出现在324 nm处,环丙沙星的特征吸收峰出现在276 nm处。绿原酸、新绿原酸分别与环丙沙星混合后,均出现吸光度明显升高,部分最大吸收波长增加(如图2B箭头所示)。由此推测,双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星可能存在因分子互作引发的电子云重排<sup>[10]</sup>。

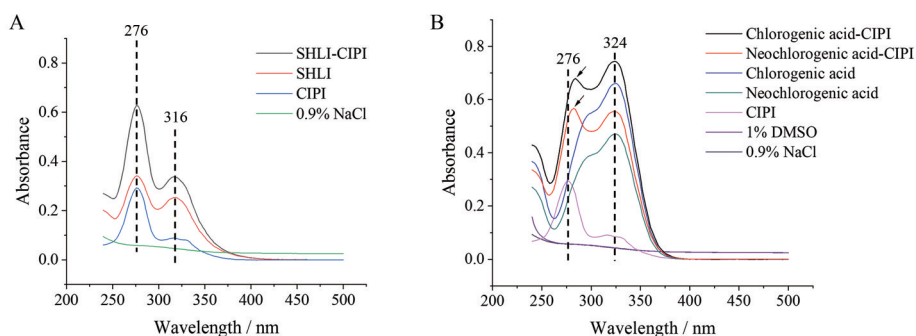
## 3 绿原酸、新绿原酸与环丙沙星分子互作的微观形貌观察

采用场发射扫描电子显微镜表征绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星结合体的微观形貌。结果显示,绿原酸(图3A)、新绿原酸(图3B)呈不规则的条状结构;环丙沙星(图3C)呈现网状结构。绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星结合体的微观形态与单体结

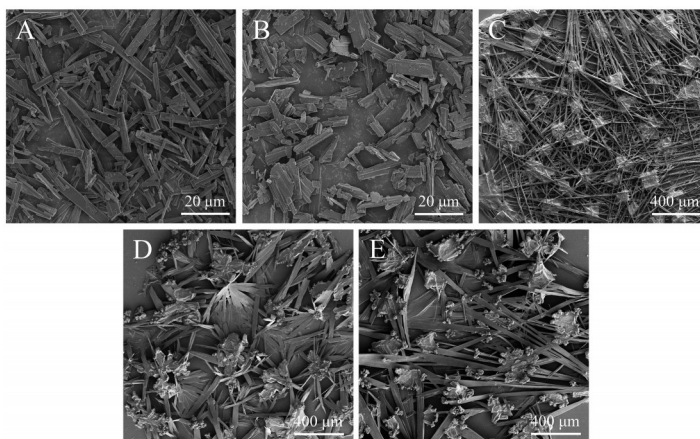
构区别较大。绿原酸-环丙沙星(图3D)、新绿原酸-环丙沙星结合体(图3E)中绿原酸、新绿原酸分别与环丙沙星簇和,呈现均一、有序排布的聚集状结构,提示绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星结合体在分子互作下组装形成了超分子。

## 4 绿原酸、新绿原酸与环丙沙星分子互作的红外光谱特征

绿原酸、新绿原酸与环丙沙星单用及结合体的红外光谱如图4所示。绿原酸红外图谱在 $3\ 350\text{ cm}^{-1}$ 处的宽吸收峰,为苯酚中O-H的振动强吸收峰; $1\ 686\text{ cm}^{-1}$ 为羧酸中C=O的伸缩振动强吸收峰; $1\ 289\text{ cm}^{-1}$ 为羧酸中C-O的伸缩振动强吸收峰(图4A)。新绿原酸红外图谱在 $3\ 335\text{ cm}^{-1}$ 处有一个宽吸收峰,为醇中O-H的振动强吸收峰; $1\ 686\text{ cm}^{-1}$ 归属于羧酸中C=O的伸缩振动强吸收峰; $1\ 292\text{ cm}^{-1}$ 归属于羧酸中C-O的伸缩振动强吸收峰(图4B)。环丙沙星红外图谱在 $3\ 401/3\ 389\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰,为羧酸中O-H的伸缩振动强吸收峰; $1\ 641\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰,为羧酸中C=O的伸缩振动强吸收峰(图4A、4B)。与绿原酸单用的红外图谱相比,绿原酸与环丙沙星结合体中,苯酚中的O-H吸收峰大幅度向高波数偏移;与新绿原酸单用的红外图谱相比,新绿原酸与环丙



**Figure 2** Evolutions of ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectrometry. A: UV-Vis of SHLI, CIPI and SHLI-CIPI; B: UV-Vis of chlorogenic acid, neochlorogenic acid, CIPI, chlorogenic acid-CIPI and neochlorogenic acid-CIPI



**Figure 3** Characterization of scanning electron microscope (SEM) images. A: SEM image of chlorogenic acid; B: SEM image of neochlorogenic acid; C: SEM image of CIPI; D: SEM image of chlorogenic acid-CIPI; E: SEM image of neochlorogenic acid-CIPI

沙星结合体中,醇中的O-H吸收峰大幅度向高波数偏移,提示绿原酸、新绿原酸与环丙沙星结合后,分子间官能团(酚羟基、醇羟基等)发生互作,参与组装形成超分子结构。平面分子对接结果显示,绿原酸的酚羟基(图4C)、新绿原酸的醇羟基(图4D)与环丙沙星的羧基有结合的潜能。即红外光谱与分子对接的结果相佐证。

### 5 绿原酸、新绿原酸与环丙沙星的非共价互作

为了深入探讨双黄连主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星分子互作自组装形成的超分子,分别配制了绿原酸、新绿原酸与环丙沙星的混合体系进行CSI-MS研究。研究发现,在正离子模式下,绿原酸、新绿原酸的特征离子均为 $m/z$  355.12  $[M+H]^+$ ,环丙沙星的特征离子为 $m/z$  332.14  $[M+H]^+$ 。绿原酸、新绿原酸与环丙沙星自组装分别形成了绿原酸-环丙沙星( $m/z$  686.26  $[M+H]^+$ ) (图5A)、新绿原酸-环丙沙星加合物( $m/z$  686.26  $[M+H]^+$ ) (图5B)。进一步对比加合物的二级质谱信息,相应地得到了绿原酸( $m/z$  355.12  $[M+H]^+$ ) (图5C)、新绿原酸( $m/z$  355.12  $[M+H]^+$ ) (图5D)、环丙沙星( $m/z$  332.14  $[M+H]^+$ ) (图5C、5D)的特征峰。由此得出,绿原酸-环丙沙星、新绿原酸-环丙沙星加合物是通过分子间非共价互作形成,分子间非共价互作参与自组装形成超分子。

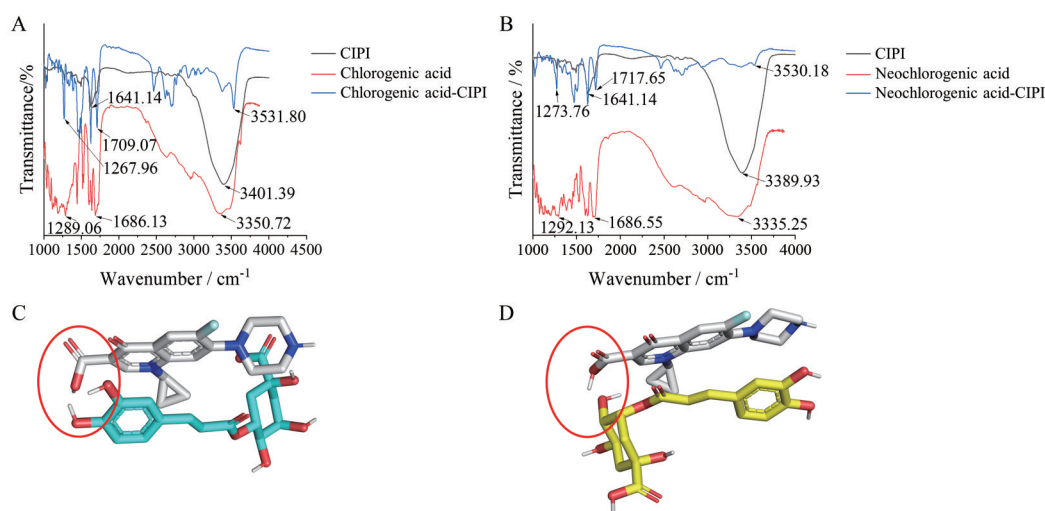
### 6 联合用药对 *P. aeruginosa* 抑菌活性探究

采用微量肉汤稀释法测定双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸及环丙沙星对 *P. aeruginosa* 的MIC值,发现上述药物在所选浓度下均表现出抑菌活性。双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸及环丙沙星的MIC值分别为 $250.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $8.22 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $8.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

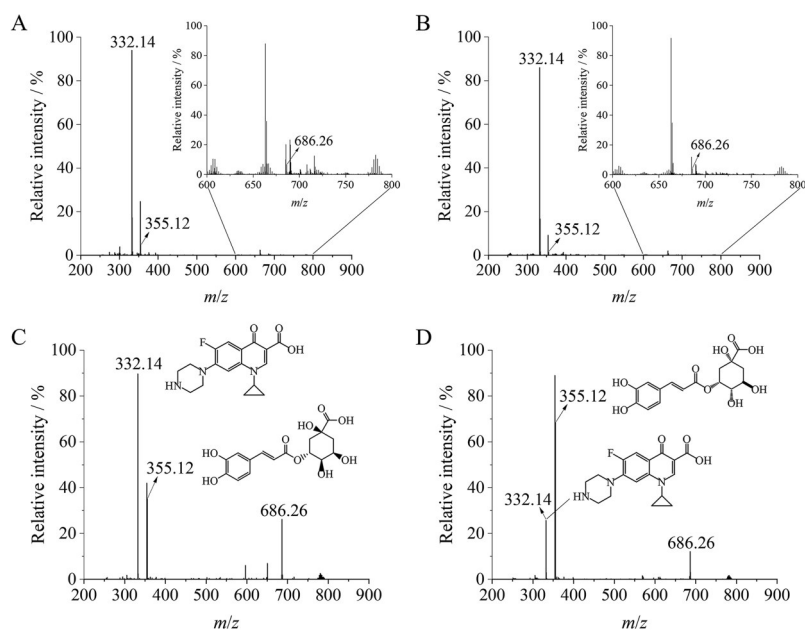
和 $61.04 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸分别与环丙沙星联用后对 *P. aeruginosa* 的MIC及FICI值如表1所示。与双黄连、绿原酸、新绿原酸单用相比,其与环丙沙星联用后的MIC值均升高了1个倍比稀释度;环丙沙星与双黄连联用后,其MIC值与环丙沙星单用相比升高了1个倍比稀释度;环丙沙星与绿原酸、新绿原酸联用后,其MIC值与环丙沙星单用相比降低了2个倍比稀释度。FICI的结果显示,双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星联用后均对 *P. aeruginosa* 产生拮抗效应,提示双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星结合体的抑菌活性减弱。

### 7 绿原酸、新绿原酸及环丙沙星与 GyrB 的分子对接分析

Gyr是II型DNA拓扑异构酶,催化DNA双链断裂和重新连接从而改变DNA的拓扑结构<sup>[15]</sup>。GyrB作为Gyr的B亚基,是抗菌药物研究的重要靶点<sup>[16]</sup>。通过分子对接探索双黄连主要成分绿原酸、新绿原酸及环丙沙星与GyrB的结合模式,揭示双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星联用后对 *P. aeruginosa* 抑菌活性减弱的原因。结果显示,绿原酸、新绿原酸及环丙沙星与GyrB的活性位点均具有结合活性。绿原酸、环丙沙星均与GyrB的GLY117、ILE90、ALA96形成稳定氢键;新绿原酸、环丙沙星均与GyrB的ALA96、ILE90形成稳定氢键(图6)。由此推测双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星联用对 *P. aeruginosa* 抑菌活性减弱,可能与其在GyrB上有相同结合位点而产生竞争性结合密切相关。



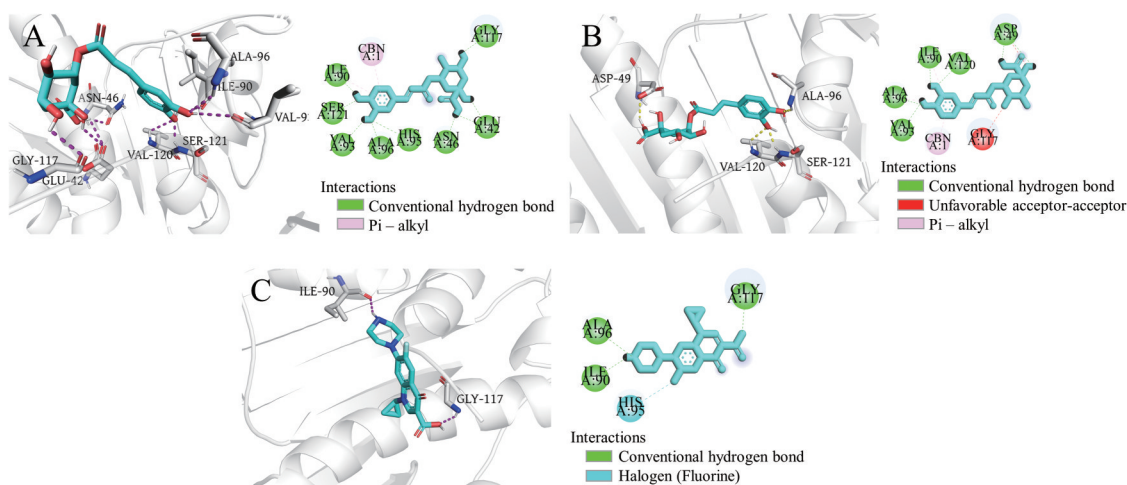
**Figure 4** Measurements of Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and molecular docking. A: FTIR of chlorogenic acid, CIPI and chlorogenic acid-CIPI; B: FTIR of neochlorogenic acid, CIPI and neochlorogenic acid-CIPI; C: molecular docking of chlorogenic acid with CIPI; D: molecular docking of neochlorogenic acid with CIPI



**Figure 5** Properties of cold-spray ionization mass spectrometry (CSI-MS). A: MS spectrum of chlorogenic acid mixed with CIPI to form a molecular complex ( $m/z$  686.26  $[M+H]^+$ ); B: MS spectrum of neochlorogenic acid mixed with CIPI to form a molecular complex ( $m/z$  686.26  $[M+H]^+$ ); C: MS/MS spectrum of the chlorogenic acid-ciprofloxacin complex; D: MS/MS spectrum of the neochlorogenic acid-ciprofloxacin complex

**Table 1** Antibacterial activity of SHLI and its main components chlorogenic acid and neochlorogenic acid in combination with CIPI against *P. aeruginosa*. MIC: Minimum inhibitory concentration; FICI: Fractional inhibitory concentration index

Sample	MIC	FICI	Effect
SHLI	250.00 mg·mL <sup>-1</sup>		
Chlorogenic acid	8.22 mg·mL <sup>-1</sup>		
Neochlorogenic acid	8.00 mg·mL <sup>-1</sup>		
CIPI	61.04 ng·mL <sup>-1</sup>		
SHLI/CIPI	>500.00 mg·mL <sup>-1</sup> / $>122.07$ ng·mL <sup>-1</sup>	>4.00	Antagonism
Chlorogenic acid/CIPI	16.43 mg·mL <sup>-1</sup> / $15.26$ ng·mL <sup>-1</sup>	2.25	Antagonism
Neochlorogenic acid/CIPI	16.00 mg·mL <sup>-1</sup> / $15.26$ ng·mL <sup>-1</sup>	2.25	Antagonism



**Figure 6** Binding model of chlorogenic acid, neochlorogenic acid and ciprofloxacin with the binding site of DNA gyrase B (GyrB, PDB code: 1KZN). A: The 3D and 2D binding conformation of chlorogenic acid interacts with the amino acid residues of GyrB; B: The 3D and 2D binding conformation of neochlorogenic acid interacts with the amino acid residues of GyrB; C: The 3D and 2D binding conformation of ciprofloxacin interacts with the amino acid residues of GyrB

## 讨论

中西药注射剂联合用药临床上通常慎用或禁用,但“一前一后”序贯给药并导致疗效降低的现象却时有发生<sup>[17]</sup>。本研究正是基于临床上存在双黄连与环丙沙星联合用药治疗感染的情况下而开展的。在发现双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星存在分子互作表型的基础上,以扫描电镜观察形貌,确认绿原酸、新绿原酸与环丙沙星通过分子互作自组装形成了超分子体系;采用红外光谱和冷喷雾电离质谱技术对超分子进行表征,发现官能团非共价相互作用参与超分子体系的组装;进一步,基于抑菌活性试验发现双黄连及其主要成分绿原酸、新绿原酸与环丙沙星联合用药后对 *P. aeruginosa* 的抑菌活性显著弱于单用。这一重要发现与文献<sup>[18,19]</sup>报道临床上不支持双黄连、清开灵等含绿原酸类成分的中药注射剂与环丙沙星联合用药的结论相吻合。由此提示,双黄连与环丙沙星在临床联合用药时,应考虑调整给药时间间隔,避免因“一前一后”序贯给药在体内发生分子互作而引起疗效降低。本研究建立的超分子互作表征-抑菌活性评价序贯分析策略,对分析临床多药联合用药合理性具有潜在应用价值。

除了上述分析临床多药联合用药合理性的技术手段之外,药物混合后 pH、渗透压、不溶性微粒、药代动力学、药效动力学、安全性指标等也是常用的表征技术。但这些技术在面对临床上纷繁复杂的多药联合用药合理性评价时,还需要考虑与临床相关性、检测通量、剂量比例、反应体系、评估指标(阈值)、共性特征提炼等问题。本研究尝试以双黄连与环丙沙星联合用药相互作用评价为例,探讨“源于临床-证于试验-归于临床”的研究路径<sup>[20]</sup>。即从临床真实世界切入,发现双黄连与环丙沙星存在“一前一后”用药并引发疗效降低的现象;通过超分子自组装表征技术和抑菌活性评价,建立了序贯分析方法;再回归临床并拓展相关文献报道进一步佐证研究策略与方法的可行性。随着可能面临更多的药物联合用药(包括不同给药途径、不同给药剂量和时间等)庞大的数据量,可广泛收集临床多中心的实际用药案例、疗效评价信息,结合国内外药物互作公共资源库信息,从药物成分的分子结构、活性基团、结合靶点等角度切入,运用 GINI 基尼不纯度、互信息等人工智能手段捕获共性特征,借助深度学习、迁移学习等技术构建基于交叉学科的临床联合用药合理性智能评价体系<sup>[21]</sup>,这对构建临床联合用药相互作用评价是一种值得期待的发展方向。

作者贡献: 李江玲负责实验研究、数据分析及文章撰写;

刘爽和谢以清协助完成实验;龙江兰和王真真负责文章修改;王爱婷、马强和鄢丹负责指导实验与文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Center for Drug Evaluation, National Medical Product Administration. Technical guidelines for drug interaction research [EB/OL]. [2021-01-26]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfo-Common/5a15b727e605482c1cf594c689bb994b>.
- [2] Deng Y, Qiu Y, Xu X, et al. META-DDIE: predicting drug-drug interaction events with few-shot learning [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23: bbab514.
- [3] Zhang H, Li SY, Feng HL, et al. Quality control of Shuanghuanglian preparations using an effect-constituent index [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2149-2154.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 737-738, 740.
- [5] Alves C, Mendes D, Marques FB. Fluoroquinolones and the risk of tendon injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75: 1431-1443.
- [6] Zhang JH, Shang HC, Zheng WK, et al. Systematic review on the compatibility of Shuanghuanglian Injection combined with Western medical injections [J]. *Chin J Evid-Based Med (中国循证医学杂志)*, 2010, 10: 148-155.
- [7] Tang CY, Zeng LW, Lin H, et al. Analysis on ADR/ADE reports induced by Shuanghuanglian Injection in Guangxi of 2009 [J]. *J China Pharm (中国药房)*, 2010, 21: 1501-1504.
- [8] Yadav S, Sharma AK, Kumar P. Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 127.
- [9] Wang XY, Zhu J, Wang QQ, et al. Anion- $\pi$ -directed self-assembly between di- and trisulfonates and a rigid molecular cage with three electron-deficient V-clefts [J]. *Inorg Chem*, 2019, 58: 5980-5987.
- [10] Li W, Wang ZJ, Lin XY, et al. Study on the substance basis of "property-taste-efficacy" of licorice and *Rhizoma chinensis* based on supramolecular system induced by weak bond [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1901-1908.
- [11] Li W, Wang ZJ, Liu XJ, et al. Based on weak bond chemistry, the interaction mechanism between glycyrrhiza protein and berberine in water decocting process of *Rhizoma Coptidis* and licorice was investigated [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2119-2126.
- [12] Tang W, Shi QP, Ma T, et al. Meta-analysis on incidence of adverse drug reaction induced by Shuanghuanglian injection [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 2732-2742.
- [13] Tian X, Wang P, Li T, et al. Self-assembled natural phytochemicals for synergistically antibacterial application from the enlightenment of traditional Chinese medicine combination [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1784-1795.

- [14] Yan D, Chen LH, Feng X, et al. Characterization of interaction in Qingkailing Injection with clinic administration based on isothermal titration calorimetry [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 322-328.
- [15] Purushothaman M, Dhar SK, Natesh R. Role of unique loops in oligomerization and ATPase function of *Plasmodium falciparum* gyrase B [J]. Protein Sci, 2022, 31: 323-332.
- [16] Elseginy SA, Anwar MM. Pharmacophore-based virtual screening and molecular dynamics simulation for identification of a novel DNA gyrase B inhibitor with benzoxazine acetamide scaffold [J]. ACS Omega, 2022, 7: 1150-1164.
- [17] Sha JY, Liu H, Xie YM, et al. Clinical application characteristics of Ciwujia Injection in treatment of 5 904 cases with cardiovascular disease in real world [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3525-3532.
- [18] Yang DH, Gao J. One case with adverse reaction caused by continuous intravenous drip of ciprofloxacin and Shuang Huang Lian [J]. Chin Nurs Res (山西护理杂志), 1995, 9: 226.
- [19] Shen GP. The change of insoluble particle before and after Qingkailing Injection compatibility with four kinds of antibiotics [J]. Chin J Clin Ration Drug Use (临床合理用药杂志), 2009, 2: 37-39.
- [20] Yan D. Clinical bio-characteristic profiling: evaluation of quality control and rational drug use of Chinese materia medica-Professor Yan Dan[J]. J Capit Med Univ (首都医科大学学报), 2020, 41: 773-777.
- [21] Wang ZZ, Liu S, Li JL, et al. Exploration on rationality evaluation approach of drug combination medication based on sequential analysis and machine learning [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2356-2362.