

◆实验研究◆

基于响应面分析法的肾气丸组方优化研究

汪玉梅, 高洁, 李政木, 张旭倩, 陈南迪, 陈功成, 张玉敏, 江淑霞

广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 优化肾气丸组方的最佳剂量配比, 为临床有效地运用肾气丸防治疾病提供可靠依据。方法: 将昆明种小鼠随机分为19组, 每组10只。按响应面设计方案, 其中17组为中药组, 其余2组为空白组及模型组。小鼠在适应性喂养1周后, 除空白组小鼠外, 其余组小鼠均每天腹腔注射氢化可的松注射液 25 mg/(kg·d) 制造肾阳虚小鼠模型, 连续10 d。同时中药组灌胃给予肾气丸中药水煎液, 空白组、模型组给予等体积生理盐水, 连续给药20 d。观察各组小鼠肾阳虚临床症状变化情况, 以及血清中促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇 (COR) 的含量变化。结果: 模型组与各中药治疗组比较, 自主活动明显减少, 畏寒显著, 多尿症状明显, 且血清 ACTH 和 COR 含量显著低下。通过优化并进行验证实验, 小鼠肾气丸最佳使用剂量为肉桂、附子各 0.15 g, 干地黄 0.56 g, 山药、山茱萸各 0.28 g, 牡丹皮、泽泻、茯苓各 0.42 g。结论: 肾气丸原方剂量相对偏低, 若将肾气丸组方中肉桂、附子、牡丹皮、泽泻、茯苓剂量增加1倍, 干地黄、山药、山茱萸保持不变, 即肾气丸中各药物配伍比例调整为: 附子: 肉桂: 干地黄: 山药: 山茱萸: 牡丹皮: 泽泻: 茯苓为 2:2:8:4:4:4:6:6:6, 其对肾上腺皮质功能低下的调节作用更加显著, 温补肾阳作用最佳。

[关键词] 肾气丸; 响应面分析法; 组方优化; 肾阳虚模型; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2016) 08-0292-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.08.130

Component Optimization Study of Shenqi Wan Based on Response Surface Analysis

WANG Yumei, GAO Jie, LI Zhengmu, ZHANG Xuqian, CHEN Nandi,
CHEN Gongcheng, ZHANG Yumin, JIANG Shuxia

Abstract: Objective: To optimize optimum dose matching of Shenqi wan component, and provide reliable evidence for preventing and treating disease with Shenqi pill clinically. Methods: Divided Kunmin mouse into 19 groups randomly, 10 cases in each group. Designed scheme as per response surface, set 17 groups as Chinese medicine (CM) group, other two groups set as blank group and model group. All the mice were fed adaptive for 1 week. Except mice in blank group, mice in all of the other group were injected hydrocortisone 25 mg/(kg·d) intraperitoneally to make kidney- yang deficiency model for 10 consecutive days. At the same time, CM groups were gavaged Shenqi wan, blank group and model group were given isovolumetric normal saline, successive medication for 20 days. Observed changes of kidney- yang deficiency clinical symptom, and content changes of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol (COR) in serum. Results: Comparing with CM group, locomotor activity in model group was decreased obviously, intolerance of cold and polyuria symptom was obvious, and contents of ACTH and COR in serum were decreased significantly. By optimization and verify experiment, Shenqi wan optimal dose as follows: cinnamon and radix aconiti carmichaeli were 0.15g respectively, dried rehmannia was 0.56 g, yam and dogwood were 0.28 g respectively, moutan bark, rhizoma alismatis and poria cocos were 0.42g respectively. Conclusion: The Shenqi wan dose in original prescription is low relatively. If contents of cinnamon, radix aconiti carmichaeli, moutan bark, rhizoma alismatis and poria cocos are double, content of dried rehmannia, yam and dogwood remain are unchanged, that is, drugs compatibility proportion in Shenqi wan is adjusted to the following: radix aconiti

[收稿日期] 2016-03-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (30572295)

[作者简介] 汪玉梅 (1978-), 女, 讲师, 研究方向: 方剂配伍规律研究。

[通讯作者] 李政木, E-mail: lzm@gzucm.edu.cn.

carmichaeli : cinnamon : dried rehmannia : yam : dogwood : moutan bark : rhizoma alismatis : poria cocos be 2 : 2 : 8 : 4 : 4 : 6 : 6 : 6. The regulating effect of above prescription on adrenal cortex hypofunction are more significant , effect on warming and invigorating kidney yang are optimal.

Keywords : Shenqi wan ; Response surface analysis ; Component optimization ; Kidney- yang deficiency model ; Animal experiment ; Mice

金匱腎氣丸源于东汉医家张仲景所著《金匱要略》一书,其原名为“崔氏八味丸”“八味腎氣丸”“腎氣丸”,现多直接称为“腎氣丸”。原方由“干地黄(八两),山茱萸(四两),薯蕷(四两),泽泻(三两),茯苓(三两),牡丹皮(三两),桂枝(一两),附子(炮,一两)”八味药物组成,功在温补腎阳,化生腎气,主治腎阳不足证。柯琴评论该方曰:“腎氣丸纳桂、附于滋阴剂中十倍之一,意不在补火,而在微微生火,即生腎气也,故不曰温腎,而名腎气。”但后世在使用腎气丸治疗腎阳不足所致的各类疾病时,对原方药物及其剂量多有变更,尤其是加大原方药物剂量。本实验首先建立腎阳虚小鼠模型,然后给予腎气丸药物不同配比剂量灌胃治疗,以小鼠血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(COR)含量变化为观察指标,采用响应面分析法开展腎气丸组方优化研究,寻找腎气丸组方的最佳配比剂量,为临床更有效地运用腎气丸提供可靠依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 昆明种小鼠 190 只,合格证编号:4405900021;许可证号:scxk(粵)2008-0020,雄性,体重 20 ± 2 g,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 实验药材 腎气丸组方中药材(购买于广东省中医院,经广州中医药大学中药鉴定教研室张丹雁教授鉴定为正品);氯化钠注射液(广东大冢制药有限公司生产,国药准字H44020185);氢化可的松注射液(天津金耀氨基酸有限公司生产,国药准字H12020887)。

1.3 主要试剂 小鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)ELISA 试剂盒(美国 RB Rapidbio 公司);小鼠皮质醇(COR)ELISA 试剂盒(美国 RB Rapidbio 公司)。

1.4 实验器材 AEG-220 电子分析天平(日本岛津仪器有限公司);日立 CR22G 低温高速离心机;PerkinElmer X5 多功能免疫分析仪(美国 PE 公司);Biotek Elx50 洗板机(美国 Biotek 公司);DT5-3 低速台式自动平衡离心机(北京时代北利公司)。

2 实验方法

2.1 实验设计 按响应面分析因素及水平表进行实验设计。选择(肉桂+附子) X_1 、(干地黄+山药+山茱萸) X_2 和(牡丹皮+泽泻+茯苓) X_3 三个因素为自变量,以低剂量(-1)、中剂量(0)、高剂量(1)为三个水平,以小鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(COR)含量为响应值(Y),根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,采用三因素三水平的响应面分析方法,实验设计因素及水平见表 1。

表 1 响应面分析因素及水平

因素	水平		
	-1	0	1
(肉桂+附子)/g X_1	0.08	0.14	0.3
(干地黄+山药+山茱萸)/g X_2	0.64	1.12	2.4
(牡丹皮+泽泻+茯苓)/g X_3	0.36	0.63	1.35

2.2 动物处理 将小鼠随机分为 19 组,每组 10 只。按响应面设计方案,其中 17 组为中药组,另外 2 组为空白组及模型组。小鼠在适应性喂养 1 周后,除空白组小鼠外,其余组小鼠均每天腹腔注射氢化可的松注射液 25 mg/(kg.d)制造腎阳虚小鼠模型^[1],连续 10 d。同时中药组灌胃(药量按动物和人的剂量估换公式法折算^[2])给予中药水煎液,空白组、模型组给予等体积生理盐水,连续给药 20 d。按照响应面实验设计表,精密称取腎气丸相应剂量,水煎,并浓缩,于 4℃ 冰箱保存。于给药后的第 21 天上午 8 时,摘除小鼠眼球,取血 0.3 mL,置离心管内静置 1 h,离心 10 min,转速 4000 r/min,取上层血清,存于 -20℃ 冰箱待测。

2.3 统计学方法 用 Design Expert V.8.0.5b 统计软件对实验数据进行统计学分析。

3 观测指标

3.1 腎阳虚临床指标 体重下降、体温下降、活动减少、反应迟钝、弓背蜷缩、畏寒、体毛枯疏、失去光泽、采食量及饮水量减少、多尿等症^[3]。

3.2 血清指标检测 用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测小鼠血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(COR)的含量,实验操作严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

4 实验结果

4.1 一般状况 与空白组比较,模型组及各中药组在予氢化可的松注射液腹腔注射 5 天后,均开始出现精神萎靡、活动减少、弓背蜷缩、畏寒、体毛枯疏、失去光泽、多尿等症状。与各中药治疗组比较,模型组自主活动明显减少,畏寒显著,多尿症状明显。空白组小鼠体重增加幅度明显高于模型组及各中药组,各组小鼠治疗前后体重变化见表 2。

4.2 响应面分析方案及实验结果 见表 3。按实验设计表 1 中响应面分析因素及水平表进行实验。

4.3 多元二次响应面回归模型的建立与分析 用 Design Expert 统计软件对表 3 中的实验数据进行统计学分析,ACTH

表2 各组小组治疗前后体重变化

实验编号	治疗前(g)	治疗后(g)
中药 1 组	18.22± 1.07	29.00± 3.69
中药 2 组	17.86± 1.06	25.59± 5.27
中药 3 组	19.00± 1.11	25.91± 3.95
中药 4 组	18.60± 1.41	32.06± 4.47
中药 5 组	17.06± 1.32	29.24± 3.95
中药 6 组	16.87± 0.93	26.60± 3.36
中药 7 组	17.91± 1.31	26.78± 3.96
中药 8 组	16.65± 1.00	28.30± 2.10
中药 9 组	18.18± 1.61	25.88± 5.36
中药 10 组	17.24± 1.37	26.48± 2.42
中药 11 组	17.02± 1.18	24.38± 2.84
中药 12 组	17.82± 1.39	31.24± 2.72
中药 13 组	17.39± 1.52	24.53± 5.64
中药 14 组	17.66± 0.72	26.19± 2.85
中药 15 组	18.11± 1.14	25.08± 1.98
中药 16 组	18.12± 1.02	32.10± 2.08
中药 17 组	17.21± 1.19	28.46± 2.89
空白组	18.70± 1.62	34.43± 1.91
模型组	17.84± 1.65	26.61± 2.63

表3 响应面分析方案及实验结果

实验分组	因素水平(X)			响应值(Y)	
	(肉桂+附子)	(干地黄+山药)	(牡丹皮+泽泻)	(ACTH)pg/mL	(COR)ng/mL
	/g X ₁	+山茱萸/g X ₂	+茯苓/g X ₃		
中药 1 组	-1	-1	0	8.14	9.80
中药 2 组	1	-1	0	8.55	10.09
中药 3 组	-1	1	0	6.37	7.67
中药 4 组	1	1	0	9.47	11.20
中药 5 组	-1	0	-1	8.17	9.83
中药 6 组	1	0	-1	8.96	10.18
中药 7 组	-1	0	1	9.31	11.20
中药 8 组	1	0	1	7.60	9.15
中药 9 组	0	-1	-1	9.57	11.52
中药 10 组	0	1	-1	9.43	11.35
中药 11 组	0	-1	1	11.10	13.25
中药 12 组	0	1	1	11.16	12.43
中药 13 组	0	0	0	8.04	9.68
中药 14 组	0	0	0	6.64	7.59
中药 15 组	0	0	0	7.47	8.99
中药 16 组	0	0	0	6.74	8.01
中药 17 组	0	0	0	7.32	8.81
空白组				12.09	13.18
模型组				6.09	6.93

注：共有 19 个实验，其中 17 组中药组中，12 个为析因实验，5 个为中心实验以估计误差。

模型分析结果见表 4，COR 模型分析结果见表 5。

表4 ACTH 多种模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率>F	Suggested
平均模型 VS 总计	1220.44	1	1220.442			
线性模型 VS 平均模型	2.10	3	0.700608	0.30	0.8248	
双因素模型 VS 线性模型	3.38	3	1.127175	0.42	0.7440	Suggested
二次方程 VS 双因素	21.62	3	7.205966	9.43	0.0074	Aliased
三次方程 VS 二次方程	4.04	3	1.347008	4.12	0.1027	
剩余方差	1.31	4	0.32732			
总计	1252.89	17				

表5 COR 多种模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	概率>F	Suggested
平均模型 VS 总计	1715.03	1	1715.033			Suggested
线性模型 VS 平均模型	2.31	3	0.769042	0.25	0.8587	
双因素模型 VS 线性模型	4.17	3	1.390008	0.39	0.7621	
二次方程 VS 双因素	28.24	3	9.412206	9.02	0.0084	Suggested
三次方程 VS 二次方程	4.57	3	1.523842	2.23	0.2267	Aliased
剩余方差	2.73	4	0.68238			
总计	1757.05	17				

通过模型分析，建立 ACTH 的多元二次响应面回归模型，得拟合方程：

$$Y = 14.32213 + 16.55723X_1 - 6.84099X_2 - 9.26621X_3 + 6.94731X_1X_2 - 11.47842X_1X_3 + 0.11478X_2X_3 - 37.78926X_1^2 + 1.74038X_2^2 + 7.04112X_3^2$$

其中，Y 是效应值促肾上腺皮质激素(ACTH)含量，X₁、X₂和 X₃ 为自变量，即(肉桂+附子)X₁、(干地黄+山药+山茱萸)X₂和(牡丹皮+泽泻+茯苓)X₃。各因素与指标之间不是简单的线性关系，而是二次关系。以上述拟合的数学模型为基础，描绘了等高线图和自变量对因变量的三维响应面图。分别将其中一个因素固定在中心值，以促肾上腺皮质激素(ACTH)含量对另外两个因素描绘三维图，见图 1-6。

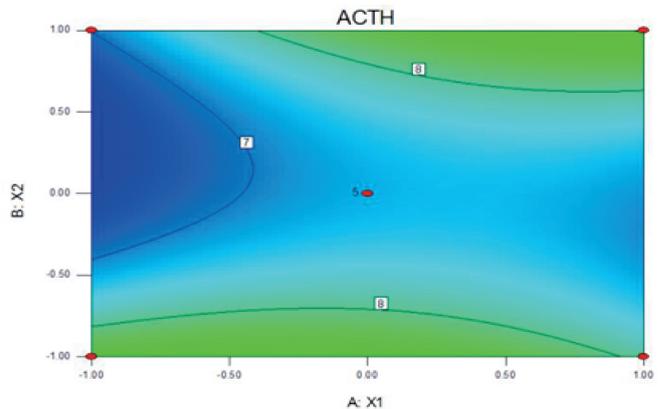


图1 y=f(X₁, X₂) 的等高线图 (X₃=0)

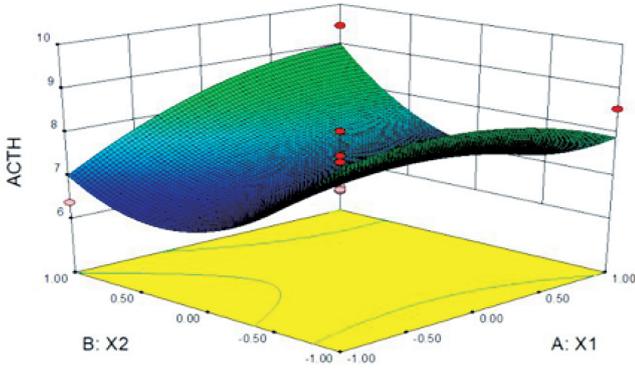


图2 $y=f(X_1, X_2)$ 的响应面图 ($X_3=0$)

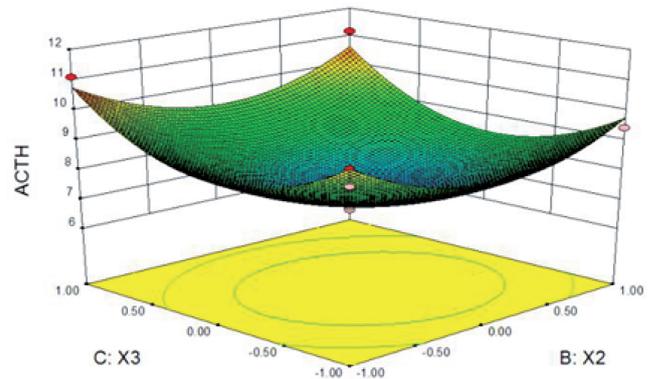


图6 $y=f(X_2, X_3)$ 的响应面图 ($X_1=0$)

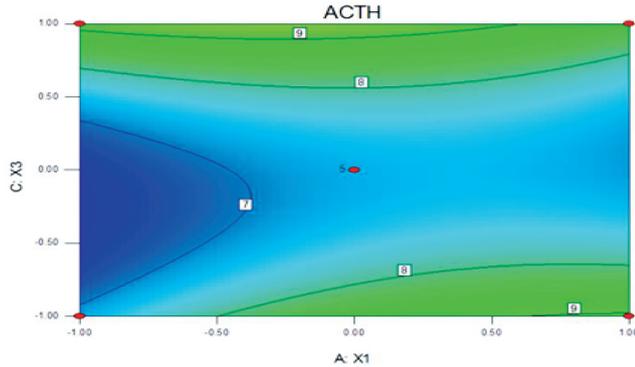


图3 $y=f(X_1, X_3)$ 的等高线图 ($X_2=0$)

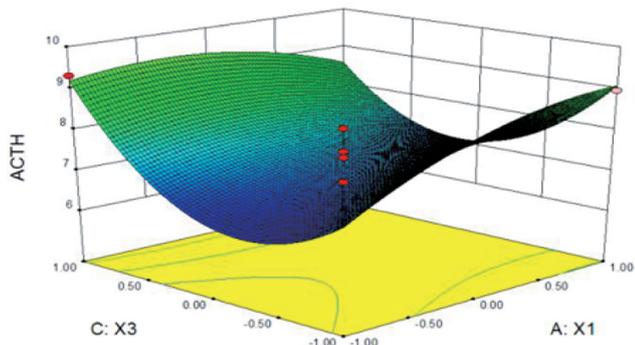


图4 $y=f(X_1, X_3)$ 的响应面图 ($X_2=0$)

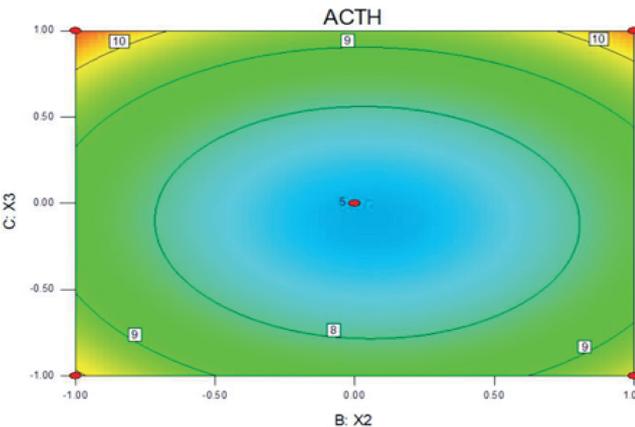


图5 $y=f(X_2, X_3)$ 的等高线图 ($X_1=0$)

通过模型分析，建立 COR 的多元二次响应面回归模型，得拟合方程：

$$Y=17.10794+14.39793X_1-7.68334X_2-10.22769X_3+8.36777X_1X_2-11.01928X_1X_3-0.37305X_2X_3-40.22727X_1^2+2.01543X_2^2+8.00224X_3^2$$

其中，Y 是效应值皮质醇(COR)含量， X_1 、 X_2 和 X_3 为自变量，即(肉桂+附子) X_1 、(干地黄+山药+山茱萸) X_2 和(牡丹皮+泽泻+茯苓) X_3 。各因素与指标之间不是简单的线性关系，而是二次关系。经分析计算后可知，小鼠肾气丸最佳使用剂量 X_1 为 0.256 g， X_2 为 1.435 g， X_3 为 1.160 g。在此条件下，取得的小鼠血清 ACTH 含量为 12.8137 pg/mL，COR 含量为 14.4529 pg/mL。考虑到实际应用及方差分析结果，确定小鼠肾气丸最佳使用剂量为：肉桂、附子各 0.15 g，干地黄 0.56 g，山药、山茱萸各 0.28 g，牡丹皮、泽泻、茯苓各 0.42 g。并按此条件进行验证实验，测得小鼠血清 ACTH 含量为 12.02 pg/mL，COR 含量为 13.63 pg/mL。根据实验结果，并结合临床实际应用情况，以及普通高等教育中医药类规划教材《方剂学》书本记载：肉桂、附子各 3 g，干地黄 24 g，山药、山茱萸各 12 g，牡丹皮、泽泻、茯苓各 9 g，推断若将肾气丸组方中肉桂和附子剂量增加 1 倍，干地黄、山药、山茱萸保持不变，牡丹皮、泽泻、茯苓亦增加 1 倍，即肾气丸中各药物配伍比例调整为：附子：肉桂：干地黄：山药：山茱萸：牡丹皮：泽泻：茯苓为 2：2：8：4：4：6：6：6，其对肾上腺皮质功能低下的调节作用更加显著，温补肾阳作用最佳。

4 讨论

本实验对肾气丸进行组方优化研究旨在优化组方的剂量及配比，不改变药物组成。实验运用糖皮质激素氢化可的松建立小鼠肾阳虚模型，根据肾气丸不同剂量对比对肾阳虚小鼠临床症状、血清 ACTH 和 COR 含量的改善情况，来寻找肾气丸温补肾阳作用的最佳配比剂量。研究结果发现，肉桂和附子剂量增加 1 倍，干地黄、山药、山茱萸保持不变，牡丹皮、泽泻、茯苓亦增加 1 倍，即附子、肉桂、干地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、泽泻、茯苓的比例为 2：2：8：4：4：6：6：6，其

对肾阳虚小鼠肾上腺皮质功能低下状况改善明显,温补肾阳作用最佳。该结果与古文献中记载的肾气丸衍化方作用相一致,在众多肾气丸衍化方中,肉桂及附子的剂量均较原方剂量有所增加,以便更好地发挥其温补肾阳之功。考虑剂量及配比发生改变的可能原因:①温补肾阳作用目的的强化。自晋至宋时期对肾气丸的衍化来看,该方已逐渐从补肾气衍变为温补肾阳的方剂。明代开始,众医家逐渐将金贵肾气丸奉为温补肾阳之代表方。普通高等教育中医药类规划教材五版及六版教材均将该方列入补阳药类,作用为“补肾助阳”,主治“肾阳不足证”。正所谓“量随证变,效由量生”,因此,该方的剂量及配比发生一定变化是合理的。②药材质量的变化。药材质量好坏是产生临床疗效的关键所在,但随着生态环境的改变,或者炮制方法的不同,药材质量也在不断发生变化,为达到良好的治疗效果,组方药物剂量发生改变,而不是固守原方剂量。③剂型的改变。《金匱要略》中记载肾气丸用法为“上为细末,炼蜜为丸,如梧桐子大,酒下为十五丸,日再服”,现多用汤剂

入药。剂型上的改变,对组方中有效成分的溶出产生一定影响,如作为肉桂的主要有效成分桂皮醛,因其具有挥发性,因而随着药物的不断加热煎煮,其含量将会受到影响,其药理作用同时发生改变,故对临床疗效亦产生一定影响。故此,为达到良好的临床治疗功效,将肾气丸剂量及配比进行优化是必要的。

[参考文献]

- [1] 高洁,李政木,黎同明,等.从拆方肾气丸对肾阳虚模型大鼠HPA轴的影响初探“阴中求阳”配伍机理[J].四川中医,2007,25(7):15-17.
- [2] 陈奇.中药药理学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33.
- [3] 沈自尹.中医虚证辨证参考标准[J].中西医结合杂志,1986(2):117.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠血清雌、孕激素的影响

胡树名¹,王磊²,田莉²,杜敏²

1. 甘肃中医药大学,甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院,甘肃 兰州 730050

[摘要] 目的:观察安坤种子丸对胚泡着床障碍小鼠血清雌、孕激素影响,探讨其对胚泡着床障碍小鼠子宫内膜容受性的影响及其机制。方法:将有规律动情周期的雌性小鼠随机分为正常组、模型组和中药组,每组25只。先用安坤种子丸对中药组小鼠进行灌胃,雌、雄合笼后观察雌鼠阴栓情况,之后各组选取有阴栓者20只并计为妊娠第1天(D1),雄鼠及其余雌鼠剔除。妊娠第4天对中药组和模型组小鼠颈背部皮下注射米非司酮,制成胚泡着床障碍模型;于妊娠第5、6天处死小鼠,留取血清标本。采用放射免疫法检测血清雌激素(E₂)和孕激素(P)的含量;同时制备HE切片以观察各组小鼠子宫内膜形态结构的变化,分析并统计观察各组平均着床胚泡数的变化。结果:安坤种子丸可以提高胚泡着床障碍小鼠血清E₂、P水平,中药组平均着床胚泡数虽低于正常组,但显著高于模型组,差异均有统计学意义(P<0.01)。结论:安坤种子丸可以通过提高雌鼠血清E₂、P水平,一定程度上改善着床障碍小鼠子宫内膜容受性,促进胚泡着床。

[关键词] 子宫内膜容受性;胚泡着床;雌激素;孕激素;安坤种子丸;动物实验;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415(2016)08-0296-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.08.131

不孕症是妇科的常见病之一,近年来,不孕症的发病率显著上升,这不仅成为一个严重的医学问题,更是当今社会关注的焦点问题。虽然人类辅助生殖技术(assisted reproductive techniques, ART)迅速发展,日渐成熟,但尚存在着低种植率

及低妊娠率的问题。影响妊娠率的因素,除了胚胎的质量外,子宫内膜容受性(endometrial receptivity, ER)也起着至关重要的作用。子宫内膜容受性是指子宫内膜处于一种允许囊胚定位、黏附、侵入,并使子宫内膜间质发生改变,促进胚胎着床

[收稿日期] 2016-02-28

[基金项目] 甘肃省自然科学基金课题(1308RJZA126)

[作者简介] 胡树名(1972-),男,讲师,研究方向:病理学与病理生理学。