

基于正交试验的三拗汤配伍关系研究

汪珊珊¹, 范欣生^{2*}, 徐立^{1*}, 俞晶华³

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046; 3. 南京中医药大学第一临床学院, 南京 210046)

[摘要] **目的:** 基于正交试验, 研究三拗汤的配伍关系。**方法:** 运用正交设计法, 将三拗汤组方药材按 $L_{16}(4^3)$ 正交表配伍分为 16 组。BALB/c 小鼠每组 16 只, 共 256 只, 雌雄各半。采用卵白蛋白(OVA)致敏、激发的方法复制小鼠哮喘模型, 1, 8 d 分别皮下致敏, 第 15 ~ 28 d 5% OVA 溶液雾化激发, 每次雾化前分别 ig 给予相应配伍配比三拗汤水煎液。第 29 天检测气道反应性、血液中 EOS、支气管肺泡灌洗液(BALF)中 EOS 和白细胞总数、肺组织及气管组织病理改变。综合分析各指标优选三拗汤最优配比。验证实验中将 48 只 BALB/c 小鼠分为 3 组, 空白组、模型组、最优配比组, 每组 16 只, 雌雄各半, 以同样的方法造模并检测指标。**结果:** 根据综合评分, 三拗汤的最优配伍配比为麻黄 6g, 杏仁 9 g, 甘草 3 g, 其主次关系为: 麻黄 > 杏仁 > 甘草。验证实验结果, 其气道反应性、血液及 BALF 中 EOS 和白细胞总数、肺及气管病理改变与模型($A_1B_1C_1$)相比有显著差异($P < 0.01$)。**结论:** 三拗汤该配比与临床常用配比相近, 试验所得组方主次关系符合三拗汤组方原则。

[关键词] 三拗汤; 正交试验; 最优配比

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0184-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1213.055.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:13

Study on the Compatibility of San'ao Decoction Based on Orthogonal Experiment

WANG Shan-shan¹, FAN Xin-sheng^{2*}, XU Li¹, YU Jing-hua³

(1. College of Pharmacy Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology of Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

3. The First Clinical of College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the compatibility of San'ao decoction. **Method:** Based on orthogonal design, mice was divided into 16 groups, 16 in each group according to $L_{16}(4^3)$ table. Subcutaneous sensitization was undertaken on day 1 and 8, 5% OVA atomization was applied to stimulate sensitization from day 15 to 28, before which San'ao Decoction with the corresponding compatibility proportion was given. Airway reactivity, the number of eosinophils (EOS) in blood, ESO in BALF, and white blood cells, pathological change of the lung and trachea were detected on the 29th day. To confirm the experiments, 48 mice were divided into 3 groups: blank group, model group and optimum compatibility group with 16 in each. The above mentioned methods and indicators were applied and detected. **Result:** Based on synthetic sores, the optimum of San'ao decoction was as follows: 6 g

[收稿日期] 20120517(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072748); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A02); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

[第一作者] 汪珊珊, 硕士研究生, E-mail: wang1986313@hotmail.com

[通讯作者] * 范欣生, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 从事方剂组方与配伍规律研究, Tel: 025-85811070, E-mail: fanxsh@njutcm.edu.cn, xuliglp@126.com

Ephedrae Herba; 9 g Armeniacae Semen Amarum; and 3 g Radix et Rhizoma Glycyrrhizae. The sequence of priority was like: Ephedrae Herba > Armeniacae Semen Amarum > Radix et Rhizoma Glycyrrhizae. The confirmed experiments showed significant difference ($P < 0.01$) in airway reactivity, the number of EOS in blood, ESO in BALF, and white blood cells, pathological change of the lung and trachea compared with model ($A_1B_1C_1$).

Conclusion: The optimum compatibility proportion of San'ao decoction is similar to that used in clinical practice; and their sequence of priority confirms the compatibility principle of San'ao decoction.

[Key words] San'ao decoction; orthogonal experiment; optimum compatibility proportion

三拗汤出自《太平惠民和剂局方》,由麻黄、杏仁、甘草 3 味药组成。全方具有宣肺平喘,化痰止咳的功效,临床用于感冒风寒、咳嗽气喘、痰多胸闷、头痛鼻塞等症,具有显著功效。前期研究证实三拗汤及类方能抑制卵蛋白致敏哮喘豚鼠、小鼠支气管炎,调节机体免疫力^[1-2]等。近年来,随着中医药研究的深入,方剂配伍问题越来越受到学者们的重视。对中药方剂配伍原理的现代阐释已然成为了中药现代化研究中的一大热点,同时也是一大难点。为了进一步研究三拗汤的配伍关系,本实验结合正交设计,采用 OVA 致敏哮喘小鼠模型,以气道反应性检测,血液细胞学检查、BALF 细胞学检查、病理学评价等,探讨三拗汤的最佳配伍配比,为开展三拗汤的深入研究提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 BALB/c 小鼠,2 批分别为 256 只和 48 只,6~8 周龄,体重 18~22 g,雌雄各半,雌者无孕。购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号 2007000521062,2007000523801。

1.2 药物及试剂 麻黄(批号皖 20100109),苦杏仁(批号皖 20100109),甘草(批号皖 20100109),均购自亳州市永刚饮片有限公司,由南京中医药大学吴德康教授鉴定;各配比三拗汤水煎剂,南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室提供;地塞米松(天津天药药业股份有限公司,批号 100605);OVA(上海伯奥生物科技有限公司,批号 100715);嗜酸性粒细胞计数液(南京建成生物工程研究所,批号 20101123);氯化钠注射液(山东华鲁制药有限公司,批号 B08110807);戊巴比妥钠[中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 F20021216];快速瑞姬氏染液(南京建成科技有限公司,批号 20101123);甲醛(分析纯,南京化学试剂有限公司,批号 09031710212);乙酰胆碱(上海三爱思试剂公司,批号 20060328);其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 S-888F 型超声波雾化器(中外合资南京道芬电子有限公司),Olympus X21 显微镜

(Olympus 公司),RES3OZO 动物呼吸机(北京贝兰博科技有限公司),AniRes 动物肺功能分析系统(北京贝兰博科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型复制及给药 将三拗汤 3 味药:麻黄(A)、杏仁(B)、甘草(C)作为考察因素,各因素分为 4 个水平,按 $L_{16}(4^3)$ 正交设计进行试验。各因素水平见表 1。

表 1 三拗汤 $L_{16}(4^3)$ 正交试验因素水平

水平	A 麻黄/g	B 杏仁/g	C 甘草/g
1	0	0	0
2	3	3	3
3	6	6	6
4	9	9	9

正交试验按 $L_{16}(4^3)$ 正交表将 256 只 BALB/c 小鼠随机分为 16 组,每组 16 只,雌雄各半。于第 1,8 天,每只皮下注射 0.1 mL 致敏液,并 ip 0.1 mL 致敏液(0.2 mL 致敏液含 OVA 0.1 mg,氢氧化铝 0.02 mg),第 15~28 天 5% OVA 溶液雾化激发,每次雾化 20 min。每次雾化前分别 ig 给予相应配伍配比三拗汤水煎剂。选择正交试验中的优选组进行验证实验,BALB/c 小鼠 48 只,随机分为空白组、模型组、三拗汤优选组 3 组,每组 16 只,雌雄各半、造模和给药方法同上。

2.2 指标检测 各组第 29 天分别取 8 只检测气道反应性,另外 8 只进行 BALF 细胞、血液细胞、病理组织学评价。

2.2.1 气道反应性检测 第 29 天小鼠,ip 80 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠麻醉,后应用 AniRes2005 动物肺功能分析系统,采用气管插管和机械通气的有创方法测定小鼠气道反应性变化。步骤如下:①打开肺功能分析系统,将呼吸比设为 10:15,潮气量 5~6 mL·kg⁻¹,呼吸频率设为 90 次/min。②动物疼痛反射消失后,暴露并分离气管,然后置于体描箱操作台上。切开气管,置入套管针并固定。用 4.5 号头皮针行尾静脉穿刺,固定针柄,关闭体描箱。③将乙

酰胆碱 ACh 按质量浓度 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、容积 ($50 \text{ } \mu\text{L}$ /次)尾静脉注射给予小鼠。经过相应软件计算气道反应性,以肺呼气阻力 $\text{Re cm H}_2\text{O}(\text{mL} \cdot \text{s}^{-1})$ 表示。

2.2.2 血液细胞学检查 第 29 天小鼠眼眶取血 1 mL 左右,脱颈椎处死,取出 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 血混匀于 0.38 mL 嗜酸粒细胞(EOS)计数液中,以光学显微镜进行 EOS 计数。

2.2.3 BALF 细胞学检查 取已处死动物,打开胸腔,结扎左支气管肺门部;分离气管,于气管环状软骨下方剪一 V 型切口,插入前端磨平的 2.5 mL 注射器针头,结扎固定,以 1.5 mL NS 分三次灌洗,每次 0.5 mL 。取一滴灌洗液至血细胞计数池中,静置后显微镜下读白细胞总数。 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温下离心 10 min ,吸出多余上清液,取沉淀涂片固定,瑞姬氏染液染色,显微镜下读取 200 个白细胞,统计各类白细胞个数,计算 EOS 所占百分比。结合白细胞总数与 EOS 细胞百分比最终换算得 BALF 中 EOS 细胞数。

2.2.4 病理组织学评价 取小鼠左上肺及气管组织,4% 中性甲醛溶液固定,常规制备病理切片,HE 染色进行病理检测。

2.3 数据分析 正交试验以 SPSS 13.0 统计软件分析。验证实验数据采用 t 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 正交分析 根据 Ach 激发后 Re 的增加值、肺组织病理评分、气管组织病理评分、BALF 中嗜酸性粒细胞数、血中嗜酸性粒细胞数、BALF 中白细胞数等指标对各组疗效进行综合评分。综合评分数据的极差大小显示各因素作用主次为 $A > B > C$ (麻黄 > 杏仁 > 甘草),见表 2。方差分析结果表明,因素 A (麻黄)对疗效的影响具有极显著意义,因素 B (杏仁)、C (甘草)对疗效的影响具有显著意义,见表 3。综合直观分析与方差分析的结果确定三拗汤最佳配伍配比为 $A_3B_4C_2$ 即麻黄 6 g ,杏仁 9 g ,甘草 3 g 。

表 2 不同配比三拗汤对 OVA 致敏哮喘模型正交试验及结果

No.	A	B	C	U Re/cmH ₂ O /mL · s ⁻¹	V 肺病理 评分	W 气管病理 评分	X BALF 中 EOS/10 ⁶ /L	Y 血中 EOS /10 ⁹ /L	Z BALF 白细胞/10 ⁹ /L	I 综合评分
1	1	1	1	6.15	8.00	4.50	5.64	9.75	43.75	85.07
2	1	2	2	5.01	6.00	3.38	5.83	5.38	59.25	69.71
3	1	3	3	4.33	4.25	2.25	9.32	3.13	88.75	70.32
4	1	4	4	4.75	4.00	2.00	6.69	2.00	73.88	60.47
5	2	1	2	5.39	1.50	3.00	2.50	4.13	24.63	48.41
6	2	2	3	6.07	7.13	2.88	2.26	2.63	23.14	56.5
7	2	3	4	5.58	6.38	2.25	1.79	2.75	21.5	50.37
8	2	4	1	4.28	4.83	1.88	4.26	2.88	43.25	50.85
9	3	1	3	3.85	4.38	2.88	2.3	2.50	24.00	43.20
10	3	2	4	3.21	5.75	2.38	3.03	3.25	39.13	46.16
11	3	3	1	3.99	5.25	1.5	2.08	4.00	21.75	42.81
12	3	4	2	3.09	3.63	1.88	1.81	2.75	18.14	34.55
13	4	1	4	4.45	6.38	3.00	2.39	1.13	25.88	47.45
14	4	2	1	5.67	7.50	4.50	2.09	3.63	20.63	60.77
15	4	3	2	3.52	6.38	3.38	1.63	3.25	27.38	46.09
16	4	4	3	3.13	5.38	3.75	1.49	3.50	16.75	42.83
K_1	71.39	56.03	59.87							
K_2	51.53	58.28	49.69							
K_3	41.68	52.40	53.21							
K_4	49.28	47.18	51.11							
R	29.71	11.10	10.18							

注: 各组数据取平均值; $I = (U_i/U_1) \times 25\% + (V_i/V_1) \times 12.5\% + (W_i/W_1) \times 12.5\% + (X_i/X_3) \times 25\% + (Y_i/Y_1) \times 15\% + (Z_i/Z_3) \times 10\%$ 。

表3 方差分析

方差来源	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
麻黄	3	642.152	46.785	<0.01
杏仁	3	93.845	6.837	<0.05
甘草	3	80.993	5.903	<0.05
误差	6	13.725		

注: $F_{0.05}(3,6) = 4.76, F_{0.01}(3,6) = 9.28$ 。

3.2 优选配伍的验证 为验证上述优选配比,对优选配比三拗汤 $A_3B_4C_2$ 及 $A_1B_1C_1$ (模型) 进行验证试验。造模、给药方法和检测指标均同前。结果显示,优选配比三拗汤对各指标均表现出明显改善作用。结果见表4。气道反应性结果见图1,肺组织病理改变见图2,气管组织病变见图3。

表4 验证试验 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	U Re/cmH ₂ O /mL·s ⁻¹	V 肺病理 评分	W 气管病理 评分	X BALF 中 EOS/10 ⁶ /L	Y 血中 EOS /10 ⁹ /L	Z BALF 白细胞数 /10 ⁶ /L
空白	-	0.93 ± 0.19 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.04 ± 0.07 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	19.63 ± 5.58 ²⁾
模型 ($A_1B_1C_1$)	-	4.61 ± 2.76	7.50 ± 2.60	5.25 ± 1.30	3.98 ± 1.97	11.63 ± 4.17	29.88 ± 3.68
三拗汤 ($A_3B_4C_2$)	3.6	1.11 ± 0.67 ²⁾	2.50 ± 0.78 ²⁾	1.13 ± 0.45 ²⁾	1.60 ± 0.60 ²⁾	2.63 ± 1.19 ²⁾	19.5 ± 8.62 ²⁾

注:与模型 ($A_1B_1C_1$) 组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

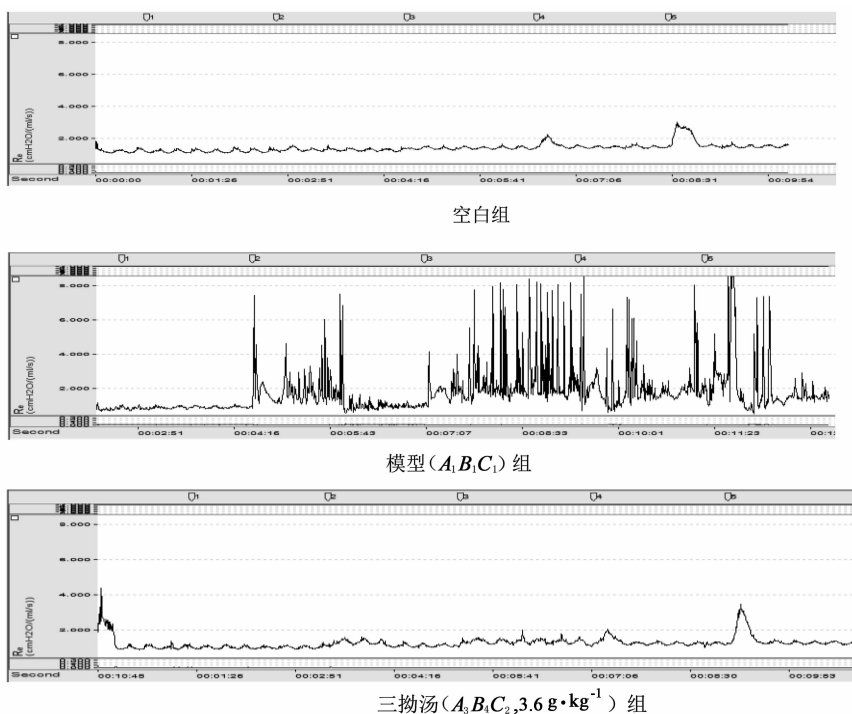


图1 最优配比三拗汤对 Re 曲线的影响

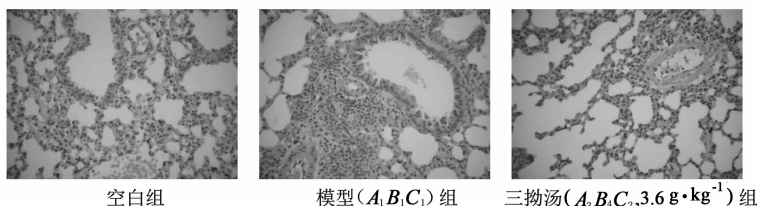


图2 各组小鼠肺组织病理学改变 (HE, ×200)

4 讨论

三拗汤及类方在临床呼吸系统疾病的治疗中广为应用,是为经典。这也使得三拗汤成为很多实验

研究的热点,前期的研究成果也很丰硕,在疗效、作用机制、物质基础等多个方面都有所阐释。

近年来,随着中药医研究的深入,实验设计优化

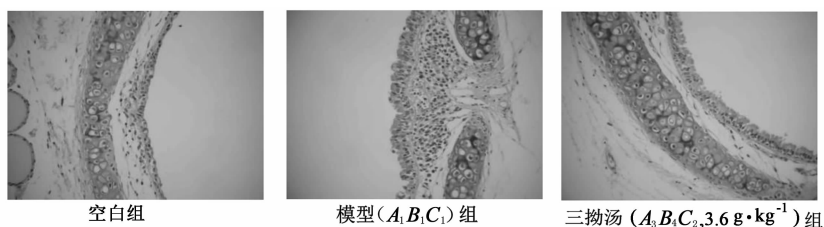


图 3 各组气管组织病理学改变(HE, ×200)

方法逐渐运用到中医药研究中来^[3],应用比较多的试验设计法包括正交设计法^[3]。正交设计具有“整齐可比”、“均匀分散”的优点,能大大减少试验次数,使得一个试验的次数从全面试验的 q^s 次减少到 q^2 次(因素数为 s ,水平数为 q)。本研究试图运用正交设计的方法观察三拗汤的配伍关系,寻找最优配伍配比。

以不同的指标检测结果作为考察指标时,优选出的配伍配比有时并不一致。中药作用时有“多靶点”的特点,其往往是通过调节机体的多个方面而达到治疗效果。这就使得试验设计时试验指标的确定复杂化,选择不同的指标可能使“最优”药物的剂量与配比不同。针对这一点,本研究运用权重估计的方法对多指标实验结果进行了综合分析。

首先结合哮喘机制赋予各指标权重系数。哮喘是一种气道慢性炎症性疾病,主要特征性是气道高反应性和以嗜酸性粒细胞浸润为主的慢性气道炎症。气道高反应性是哮喘的重要特征之一,气道反应性的高低可以直接反映支气管哮喘的严重程度,因此气道高反应性测定不仅可以作为排除或确定哮喘诊断的有力依据,也可用于评估哮喘病情轻重^[7],故其占综合评分的权重为 25%。嗜酸性粒细胞在哮喘和气道高反应性中起了很重要的作用,激活的嗜酸性粒细胞浸润气道是哮喘炎症的重要特征^[8],是哮喘的特征性改变,故其占综合评分的权重为 25%。肺及气管组织病理改变是较直观的反映哮喘器质性病变和评价哮喘严重程度、药物治疗效果的指标,故肺及气管组织病理改变占 25%。血液中嗜酸性粒细胞的改变也能反映哮喘的严重程度,但不及 BALF 中嗜酸性粒细胞改变准确、敏感^[6],故其权重系数为 15%。BALF 中白细胞数量能够反映哮喘的支气管炎,但是这一指标特异性不强,如慢性阻塞性肺疾病也会出现气道炎细胞浸润^[9],故占 10%。

综合直观分析与方差分析的结果确定三拗汤最佳配伍配比为麻黄 6 g,杏仁 9 g,甘草 3 g,这与临床常用配比剂量相近。综合评分数据的极差大小显示各因素作用主次为麻黄 > 杏仁 > 甘草,这为三拗汤、麻黄为君、杏仁为臣、甘草为佐使的组方原则提供了佐证。验证试验亦显示,优选配比三拗汤对哮喘模型各指标均表现出明显改善作用。

[参考文献]

- [1] 冯里,徐立,范欣生,等. 三拗汤及类方挥发油对卵蛋白致敏哮喘豚鼠模型的效应评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(5):35.
- [2] 纪蕾蕾,徐立,范欣生,等. 三拗汤及类方对卵蛋白致敏豚鼠哮喘模型引喘潜伏期及其 EOS 的影响[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(6):391.
- [3] 栾军. 现代试验设计优化方法[M]. 上海:上海交通大学出版社,1995:2.
- [4] 贾晓斌,黄洋,陈斌,等. 药效学结合正交试验优选通脉颗粒抗心肌缺血成分的提取工艺研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):154.
- [5] 余林中,伍杰勇,罗佳波,等. 葛根苓连汤配伍与解热药效关系研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(7):663.
- [6] 梅爱敏,范文亮,任立群,等. 泽泻汤加味方最佳组方配伍降压作用机制的研究[J]. 山东医药,2012,52(8):62.
- [7] 刘春涛,王刚,王雅敏,等. 气道反应性监测对哮喘联合治疗方案调整的指导意义[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,7:498.
- [8] 林江涛,殷凯生. 哮喘防治新进展专题笔谈[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:23.
- [9] 崔健德. 加强对支气管哮喘和慢性阻塞性肺疾病本质及一同的认识,提高治疗效果[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(6):361.

[责任编辑 聂淑琴]