

葛根芩连汤整方剂量变化治疗溃疡性结肠炎的量-效关系研究

赵益¹, 李冰涛², 赖小东¹, 余日跃³, 刘红宁¹, 徐国良^{1*}

(1. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心, 南昌 330034;

2. 湖南中医药大学, 长沙 410000; 3. 江西中医药大学药理教研室, 南昌 330034)

[摘要] **目的:**探讨葛根芩连汤整方剂量变化治疗溃疡性结肠炎的量效关系,获得基于药效学的经方“剂量阈”。**方法:**采用 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇法诱导溃疡性结肠炎实验大鼠模型,正常组除外,分为:正常组、溃疡性结肠炎模型组、柳氮磺吡啶肠溶片组,葛根芩连汤整方剂量变化的 9 个剂量组(分别为生药 1.65, 4.95, 8.25, 11.55, 14.85, 18.15, 21.45, 24.75, 28.05 g·kg⁻¹),给药 1 次/d,共 5 d。观察大鼠的一般情况,计算大鼠疾病活动指数(DAI)指数,比色法检测匀浆上清液髓质过氧化酶(MPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性;经 GraphPad Prism 6 软件拟合量效曲线,评价葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的量-效关系,计算相关剂量参数。**结果:**综合实验数据分析,以 MPO 活性为指标,经 GraphPad Prism 6 Demo 拟合后,拟合方程与模型相似度高,量效曲线呈反向“S”型,且有意义,算出的剂量阈参数如下:[D]₂₀~[D]₈₀为 15.39~17.11 g·kg⁻¹,中位剂量:[D]₅₀ 16.25 g·kg⁻¹,阈剂量:[D]₂₀ 15.39 g·kg⁻¹。**结论:**葛根芩连汤治疗治疗溃疡性结肠炎模型大鼠的量-效曲线呈现反向“S”型,提示其中剂量为有效治疗范围,即大致在 15.39~17.11 g·kg⁻¹。

[关键词] 葛根芩连汤; 溃疡性结肠炎; GraphPad Prism 6 软件拟合; 量-效关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0131-04

[doi] 10.11653/syfy2014040131

Dose-effect Relationship of Gegen Qinlian Decoction in Treating the Ulcerative Colitis Rats

ZHAO Yi¹, LI Bing-tao², LAI Xiao-dong¹, YU Ri-yue³, LIU Hong-ning¹, XU Guo-liang^{1*}

(1. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of

Traditional Chinese Medicine (TCM), Jiangxi University of TCM, Nanchang 330034, China;

2. Hunan University of TCM, Changsha 410000, China;

3. Department of Pharmacology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330034, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the dose-effect relationship and ‘dose threshold’ parameter of Gegen Qinlian decoction in treating the picrylsulfonic acid solution (TNBS) induced-ulcerative colitis rats. **Method:** The experimental ulcerative colitis model induced by TNBS/ethanol, except for the normal group, then divided into model group, sulfasalazine group, and Gegen Qinlian decoction 1.65, 4.95, 8.25, 11.55, 14.85, 18.15, 21.45, 24.75, 28.05 g·kg⁻¹, administered once a day for 5 days. then measured and calculated the disease activity index (DAI) index, and detected the myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) levels in tissue homogenate. Through used the GraphPad Prism 6 software to establish the dose-response and calculate the dose-related parameters. **Result:** By the comprehensive analysis of experimental data, the dose-effect relationship of MPO appeared the ‘S’ shape, and the dose threshold parameters are as follows: D₂₀-D₈₀

[收稿日期] 20131011(008)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB530603);国家自然科学基金项目(81160424);江西省科技支撑项目(20111BBG70005-1)

[第一作者] 赵益, 硕士, 讲师, 从事中药药理研究工作, Tel:0791-87142858, E-mail: zhysyz2008@163.com

[通讯作者] * 徐国良, 博士, 教授, 从事中药药理与药代动力学工作, Tel:0791-87142857, E-mail: xuguoliang6606@126.com

15.39-17.11 g·kg⁻¹, median dose: D₅₀ 16.25 g·kg⁻¹, the threshold dose: D₂₀ 15.39 g·kg⁻¹. **Conclusion:** Gegen Qinlian decoction showed dose-response curves as 'S' shape in treatment of ulcerative colitis rats, suggesting a dose-dependent range is between 15.39 g·kg⁻¹ to 17.11 g·kg⁻¹.

[**Key words**] Gegen Qinlian decoction; ulcerative colitis; GraphPad Prism 6 software; dose-effect relationship

“中医不传之秘在药量”,方药剂量直接影响中医药临床疗效,开展方药量-效关系的研究的重要目标在于指导临床合理用量,提高中医药临床疗效^[1]。目前中药量-效关系的研究主要集中在研究思路的探讨、理论文献的挖掘、拆方研究、血清药动学研究及代谢组学等^[2],其中对于量-效关系模型的建立一直是值得探索的问题,目前多采用多元回归模型,若各组分的量-效关系明显,可采用权重配方模型分析。常用的软件有 DAS, NONMEM^[3],近年来 GraphPad 软件也用于量-效关系的研究,本课题以葛根芩连汤为模式药,以剂量与疗效的关系为切入点,运用 GraphPad 软件进行中药复方“量-效”关系的建立,初步建立一套契合中医药特色的中药复方“量-效”关系的研究模式。

1 材料

1.1 药物 葛根芩连汤(葛根 8 g,黄芩 3 g,黄连 3 g,炙甘草 2 g,干姜 0.5 g),葛根、黄芩、黄连、甘草饮片由北京市双桥燕京中药饮片厂提供,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Wild) Ohwi 的干燥根;唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根;毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 干燥根茎(蜜炙)。实验用药液的质量标准由江西中医学院国家工程研究中心建立^[1]。

1.2 试剂 隐血测试盒(批号 20121221)、髓质过氧化物酶(MPO)试剂盒(批号 20121007)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20121026)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20121021)均由南京建成生物工程研究所提供;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国 Sigma 公司,批号 201210);柳氮磺吡啶肠溶片(上海中西三维药业有限公司,批号 20120504),用前研成细末,用蒸馏水配成 0.1 g·mL⁻¹的混悬液。

1.3 动物 SD 大鼠 72 只,雄性,SPF 级,体重(200±20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.4 仪器 TL-5.0W 台式离心机(上海市离心机机械研究所),紫外分光光度计(岛津 UV-2500)。

2 方法

2.1 造模及分组、给药 正常组 10 只全程常规饲养,其余各组禁食不禁水 24 h 后,给予 2% 戊巴比妥钠(45 mg·kg⁻¹) ip 麻醉,用 1 mL 注射器抽吸 5% TNBS 原液(100 mg·kg⁻¹),继续抽吸 0.25 mL 的 40% 乙醇混合,用胃管(经液体石蜡浸润)插入肛门上段 8 cm 一次性注入混合试剂,再吸 0.5 mL 空气,注入胃管,尽量将胃管药液注入肠腔。轻揉大鼠腹部 1 min,使 TNBS/乙醇液均匀地与大鼠结肠黏膜接触。然后将大鼠头向下,身体倾斜 45 度,放置至自然清醒;正常组用同样方法,同体积生理盐水灌肠,自然清醒。造模后第 2 天所有大鼠眼眶取血,比色法测定血浆 MPO 活性,检测大便隐血情况。确定造模成功后,以 MPO 活性、隐血及体重为依据,遴选出 110 只,将动物平均分为模型组、阳性药柳氮磺吡啶肠溶片 0.5 g·kg⁻¹ 组、葛根芩连汤(1.65, 4.95, 8.25, 11.55, 14.85, 18.15, 21.45, 24.75, 28.05 g·kg⁻¹) 9 个剂量组,每组 10 只。第 3 天开始给药,阳性药每天按照 0.5 g·kg⁻¹ ig,各组给药 1 次/d,给药 5 d。实验结束后动物称体重,观察粪便情况,计算疾病活动指数(DAI);取结肠组织分装后组织匀浆,测定组织中上清液 MPO,MDA,SOD,NO。

2.2 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。并利用 GraphPad Prism 6 Demo 软件,进行剂量-效应曲线的非线性拟合计算有效剂量范围(D₂₀ ~ D₈₀),中但剂量(D₅₀),阈剂量(D₂₀)。

3 结果

3.1 葛根芩连汤整方剂量变化对大鼠 DAI 指数,MDA,MPO,SOD 的影响 与正常组比较,模型组 DAI 指数升高,有极显著差异($P < 0.01$);葛根芩连汤 14.85,18.15 g·kg⁻¹ 剂量组 DAI 指数有所降低,与模型组比较差异显著($P < 0.01, P < 0.05$);模型组 MDA 明显高于正常组,有极显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,除 14.85 g·kg⁻¹ 剂量组外,各给药组含量均明显下降,差异极显著($P < 0.01$);与正常组比较,模型组 MPO 明显上升($P < 0.01$),与模型组比较,除 8.25 g·kg⁻¹ 剂量组外,

各给药组含量均极显著降低($P < 0.01$);血浆 SOD 的变化,与正常组比较,模型组 SOD 显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药组,葛根芩连汤

11.55,24.75,28.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组大鼠血浆 SOD 显著升高($P < 0.01$),其余各组活性变化无显著差异(表 1)。

表 1 葛根芩连汤整方剂量变化对各组大鼠 DAI 指数,MDA,MPO,SOD 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	DAI 评分/分	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常	-	10	0.22 ± 0.24	2.55 ± 0.31	64.46 ± 15.75	221.62 ± 10.96
模型	-	10	1.43 ± 0.69 ¹⁾	4.31 ± 0.69 ¹⁾	222.03 ± 45.08 ¹⁾	201.71 ± 15.68 ²⁾
柳氮磺吡啶肠溶片	0.5	9	1.23 ± 0.82	2.71 ± 0.58 ³⁾	58.90 ± 11.89 ³⁾	223.78 ± 14.19 ⁴⁾
葛根芩连汤	1.65	9	1.52 ± 0.91	2.42 ± 0.61 ³⁾	185.70 ± 20.3 ³⁾	180.46 ± 32.21
	4.95	9	1.04 ± 0.59	3.00 ± 0.26 ³⁾	192.16 ± 15.43 ³⁾	193.99 ± 10.51
	8.25	8	1.38 ± 0.70	2.78 ± 0.72 ³⁾	233.53 ± 51.91	206.72 ± 12.56
	11.55	8	1.17 ± 0.80	2.71 ± 0.74 ³⁾	161.26 ± 19.57 ³⁾	222.60 ± 14.32 ⁴⁾
	14.85	9	0.33 ± 0.0.27 ³⁾	4.00 ± 0.73	181.49 ± 26.25 ³⁾	208.74 ± 15.77
	18.15	9	0.67 ± 0.62 ⁴⁾	3.20 ± 0.61 ³⁾	73.86 ± 9.69 ³⁾	211.39 ± 10.47
	21.45	8	0.96 ± 0.49	2.87 ± 0.52 ³⁾	65.63 ± 18.60 ³⁾	217.17 ± 10.94
	24.75	9	1.04 ± 0.48	2.79 ± 0.34 ³⁾	68.61 ± 14.09 ³⁾	227.18 ± 12.52 ⁴⁾
	28.05	9	1.04 ± 0.65	2.66 ± 0.25 ³⁾	71.45 ± 16.27 ³⁾	225.77 ± 16.01 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各个指标经 GraphPad Prism 6 Demo 软件拟合将各组大鼠 DAI 指数,MDA,SOD,MPO 指数值导入 GraphPad Prism 6 Demo 软件,通过剂量-效应指标做非线性拟合,所得结果如下:

DAI 曲线公式为 $Y = 1.308 + [0.803 2 - 1.308] / [1 + 10 \times (11.95 - X)]$, $R^2 = 0.119 2$ 。剂量阈参数: $D_{20} \sim D_{80}$ (11.35 ~ 12.55) $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{50} 11.95 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{20} 11.35 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

MDA 曲线公式为 $Y = 2.406 + [3.012 - 2.406] / (1 + 10 \times (3.266 - X))$, $R^2 = 0.072 6$ 。剂量阈参数: $D_{20} \sim D_{80}$ 2.66 ~ 3.87 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{50} 3.27 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{20} 2.66 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

MPO 曲线公式为 $Y = 68.57 + (193.0 - 68.57) / [1 + 10 \times ((16.25 - X) \times (-0.698 5))]$, $R^2 = 0.821 8$ 。剂量阈参数如下: $D_{20} \sim D_{80}$ 15.39 ~ 17.11 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{50} 16.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{20} 15.39 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

SOD 曲线公式为: $Y = 187.2 + (218.8 - 187.2) / [1 + 10 \times (8.039 - X)]$, $R^2 = 0.377 7$ 。剂量阈参数: $D_{20} \sim D_{80}$ 7.44 ~ 8.64 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{50} 8.04 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; D_{20} 7.44 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

经 GraphPad Prism 6 拟合后, R^2 由大到小排序为:MPO (0.821 8) > SOD (0.377) > DAI 指数 (0.119) > MDA (0.072 6)。可见 MPO 数据的拟合的相关系数最好,能反映出来量-效关系。所以以

MPO 为指标求得葛根芩连汤质量溃疡性结肠炎模型大鼠的剂量阈参数为: $D_{20} \sim D_{80}$ 15.39 ~ 17.11 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, D_{50} 16.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, D_{20} 15.39 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4 讨论

方药量-效关系是反映中医本质特征的科学问题,但因其研究起步比较晚,而且发展较缓慢,现阶段还处于积累经验阶段^[4]。单味药物的量-效关系尚有一些研究,而复方中药的量-效关系研究则举步维艰,针对中药量-效关系的研究方法尚属空白。到目前为止,还没有关于中药或方剂量-效曲线的研究报道^[5],因此,中药的量-效关系研究总体来说尚无明显突破^[6]。究其原因,不但是因为中药的效应成分、作用机制均不清晰,而且中医药的传统观念药量,作为不传之秘占了主导地位,致使中药复方的量-效关系研究成为了难点。

量-效关系的建立离不开合适的数学拟合方法。如尚尔鑫^[7]针对各个高频药物,按照用量分组,统计各功效在不同用量下出现的次数,以此为基础绘制该药物各功效的量-效关系曲线,找出《金匱要略》方药用量与功效变化规律研究;李文林^[8]运用层次聚类法对周仲瑛哮喘病案进行方药量-效关系的研究,得出治疗哮喘方药的大部分剂量范围与《中国药典》中记载的范围一致,但也有部分药物的剂量会因临床治疗需要而在一定的区间内调整。

GraphPad Prism 6 是一种多功能的科学图形计算软件,可以进行数据分析、图表分析以及页面构图等,在中医药研究上运用也越来越广泛。比如在计算 EC_{50} 方面比人工绘图读点法更精确、快捷,并可重现,它能根据量-效关系方程: $Y = Bottom + (Top - Bottom) / \{1 + 10^{[(\text{Log}EC_{50} - X) \times \text{HillSlope}]}\}$; 对数据进行拟合,直接得到量-效曲线和 EC_{50} , 与其他统计学软件相比,该软件在使用过程中无需人工对数据进行标准化或者加权回归,能真实再现实测值,操作简便,结果直观、全面、准确,可广泛用于药物的量-效关系研究和量-效曲线的绘制^[9]。Zheng Chen^[10]等利用 DPPH 清除自由基法测定了槲皮素,儿茶素,抗坏血酸,咖啡酸,绿原酸 5 种药物的抗氧化能力,并利用了 Graph Pad Prism_version 5.01, BLe Sq, Origin Pro 8.5.1, Sigma Plot 12, Bio Data Fit 1.02 和 IBM SPSS Statistics Desktop 19.0 进行 EC_{50} 参数的拟合,结果发现 Graph Pad 中 5 参数相关性分析方法在用于曲线拟合上、 EC_{50} 的计算以及数据处理上都是有效的统计方法。其次还可以用于受体理论以及微生物发酵动力学的研究。如孙华^[11]等利用 Graph Pad 进行受体理论的研究,可以计算出电针对慢性应激抑郁模型大鼠大脑皮层 5-HT₁, 5-HT₂ 受体数量和结合活性。本实验中用此软件进行中药复方多剂量与效应的量-效关系研究,进行非线性拟合,从实验结果来看, MPO 的拟合相关系数 0.821 8, 能够反映出药物曲线呈“S”型,具有指导其他中药复方进行量-效关系研究。除此之外,魏思思^[12]运用聚类分析、对应分析来研究中药赤丹退黄方的量-效关系,也为本课题进一步应用多种方法研究中药量-效关系提供了思路。

[参考文献]

[1] 章军,刘宇政,王跃生,等. HPLC 同时测定葛根苓连

汤中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 58.

- [2] 全小林,焦拥政,连凤梅,等. 方药量效关系研究的关键问题与思考[J]. 环球中医药, 2012, 5(6): 401.
- [3] 张斐,杜武勋,朱明丹,等. 中药复方量效关系研究现状[J]. 中医杂志, 2013, 54(1): 74.
- [4] 孙瑞元. 定量药理与新药评价[M]. 北京:人民军医出版社, 2011.
- [5] 贺德辉. 中药量效关系刍议[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(10): 913.
- [6] 尚尔鑫,段金廛,唐于平. 基于计算模拟的中药及方剂量效关系研究方法概述[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(增刊): 120.
- [7] 段金廛,范欣生,宿树兰,等. 中药及方剂量效关系的研究进展与思考[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(4): 241.
- [8] 尚尔鑫,范欣生,段金廛,等. 《金匱要略》方药用量与功效变化规律研究[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1): 15.
- [9] 李文林,郭立中,吴勉华,等. 层次聚类法对周仲瑛哮喘病案方药量-效关系的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1): 17.
- [10] 于童,白喜云,解晓晶,等. 应用 GraphPad Prism 5.0 (R) 软件计算药物的 EC_{50} [J]. 药学进展, 2012, 36(4): 180.
- [11] Zheng Chen, Riccardo Bertin, Guglielmina Frolidi. EC_{50} estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs [J]. Food Chemistry, 2013, 138: 414.
- [12] 孙华,张有志,韩磊,等. 电针对慢性应激抑郁模型大鼠大脑皮层 5-HT₁, 5-HT₂ 受体数量和结合活性的影响 [J]. 中国针灸, 2003, 23(9): 553.
- [13] 魏思思. 游胆型肝炎治疗药物——赤丹退黄方的“量-效”关系研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[责任编辑 聂淑琴]