

制川乌和白芍不同比例配伍对甲醛致痛模型小鼠镇痛作用的影响

孙丹妮, 汪倩倩, 王超, 刘春芳*, 林娜*
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究制川乌与白芍不同比例配伍对甲醛致痛模型小鼠镇痛作用的影响变化。方法:采用均匀设计法,按2因素7水平以甲醛足底致痛小鼠2个时相的舔足时间为指标,观察合煎液口服给药后对小鼠镇痛作用的影响,选取有显著意义的配比和剂量进行验证。结果:与模型组比较,合煎液能有效减少甲醛足底致痛小鼠两个时相的舔足时间;经回归分析可知,单独制川乌具有镇痛作用,单独白芍没有镇痛作用,二者存在协同作用,且比例为1:1时协同作用最大。结论:制川乌与白芍配伍增强制川乌的镇痛作用,且1:1时协同作用最强。本研究为十八反中制川乌与白芍反药组合作用的深入研究提供实验依据。

[关键词] 十八反; 均匀设计; 制川乌; 白芍; 镇痛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220050

Analgesic Effect of Combined Administration of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix with Different Proportions in Formalin-induced Model Mice SUN Dan-ni, WANG Qian-qian, WANG Chao, LIU Chun-fang*, LIN Na* (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the combined administration of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix at different dose or ratio on formalin-induced licking time in mice. **Method:** The uniform design method was used based on two factors and seven levels to investigate licking time of formalin-intraplantar model at two phases, meanwhile, a demonstration test was conducted by choosing significant ratio and dose. **Result:** The combined administration of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix availably reduced the licking time of two phases. Neither Radix ampelopsis nor Aconiti Radix Cocta used alone had the analgesic effect by regression analysis. There was the synergistic effect between Ampelopsis Radix and Aconiti Radix Cocta, and Ampelopsis Radix could increase the analgesic effect of Aconiti Radix Cocta in mice, with the peak at the rate of 1:1. **Conclusion:** The combined administration of Ampelopsis Radix and Aconiti Radix Cocta could increase the analgesic effect of Aconiti Radix Cocta, with the peak at the rate of 1:1. This study provides the laboratory basis for further researches on the combined effect between Ampelopsis Radix and Aconiti Radix Cocta.

[Key words] eighteen incompatible pairs; uniform design; Aconiti Radix Cocta; Ampelopsis Radix; analgesic effect

乌头与白芍配伍为“十八反”内容之一,但有学者认为二者并非绝对配伍禁忌,运用得当,可治愈顽疾^[1-4]。来自实验室的研究报告也显示乌头与白芍

配伍存在多种可能性,既可能提高、也可以降低乌头的药效^[5-6]。由于剂量和药物配比是影响药效的主要因素之一,本研究拟通过均匀设计分析方法,以乌

[收稿日期] 20151001(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2011CB505300, 2011CB505305);国家自然科学基金面上项目(81173628)

[第一作者] 孙丹妮,在读硕士,从事中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:554785365@qq.com

[通讯作者] *林娜,研究员,从事中药药性理论和中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:linna888@163.com;

*刘春芳,副研究员,从事中药药性理论和中药药理研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail:chunfang666@126.com

头的镇痛功效为药理基础,评价不同比例和剂量条件下,制川乌与白芍配伍对甲醛足底致痛小鼠镇痛作用的影响,从而为十八反配伍禁忌的研究提供可供参考的实验依据。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,体重 18 ~ 22 g,来源于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(军)2012-0004。

1.2 药物及试剂 制川乌产自四川江油,白芍产自安徽铜陵,均购自北京华邈中药工程技术开发中心;经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定,分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的干燥母根的加工炮制品、葡萄科植物白芍 *Ampelopsis japonica* (Thunb.) Mmakino 的干燥块根。甲醛(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号 150422);生理盐水(分析纯,石家庄四药有限公司,批号 1412261907)。

1.3 仪器 HF-200 型电子天平(赛多利斯公司),SHZ(Ⅲ)型循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药品 制备制川乌与白芍分别按均匀设计的不同剂量和配比混合后加入圆底烧瓶中,加 10 倍量蒸馏水,浸泡 1 h;电热套加热,第 1 煎 1.5 h,过滤;第 2 煎加 8 倍量的蒸馏水,煎煮 1.5 h,过滤;合并 2 次滤液。60 ℃ 旋蒸浓缩,浓缩到实验所需要体积, -20 ℃ 备用。

2.2 分组与给药 将制川乌、白芍分别作为考察因素,每个因素各设 7 个水平,按均匀设计及其使用表进行安排,共得 7 种配比,具体见表 1。以前期探索的制川乌镇痛作用的有效剂量和 2015 年版《中国药典》白芍的用量,确定制川乌剂量范围为 0.34 ~ 25 g·kg⁻¹,白芍为 1.03 ~ 2.06 g·kg⁻¹。

表 1 制川乌与白芍配伍均匀设计

Table 1 Compatibility of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix of uniform design

| No. | 制川乌 | 白芍 |
|-----|-------|------|
| 1 | 0.34 | 1.62 |
| 2 | 0.70 | 1.15 |
| 3 | 1.43 | 2.06 |
| 4 | 2.93 | 1.45 |
| 5 | 6.00 | 1.03 |
| 6 | 12.31 | 1.82 |
| 7 | 25.00 | 1.29 |

小鼠 64 只,随机分为 8 组,每组 8 只,即模型组,配伍 A,B,C,D,E,F,G 组,各配伍组按表 2 设计的剂量和每 10 g 小鼠体重 0.1 mL ig 给药,同时模型组给予生理盐水对照。

2.3 小鼠甲醛致痛实验 按照表 2,各组小鼠灌胃给药或者生理盐水 60 min 后,再给每只小鼠足皮下注射 0.92% 甲醛溶液 20 μL,并立即放入 5 000 mL 大烧杯中观察,用秒表记录每只小鼠在 1 h 内的舔足时间。注射甲醛后 0 ~ 5 min 作为第 1 时相,15 ~ 55 min 作为第 2 时相。

表 2 制川乌与白芍配伍均匀设计剂量

Table 2 Dose proportion of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix based on uniform design

| 组别 | 因素 1 | 因素 2 | 总剂量/g·kg ⁻¹ | 白芍-制川乌 |
|----|------|------|------------------------|--------|
| A | 1 | 5 | 1.96 | 4.76 |
| B | 2 | 2 | 1.85 | 1.64 |
| C | 3 | 7 | 3.49 | 1.44 |
| D | 4 | 4 | 4.38 | 0.49 |
| E | 5 | 1 | 7.03 | 0.17 |
| F | 6 | 6 | 14.13 | 0.15 |
| G | 7 | 3 | 26.29 | 0.05 |

2.4 统计学分析 先用 SAS 9.2 软件进行 Kruskal-Wallis 秩和检验,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,后进行主成分回归分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对甲醛致痛小鼠第 1 时相舔足时间的影响 各组小鼠第 1 时相舔足时间结果见表 3。与模型组比较,各给药组小鼠第 1 时相的舔足时间均显著降低($P < 0.05$),提示制川乌与白芍合煎液对于该模型第 1 时相均具有镇痛作用。

表 3 制川乌白芍配伍对甲醛致痛小鼠 2 个时相舔足时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of water decoction of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix on licking time of two phases in formalin-induced mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 舔足时间/s | |
|----|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | 第 1 时相 | 第 2 时相 |
| 模型 | - | 78.65 ± 2.45 | 328.49 ± 35.28 |
| A | 1.96 | 56.42 ± 8.55 ¹⁾ | 212.06 ± 32.22 ¹⁾ |
| B | 1.85 | 60.38 ± 4.06 ²⁾ | 164.54 ± 23.26 ²⁾ |
| C | 3.49 | 51.73 ± 3.97 ²⁾ | 186.14 ± 38.82 ¹⁾ |
| D | 4.38 | 56.84 ± 4.32 ²⁾ | 144.90 ± 16.44 ²⁾ |
| E | 7.03 | 50.02 ± 3.59 ²⁾ | 150.93 ± 23.94 ²⁾ |
| F | 14.13 | 38.83 ± 4.04 ²⁾ | 132.65 ± 19.22 ²⁾ |
| G | 26.29 | 33.85 ± 2.22 ²⁾ | 89.15 ± 10.28 ²⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

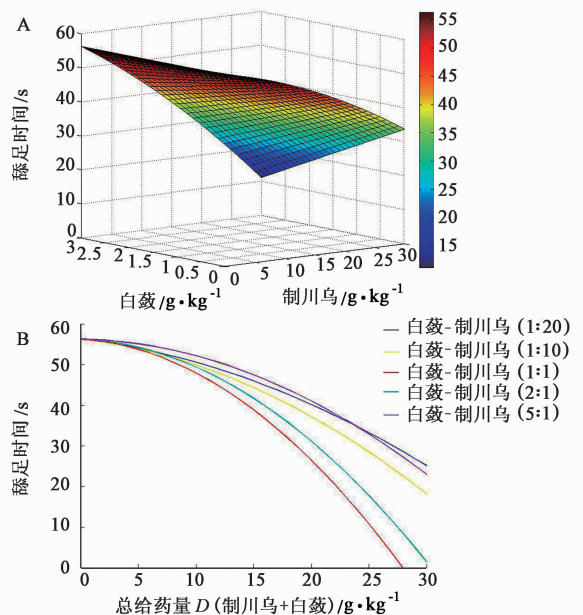
药物交互作用分析:将制川乌与白芷均匀设计 7 组试验数据进行主成分回归分析,以制川乌、白芷分别为自变量 x_1, x_2 , 小鼠舔足时间为因变量 y_1 , 得拟合方程 $y_1 = 56.236 0 - 0.350 9x_1 - 0.013 4x_1^2 - 0.249 8x_1x_2$ (相关系数 $R^2 = 0.33, P < 0.000 1$), 三维效应图见图 1A。结果显示,制川乌具有镇痛作用,白芷无此作用,制川乌与白芷配伍对降低小鼠第 1 时相舔足时间存在正交互作用,白芷能增加制川乌对小鼠第 1 时相的镇痛作用。

第 1 时相舔足时间与药物配伍比例和用药剂量相关性分析:由方程 y_1 进行外延推论,分别以药物总剂量(制川乌 + 白芷)、不同比例(白芷-制川乌)作为自变量 D, K , 舔足时间为相应的因变量 y'_1 , 得理论拟合方 $y'_1 = 56.236 0 - 0.350 9D/(K + 1) - 0.013 4D^2/(K + 1)^2 - 0.249 8KD^2/(K + 1)^2$, 结果见图 1B。随着制川乌白芷总剂量的增加,各组小鼠的舔足时间呈下降趋势,且随着制川乌或白芷在配伍中比例增大,下降速率越慢;白芷与制川乌比例为 1:1 时,小鼠舔足时间的下降速率最快,说明二者 1:1 时的协同作用强度最大。白芷与制川乌比例为 5:1, 总剂量 $< 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,小鼠舔足时间的下降速率最慢,此时两者协同作用强度最小;白芷与制川乌比例为 1:20, 总剂量 $> 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,舔足时间的下降速率最慢,说明此时二者协同作用强度最小。

3.2 对甲醛致痛小鼠第 2 时相舔足时间的影响
与模型组比较,各给药组小鼠第 2 时相的舔足时间均显著降低 ($P < 0.05$), 提示制川乌与白芷合煎液对于该模型第 2 时相均具有镇痛作用。见表 3。

药物交互作用分析:将制川乌与白芷均匀设计 7 组试验数据进行主成分回归,以制川乌、白芷分别为自变量 x_1, x_2 , 小鼠舔足时间为因变量 y_2 , 得拟合方程 $y_2 = 177.739 0 - 1.292 3x_1 - 0.049 2x_1^2 - 0.920 1x_1x_2$ (相关系数 $R^2 = 0.20, P < 0.000 1$), 三维效应图见图 2A。结果显示,制川乌具有镇痛作用,白芷无镇痛作用,制川乌与白芷对降低小鼠第 2 时相舔足时间存在正交互作用,白芷增加制川乌对小鼠第 2 时相的镇痛作用。

第 2 时相舔足时间与药物配伍比例和用药剂量相关性分析:由方程 y_{12} 进行外延推论,分别以药物总剂量(制川乌 + 白芷)、不同比例(白芷-制川乌)作为自变量 D, K , 舔足时间为相应的因变量 y'_2 , 得理论拟合方 $y'_2 = 177.739 0 - 1.292 3D/(K + 1) - 0.049 2D^2/(K + 1)^2 - 0.920 1KD^2/(K + 1)^2$, 结果



A. 三维效应图; B. 比例-剂量拟合

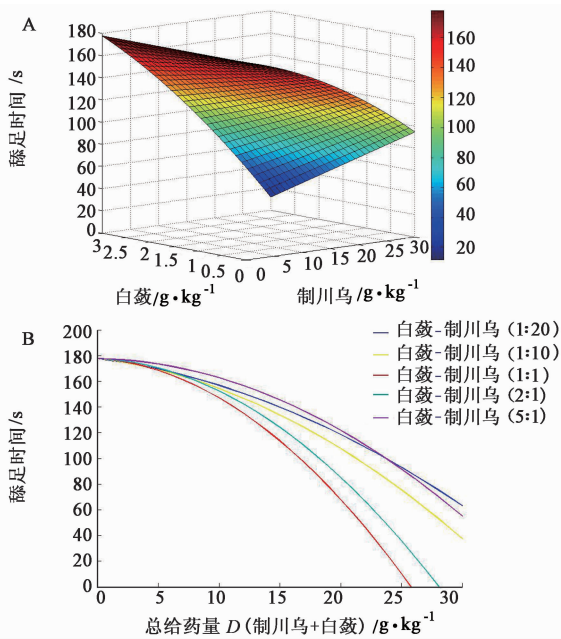
图 1 制川乌与白芷配伍对甲醛致痛小鼠第 1 时相舔足时间的影响
Fig. 1 Effect of water decoction of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix on licking time of first phase in formalin-induced mice

见图 2B。与第 1 时相结果相似,随着制川乌白芷总剂量的增加,各组小鼠舔足时间呈现下降趋势,随着制川乌或白芷在配伍中比例增大,下降速率越慢;白芷与制川乌比例为 1:1 时,小鼠舔足时间的下降速率最快,说明二者 1:1 时的协同作用强度最大。白芷与制川乌比例为 5:1, 总剂量 $< 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,小鼠舔足时间的下降速率最慢,此时两者协同作用强度最小;白芷与制川乌比例为 1:20, 总剂量 $> 25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,舔足时间的下降速率最慢,说明此时两者协同作用强度最小。

3.3 验证实验 取 28 只小鼠分 4 组,即模型组、制川乌组 ($0.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 白芷组 ($1.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 制川乌 ($0.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 白芷 ($1.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 配伍组, 每组 7 只, 具体方法同小鼠甲醛足底致痛实验。数据采用单因素方差分析, 见表 4。与模型组比较, 制川乌组和制川乌白芷配伍组均显著降低小鼠两个时相的舔足时间 ($P < 0.05$), 而白芷组对舔足时间的影响没有统计学差异; 与单独制川乌组比较, 配伍组两个时相的舔足时间均降低; 表明白芷-制川乌为 3:1 配伍时, 白芷协同了制川乌的镇痛作用, 这与均匀设计结果相符。

4 讨论

乌头与白芷配伍属“十八反”配伍禁忌范畴, 而有关二者同用的临床报道却也不在少数, 如林通国



A. 三维效应图; B. 比例-剂量拟合

图 2 制川乌与白芷配伍对甲醛致痛小鼠第 2 时相舔足时间的影响
Fig. 2 Effect of water decoction of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix on licking time of second phase in formalin-induced mice

表 4 制川乌与白芷配伍对小鼠 2 个时相舔足时间的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 4 Effects of Aconiti Radix Cocta and Ampelopsis Radix on two phases' licking time in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

| 组别 | 剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 舔足时间/s | |
|----------|---|----------------------------|------------------------------|
| | | 第 1 时相 | 第 2 时相 |
| 模型 | - | 68.22 ± 7.34 | 224.96 ± 33.49 |
| 制川乌 | 0.62 | 48.41 ± 4.04 ¹⁾ | 143.05 ± 7.90 ¹⁾ |
| 白芷 | 1.86 | 64.41 ± 3.86 | 210.88 ± 25.19 |
| 制川乌 + 白芷 | 0.62 + 1.86 | 41.03 ± 2.91 ²⁾ | 109.48 ± 10.40 ¹⁾ |

等^[1,3]用川乌和白芷等组成的拮抗丸治疗 250 例有着痰痹心阳、脾肾阳虚等慢性疾病的患者,取得了不错的效果,后来又用该拮抗丸治疗 273 例恶性肿瘤患者,结果使 90.48% 患者的病情得到了控制或缓解;董秀英等^[4]也用针刺配合含有川乌、白芷的相反药物进行外敷治疗面瘫 102 例,疗效显著。同样的,在实验研究方面二者同用的实验证据也有报道,如含乌头和白芷的复方具有抗菌作用^[1,7]。当然,二者配伍不能同用的现代研究报道亦有所见,与白芷配伍能增强乌头的心脏毒性、降低其镇痛作用和抑制肝脏药物代谢酶活性^[5-6,8]。这些说明了乌头白芷配伍禁忌是有条件的,在一定的条件下是可以同用的。

乌头性热,具有镇痛作用,临床及药理报道颇多^[1,9-10]。白芷性寒,《中药大辞典》记载其主要功效为清热解毒、散结止痛^[11],然而根据目前少有的几篇有关白芷镇痛作用的研究显示,白芷对电刺激和热辐射刺激甩尾小鼠均没有镇痛作用^[5-6,12]。这与本研究前期实验的结果相似,白芷在 1.03 ~ 30 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对甲醛足底致痛模型小鼠没有镇痛作用。有关乌头与白芷配伍的镇痛作用的研究已有报道,赖晓艺等认为白芷能降低制川乌对热辐射刺激甩尾小鼠的镇痛作用^[6],而肖庆慈等则证明白芷增加黑附片及炙川乌对电刺激小鼠的镇痛作用^[5],故二者能否同用于镇痛,至今仍不能得出统一的结论。究其原因,除了中药材品种、病理条件等因素外,剂量配比还可能是影响二者配伍药效的关键因素之一,而相关的研究尚未见报道。

均匀设计方法是一种在正交设计基础上,将数论与多元统计相结合的新型实验设计方法,具有方便、可操作性强、预测性好的特点,已为中药复方的配伍理论研究展开了一条新的探索思路和方法^[13-18]。本课题组前期已采用均匀设计的方法对“十八反”多个反药组合的妨害治疗进行了有益探索,并取得了较好的结果^[15,17-18]。本研究从剂量比对药效影响的角度,采用均匀设计的方法评价制川乌与白芷配伍对甲醛足底致痛小鼠镇痛作用的影响。

本研究结果显示,无论是甲醛足底致痛小鼠第 1 时相还是第 2 时相,合煎液均具有镇痛作用。经回归分析可知,对于甲醛足底致痛小鼠的 2 个时相,在制川乌 0.34 ~ 25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和白芷 1.03 ~ 2.06 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (分别等效于 2015 年版《中国药典》川乌用量低限的 1.097 ~ 80.645 倍和高限的 0.548 ~ 40.323 倍,白芷用量低限的 1 ~ 2 倍和高限的 0.05 ~ 1 倍),制川乌均具有镇痛作用,白芷无此功效,制川乌与白芷对降低小鼠甲醛足底致痛的 2 个时相的舔足时间均存在协同作用,白芷增加制川乌的镇痛作用,二者比例为 1:1 时,协同作用最大。经实验验证进一步表明 1:3 时,白芷配伍能增强制川乌对甲醛足底致痛小鼠的镇痛作用。

本研究通过均匀设计法评价并证明了制川乌与白芷配伍能增强制川乌的镇痛作用,且比例为 1:1 时协同作用最强。相关结果将为十八反配伍理论的深入研究提供实验参考。

[参考文献]

[1] 林通国. 中药“十八反”之研究——250 例拮抗丸的

- 应用分析[J]. 成都中医学院学报, 1981, 3(3): 58-61.
- [2] 杨明会, 李绍旦, 高月. 从现代临床应用探析中药“十八反”[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(6): 1254-1257.
- [3] 林通国. 拮抗丸治疗恶性肿瘤 273 例的临床观察[J]. 辽宁中医杂志, 1988, 19(6): 15-16.
- [4] 董秀英. 针刺配合相反药物治疗面瘫 102 例[J]. 河南中医药学刊, 1997, 12(3): 46.
- [5] 肖庆慈, 郭挂森. 白薇与附片, 川乌, 草乌配伍后部分药理实验研究[J]. 云南中医学院学报, 1984, 7(2): 28-40.
- [6] 赖晓艺, 庄朋伟, 卢志强, 等. “半蒺贝及攻乌”反药组合对制川乌镇痛作用的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(1): 32-35.
- [7] 贾敏, 张寒. 白薇, 乌头单用及合用对人胃腺癌细胞 SGC-7901 增殖, 凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(27): 3388-3390.
- [8] 石苏英, 金科涛, 王宇光, 等. 白薇配伍乌头对大鼠肝脏 CYP450 的调节作用[J]. 医药导报, 2007, 26(9): 975-979.
- [9] 李森, 白正勇. 麻黄附子细辛汤治疗痛证探析[J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(2): 103-104.
- [10] 邓家刚, 范丽丽, 杨柯, 等. 附子镇痛作用量效关系的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 28(11): 2249-2251.
- [11] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997: 691.
- [12] 赵翠兰, 肖庆慈. 白薇部分药理作用实验研究[J]. 云南中医中药杂志, 1996, 17(3): 55-58.
- [13] 方开泰. 均匀设计及其应用(IV)[J]. 数理统计与管理, 1994, 13(3): 54-56.
- [14] 徐维佳, 周海虹, 陈少东. 均匀设计在中药复方研究中的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 236-239.
- [15] 林雅, 徐颖, 尚尔鑫, 等. 基于均匀设计法评价藜芦对人参扶正功效的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 165-170.
- [16] 朱冠秀, 王宇光, 李飞, 等. 采用均匀设计研究南沙参、北沙参配伍藜芦相反的毒性作用规律[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 686-690.
- [17] 刘春芳, 谭淑芳, 王丹华, 等. 基于均匀设计法的制川乌与生半夏配伍药效研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 2169-2175.
- [18] 谭淑芳, 刘春芳, 王春生, 等. 基于均匀设计法评价制川乌与川贝、浙贝反药配伍组合的镇痛和祛痰镇咳作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2706-2713.

[责任编辑 周冰冰]

屠呦呦研究员简介

屠呦呦研究员, 1955 年分配在卫生部中医研究院(现中国中医科学院)中药研究所工作, 中国中医科学院终身研究员兼首席研究员, 现任我所青蒿素研究开发中心主任, 长期致力于青蒿素的研究工作。2011 年获拉斯克临床医学奖, 2015 年获得诺贝尔生理学或医学奖。

Profile of Youyou Tu

Researcher Youyou Tu started to work for the Institute of Chinese Materia Medica, the Academy of Traditional Chinese Medicine (present China Academy of Chinese Medical Sciences, CACMS) under the Ministry of Health in 1955. She is the lifetime researcher and chief researcher at the CACMS; She presently acts as the Director of the Artemisinin Research Center of the Institute, and has been dedicated to the research of artemisinin for a long time. She received the 2011 Lasker Award in clinical medicine and the 2015 Nobel Prize in Physiology or Medicine.