

基于响应曲面分析法的不同配比桃仁-大黄活血化癥效应相互作用研究

颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 邓 肿, 张 岗, 沈 霞

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要:目的 比较评价桃仁-大黄药对(PS-RRR)不同配比对急性血瘀模型大鼠血液流变学和凝血功能的影响,揭示 PS-RRR 活血化癥效应相互作用的范围、性质与程度。方法 采用冰水浴与注射盐酸肾上腺素方法复制大鼠急性血瘀模型,给予不同配比(0:1、1:5、2:5、2:3、1:1、3:2、5:2、5:1、1:0) PS-RRR 后,通过测定全血黏度(WBV)、血沉(ESR)、红细胞聚集指数(EAI)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT),观察其对血瘀大鼠血液流变学、凝血指标的影响。采用响应曲面分析法和多指标综合指数法对 PS-RRR 不同配比的总活血化癥效应进行综合比较分析。结果 PS-RRR 配比在 2:3~3:2 表现出明显的协同作用(协同作用强度为-0.8);在桃仁(PS)剂量 5.5~10 g,大黄(RRR)剂量 2.1~5.8 g,表现出拮抗作用(拮抗作用强度最大为 0.6);而其他比例并未表现出明显的协同或者拮抗作用。结论 初步揭示了 PS-RRR 活血化癥效应相互作用的范围、性质与程度,且 PS-RRR 活血化癥作用的最佳配比与临床中医方剂中使用 PS-RRR 配比 1:1 频次最高的结论相一致。

关键词: 桃仁; 大黄; 配比; 活血化癥; 响应曲面分析法; 相互作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3560-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.017

Based on response surface analysis study of *Persicae Semen-Rhei Radix et Rhizoma* interaction effects of different compatibility of promoting blood circulation to remove blood stasis

YAN Yong-gang, WANG Hong-yan, YIN Li-min, DENG Chong, ZHANG Gang, SHEN Xia

College of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To evaluate *Persicae Semen-Rhei Radix et Rhizoma* (PS-RRR) of different compatibility of acute blood stasis rats blood rheology and blood coagulation function, and to reveal the effect of PS-RRR for promoting blood circulation to remove blood stasis effect scope, nature, and degree of interaction. **Methods** With ice water bath and injected adrenaline hydrochloride copy of acute blood stasis rats model, different ratio (0:1, 1:5, 2:5, 2:3, 1:1, 3:2, 5:2, 5:1, and 1:0) of different concentration of PS-RRR was given for later. Through the determination of whole blood viscosity (WBV), blood sedimentation (ESR), erythrocyte aggregation index (EAI), prothrombin time (PT), partial thrombin (APTT), fibrinogen (FIB) content of coagulation, thrombin time (TT), and the blood rheology of blood stasis rats was observed, the influence of the blood coagulation indexes. Then response surface analysis and multi-index comprehensive index method of PS-RRR different compatibility of promoting blood circulation was used to remove blood stasis effect comprehensive comparative analysis. **Results** The ratio of PS-RRR between 2:3 to 3:2 showed obvious synergy (strength of synergy: -0.8); In PS dose from 5.5—10 g and RRR dose from 2.1—5.8 g area showed the antagonism function (antagonism effect strength maximum: 0.6); While other percentage did not show obvious synergy or antagonism. **Conclusion** The results of reveal that scope, nature, and degree of PS-RRR for promoting blood circulation to remove blood stasis interaction effect, the and its prescriptions of traditional Chinese medicine (TCM) and clinical use of PS-RRR 1:1 is consistent with the highest frequency of conclusion. PS-RRR provides scientific basis for clinical applications.

Key words: *Persicae Semen*; *Rhei Radix et Rhizoma*; compatibility; blood circulation and dissipating blood stasis; response surface analysis; interaction effect

收稿日期: 2017-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901970); 陕西省教育厅项目(14JK1204); 陕西省教育厅重点实验室项目(13JS030)

作者简介: 颜永刚(1978—), 男, 陕西咸阳市人, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中药品种、品种与资源开发及中药物质基础和质量标准研究。Tel: (029)38185165 E-mail: yunfeng828@163.com

桃仁与大黄配伍是临床常用的活血化癥药对, 2味药均有活血化癥之效。桃仁(*Persicae Semen*, PS)苦甘而平, 性柔润, 入血分之品, 善破血行癥, 又润燥滑肠; 大黄(*Rhei Radix et Rhizoma*, RRR)苦寒, 性刚燥, 既可泄热毒、破积滞, 治实热便秘, 也能入血分, 活血通经, 破一切癥血, 治疗癥热互结之蓄血。2药配对, 刚柔相济, 大黄得桃仁, 专入血分, 共奏破血积、下癥血之功。在许多活血化癥类方剂如抵当汤、抵当丸与桃核承气汤等都含有桃仁-大黄药对(PS-RRR)^[1]。现代药理研究表明, PS、RRR均有明显的抗凝血和改善血液流变学作用^[2-8]。而PS、RRR 2药配伍后, 其活血化癥作用是产生相加性、协同性, 还是拮抗性, 缺乏现代研究分析^[9-11]。鉴于此, 本研究在前期研究基础上, 设置不同配比PS-RRR, 以及PS、RRR单味药的不同剂量, 观察2药配伍后对急性血癥大鼠的血液流变学、凝血功能的影响。以多指标综合指数法对各指标进行整合, 采用响应曲面分析法对整合结果进行分析, 应用非线性回归的方法确定量效曲线的各个参数, 建立三维响应曲面模型, 应用Matlab软件构建响应曲面的三维图形^[12], 以期揭示PS-RRR活血效应相互作用的范围、性质与程度, 探讨PS-RRR发挥活血化癥功效的基本规律, 以便为其临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD大鼠, 雌雄各半, 体质量(270±20)g, 由第四军医大学实验动物中心提供, 许可证号SCXK-(军)2012-0007。

1.2 药材

PS、RRR药材均购于甘肃省宕昌县, 经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定, PS为蔷薇科植物山桃*Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子, RRR为蓼科植物药用大黄*Rheum officinal* Baill. 的干燥根和根茎。按《中药炮制学》的桃仁、大黄项下炮制要求^[13], 分别炮制成炒桃仁和酒制大黄饮片。

1.3 试剂

盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司, 批号10140402); 肝素钠(南京新百药业有限公司, 批号55656c); 娃哈哈纯净水(批号20150702, 杭州娃哈哈集团有限公司); 95%乙醇(天津市天力化学试剂有限公司); 复方丹参片(通化长城药业股份有限公司, 批号120202)。

1.4 仪器

LG-R-80A全自动血液流变学仪、LG-PABER-1型血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司); TDL80-2B离心机(上海安亭科学仪器厂); 仪表恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司); GB204型电子天平(德国赛多利斯公司)。

2 方法

2.1 药物制备

基于响应曲面法分析药物相互作用要求, 按均匀设计法按PS与RRR 9种不同质量比(0:1、1:5、2:5、2:3、1:1、3:2、5:2、5:1、1:0)称取RRR和PS, 混合, 共9份, 每份共500g, 均用8倍量的水进行热回流提取1h, 自然冷却后, 倾出水煎液, 加入6倍量的水进行再次热回流提取1h, 滤过, 倾出水煎液, 自然冷却后, 合并水煎液进行70℃水浴浓缩至相当于生药1g/mL, 冷藏备用。

2.2 模型复制

大鼠sc给予盐酸肾上腺素注射液0.8mg/kg, 共2次, 间隔时间为4h, 第1次给予盐酸肾上腺素2h后将大鼠置于0~2℃冰水中游泳10min, 造成大鼠急性血癥模型^[14]。第2次给予盐酸肾上腺素后, 禁食不禁水, 12h后腹主动脉取血, 测血液流变学和凝血四项的相关指标。

2.3 动物分组及给药

取SD大鼠224只, 按体质量随机分为28组, 每组8只, 分为对照组、模型组、PS-RRR不同比例给药组。PS、RRR单味药不同剂量分别为临床等效量(根据《中国药典》2015年版用量, 2药均取生药量10g为临床等效量)的0.5、1、2、4、6、10倍。具体组别代号及剂量见表1。对照组和模型组ig给予同体积的生理盐水, 各给药组ig给予相应药物, 连续给药21d。于第20天除对照组外其余各组按照“2.2”项方法复制急性血癥模型, 于末次给药后1h腹主动脉取血, 测定血液流变学和凝血四项相关指标。

2.4 检测指标

实验动物造模结束后2h, 以10%水合氯醛(3mL/kg)ip麻醉, 固定于鼠板上, 采用腹主动脉取血, 取血量8mL。测定血液流变学指标: 全血黏度(WBV)、血沉(ESR)、红细胞聚集指数(EAI); 凝血指标: 凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原数(FIB)、凝血酶时间(TT)。

表 1 PS 和 RRR 不同配比及具体剂量
Table 1 PS-RRR samples with different ratios and doses

样品代号	配比	总生药量为临床 等效量的倍数	剂量/ (g·kg ⁻¹)	样品代号	配比	总生药量为临床 等效量的倍数	剂量/ (g·kg ⁻¹)
PS (0.5)	1 : 0	0.5	0.08	PS-RRR (1 : 5, 6)	1 : 5	6	0.96
PS (1)	1 : 0	1	0.16	PS-RRR (2 : 5, 2)	2 : 5	2	0.32
PS (2)	1 : 0	2	0.32	PS-RRR (2 : 5, 7)	2 : 5	7	1.12
PS (4)	1 : 0	4	0.64	PS-RRR (2 : 3, 3)	2 : 3	3	0.48
PS (6)	1 : 0	6	0.96	PS-RRR (2 : 3, 8)	2 : 3	8	1.28
PS (10)	1 : 0	10	1.60	PS-RRR (1 : 1, 4)	1 : 1	4	0.64
RRR (0.5)	0 : 1	0.5	0.08	PS-RRR (1 : 1, 9)	1 : 1	9	1.44
RRR (1)	0 : 1	1	0.16	PS-RRR (3 : 2, 4)	3 : 2	4	0.64
RRR (2)	0 : 1	2	0.32	PS-RRR (3 : 2, 8)	3 : 2	8	1.28
RRR (4)	0 : 1	4	0.64	PS-RRR (5 : 2, 4)	5 : 2	4	0.64
RRR (6)	0 : 1	6	0.96	PS-RRR (5 : 2, 10)	5 : 2	10	1.60
RRR (10)	0 : 1	10	1.60	PS-RRR (5 : 1, 5)	5 : 1	5	0.80
PS-RRR (1 : 5, 1)	1 : 5	1	0.08	PS-RRR (5 : 1, 12)	5 : 1	12	1.92

2.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析, 实验结果采用单因素方差分析法进行分析, 组间比较用 t 检验。

依据多指标综合指数法^[15], 对 WBV、ESR、EAI、PT、APTT、TT、FIB 等多个指标进行归一化处理, 计算各给药组的总活血效应值 ($V_{总}$)。首先对各指标数据进行标化 [$V_{标化} = (V_{给药} - V_{模型}) / (V_{对照} - V_{模型})$, V 为各指标的数值], 标化指标的权重采用专家评分法, 即同行专家依据模型中各指标在活血化癥效应整体评价中的相对重要程度, 独立给出各指标的权重系数; 查阅近 10 年来急性血瘀相关文献 128 余篇, 其中 43 篇检测了 WBV, 66 篇检测了 EAI, 24 篇检测了 ESR, 53 篇检测了 PT, 47 篇检测了 APTT, 34 篇检测了 TT, 9 篇检测了 FIB。将专家评分法与各指标在近 10 年来急性血瘀相关文献中被检测的频率统计相结合, 本研究取权重系数分别为: WBV、EAI、PT、APTT、TT 权重为 2, ESR、FIB 权重为 1。 $V_{总}$ 即为各指标的标化值乘以权重系数后的加和值。

3 结果

3.1 对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标的影响

与对照组相比, 模型组大鼠的 WBV、ESR、EAI 均明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$), 证明造模成功。与模型组相比, 各给药组大鼠血液流变学各

项指标均有不同程度的改善, 其中, 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、PS (4)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (5 : 2, 4) 组外, 其余各组对 WBV (200 s^{-1})、WBV (30 s^{-1})、WBV (5 s^{-1})、WBV (1 s^{-1}) 均有改善作用, 且 PS-RRR (1 : 1, 4)、PS-RRR (1 : 1, 9)、PS-RRR (3 : 2, 8) 组具有显著改善作用 ($P < 0.01$); 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、PS (4)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (5 : 2, 4) 给药组外, 其余各组对 ESR 均有改善作用, 且 PS (10)、PS-RRR (1 : 1, 4)、PS-RRR (1 : 1, 9)、PS-RRR (3 : 2, 8) 组具有显著改善作用 ($P < 0.01$); 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、PS (4)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (5 : 2, 4) 给药组外, 其余各组对 EAI 均有改善作用, 且 PS-RRR (1 : 1, 4)、PS-RRR (1 : 1, 9)、PS-RRR (3 : 2, 8) 组具有显著改善作用 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 对急性血瘀模型大鼠凝血四项指标的影响

与对照组相比, 模型组大鼠的 PT、APTT、TT 均明显升高, FIB 明显降低, 差异显著 ($P < 0.01$), 证明造模成功。与模型组相比, 各给药组均有不同程度的改善。其中, 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、

表 2 不同配比 PS-RRR 对急性血瘀模型大鼠血液流变学指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effects of different proportions of PS-RRR on blood rheology of acute blood stasis model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	WBV/(mPa·s ⁻¹)				ESR/mm	EAI/%
	200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹		
对照	6.08±0.55	8.80±0.01	16.28±1.53	39.77±5.15	1.14±0.38	40.68±2.26
模型	7.20±0.22 ^{##}	10.34±1.01 ^{##}	19.96±2.37 ^{##}	51.08±6.36 ^{##}	1.86±0.38 ^{##}	45.48±1.90 ^{##}
PS (0.5)	7.03±0.47	10.12±0.76	19.24±1.39	50.26±4.64	1.79±0.54	44.96±1.27
PS (1)	6.91±0.36	9.95±0.83	18.85±1.49	48.37±4.91	1.64±0.58	44.60±1.13
PS (2)	6.79±0.53	9.81±0.92	18.43±1.56	46.34±4.56	1.55±0.43	44.03±1.15
PS (4)	6.65±0.24	9.68±0.35	17.95±1.45	44.21±4.33	1.46±0.52	43.45±1.12
PS (6)	6.58±0.51 [*]	9.50±0.90	17.73±1.58 [*]	43.17±4.72 [*]	1.37±0.55 [*]	43.20±1.10 [*]
PS (10)	6.42±0.44 [*]	9.03±0.60 [*]	17.53±1.69 [*]	41.36±4.59 [*]	1.17±0.41 ^{**}	43.13±1.33 [*]
RRR (0.5)	7.05±0.24	10.12±0.75	19.39±1.80	50.85±3.12	1.81±0.53	45.26±2.31
RRR (1)	6.97±0.36	9.89±0.47	18.97±1.82	49.76±3.52	1.76±0.62	44.98±2.37
RRR (2)	6.89±0.31	9.72±0.65	18.78±1.72	48.54±3.43	1.65±0.43	44.51±2.26
RRR (4)	6.76±0.23	9.58±0.53	18.39±1.65	46.87±2.26	1.53±0.38	43.62±2.13
RRR (6)	6.68±0.28	9.46±0.78	17.95±1.58	45.85±3.25	1.41±0.56	43.36±2.14
RRR (10)	6.55±0.16 [*]	9.35±0.76 [*]	17.85±1.52 [*]	44.15±2.41	1.38±0.12 [*]	42.58±2.36 [*]
PS-RRR (1 : 5, 1)	6.62±0.53	9.41±1.14	17.91±2.48	44.43±7.02	1.52±0.56	43.40±3.05
PS-RRR (1 : 5, 6)	6.55±0.51 [*]	9.39±1.06	17.81±2.46 [*]	43.53±4.82 [*]	1.36±0.35 [*]	42.40±3.01 [*]
PS-RRR (2 : 5, 2)	6.60±0.56	9.40±0.92	17.88±2.03	44.24±4.28	1.50±0.55	43.31±3.41
PS-RRR (2 : 5, 7)	6.38±0.54 [*]	9.38±0.51	17.75±1.56 [*]	43.24±3.25 [*]	1.35±0.32 [*]	42.21±2.21 [*]
PS-RRR 2 : 3 (3)	6.32±0.34 [*]	9.27±0.53 [*]	17.48±1.42 [*]	42.48±3.85 [*]	1.31±0.26 [*]	41.86±2.45 [*]
PS-RRR (2 : 3, 8)	6.26±0.23 [*]	9.06±0.32 [*]	17.19±1.13 [*]	42.14±2.43 [*]	1.27±0.12 [*]	41.47±1.39 [*]
PS-RRR (1 : 1, 4)	6.17±0.36 ^{**}	8.85±0.53 ^{**}	16.82±1.59 ^{**}	41.27±3.27 ^{**}	1.20±0.41 ^{**}	41.12±1.69 ^{**}
PS-RRR (1 : 1, 9)	6.10±0.24 ^{**}	8.72±0.28 ^{**}	16.37±1.23 ^{**}	40.67±2.25 ^{**}	1.13±0.12 ^{**}	40.54±1.27 ^{**}
PS-RRR (3 : 2, 4)	6.28±0.47 [*]	8.95±0.64 [*]	17.12±1.13 [*]	42.13±3.12 [*]	1.23±0.52 [*]	41.55±2.05 [*]
PS-RRR (3 : 2, 8)	6.20±0.25 ^{**}	8.76±0.31 ^{**}	16.89±1.02 ^{**}	41.31±2.30 ^{**}	1.19±0.31 ^{**}	41.12±1.78 ^{**}
PS-RRR (5 : 2, 4)	6.62±0.62	9.38±0.64	17.96±1.51	44.80±4.94	1.42±0.54	43.45±4.32
PS-RRR (5 : 2, 10)	6.48±0.33 [*]	9.28±0.26 [*]	17.72±1.32 [*]	43.80±2.56 [*]	1.38±0.22 [*]	42.93±2.82 [*]
PS-RRR (5 : 1, 5)	6.57±0.64 [*]	9.20±0.54	17.61±2.03 [*]	44.15±4.65 [*]	1.33±0.23 [*]	43.18±1.72 [*]
PS-RRR (5 : 1, 12)	6.32±0.28 [*]	8.92±0.26 [*]	17.53±1.12 [*]	43.15±3.68 [*]	1.27±0.12 [*]	42.42±1.46 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

PS (4)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (2 : 5, 7) 组外, 其余各组对 PT 均有改善作用, 且 PS (10)、PS-RRR (1 : 1, 4) 和 PS-RRR (1 : 1, 9) 组改善作用显著 ($P < 0.01$); 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (1 : 5, 6)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (2 : 5, 7) 组外, 其余各组对 APTT 均有改善作用, 且 PS-RRR (1 : 1, 4)

和 PS-RRR (1 : 1, 9) 组改善作用显著 ($P < 0.01$); 除 PS (0.5)、PS (1)、PS (2)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6)、PS-RRR (1 : 5, 1)、PS-RRR (1 : 5, 6)、PS-RRR (2 : 5, 2) 和 PS-RRR (2 : 5, 7) 组外, 其余各组对 TT 均有改善作用, 且 PS-RRR (1 : 1, 4) 和 PS-RRR (1 : 1, 9) 组改善作用显著 ($P < 0.01$); 除 PS (0.5)、PS (1)、RRR (0.5)、RRR (1)、RRR (2)、RRR (4)、RRR (6) 组外, 其余各组对 FIB 均显著改善作用 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 不同配比 PS-RRR 对急性血瘀模型大鼠的凝血指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 3 Effects of different proportions of PS-RRR on coagulation indexes of acute blood stasis model rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/(mg·L ⁻¹)
对照	8.14±0.26	16.74±0.98	21.60±1.68	35.5±1.8
模型	8.93±0.48 ^{##}	19.70±1.10 ^{##}	27.28±1.56 ^{##}	18.7±3.6 ^{##}
PS (0.5)	8.83±0.20	19.62±0.70	26.98±1.20	19.3±2.5
PS (1)	8.74±0.21	19.53±0.56	26.65±1.32	20.4±2.7
PS (2)	8.63±0.32	18.92±0.70	26.34±1.15	24.5±2.5 [*]
PS (4)	8.58±0.16	18.18±1.40 [*]	25.45±1.48 [*]	28.5±2.6 [*]
PS (6)	8.42±0.15 [*]	17.76±1.40 [*]	24.75±1.49 [*]	31.2±2.6 ^{**}
PS (10)	8.28±0.18 ^{**}	17.38±1.40 [*]	23.82±1.52 [*]	33.5±2.6 ^{**}
RRR (0.5)	8.90±0.34	19.62±0.48	27.23±1.33	19.2±2.8
RRR (1)	8.82±0.42	19.55±0.36	27.02±1.36	20.2±2.8
RRR (2)	8.75±0.26	19.34±0.21	26.93±1.24	20.7±4.5
RRR (4)	8.62±0.21	19.12±0.45	26.62±1.35	21.8±3.2
RRR (6)	8.53±0.35	18.95±0.32	26.35±1.24	23.2±2.1
RRR (10)	8.38±0.33 [*]	18.18±0.48 [*]	25.38±1.41 [*]	24.5±2.8 [*]
PS-RRR (1 : 5, 1)	8.82±0.21	18.92±1.08	26.81±1.26	30.1±3.2 ^{**}
PS-RRR (1 : 5, 6)	8.53±0.24	18.56±1.08	25.61±1.26	32.2±3.6 ^{**}
PS-RRR (2 : 5, 2)	8.47±0.37	18.45±1.06	25.58±1.52	30.8±2.7 ^{**}
PS-RRR (2 : 5, 7)	8.46±0.24	18.36±1.18	25.51±1.46	32.5±2.1 ^{**}
PS-RRR (2 : 3, 3)	8.40±0.30 [*]	18.20±1.11 [*]	25.12±1.88 [*]	33.0±3.0 ^{**}
PS-RRR (2 : 3, 8)	8.38±0.29 [*]	18.14±1.13 [*]	24.95±1.88 [*]	33.8±3.0 ^{**}
PS-RRR (1 : 1, 4)	8.33±0.31 ^{**}	17.62±0.41 ^{**}	23.65±0.91 ^{**}	34.2±4.5 ^{**}
PS-RRR (1 : 1, 9)	8.23±0.22 ^{**}	16.82±0.32 ^{**}	22.71±0.36 ^{**}	35.1±4.2 ^{**}
PS-RRR (3 : 2, 4)	8.42±0.37 [*]	18.13±0.56 [*]	25.42±1.52 [*]	33.5±2.3 ^{**}
PS-RRR (3 : 2, 8)	8.36±0.32 [*]	17.92±0.42 [*]	25.35±1.31 [*]	34.0±2.3 ^{**}
PS-RRR (5 : 2, 4)	8.45±0.32 [*]	18.20±0.55 [*]	25.45±1.40 [*]	31.6±4.3 ^{**}
PS-RRR (5 : 2, 10)	8.44±0.29 [*]	18.12±0.34 [*]	24.98±1.25 [*]	32.3±3.7 ^{**}
PS-RRR (5 : 1, 5)	8.43±0.36 [*]	17.84±1.14 [*]	24.49±1.68 [*]	32.8±2.1 ^{**}
PS-RRR (5 : 1, 12)	8.41±0.23 [*]	17.66±1.12 [*]	23.93±1.46 [*]	33.8±2.5 ^{**}

3.3 PS-RRR 及其单味药的总活血效应值

经过多指标综合指数法的处理, 给予 PS 0.5~10 倍临床等效量, 总活血效应值为 1.85~13.77, 且呈现出量效关系; 给予 RRR 0.5~10 倍临床等效量, 总活血效应值为 1.26~10.09, 且呈现出量效关系; 给予不同配比的 PS-RRR 后, 在同一配比时, 高剂量的总活血效应值均高于低剂量。给予 RRR 0.5 倍量后活血效应值最低, 而给予 9 倍量 PS-RRR (1 : 1) 后活血效应值最高, 见表 4。

3.4 基于响应曲面分析法的 PS-RRR 相互作用关系分析

响应曲面分析法^[16-17]是一种新颖而有效的研究药物相互作用的方法, 它不仅可以定性和定量地研究药物间的药理学相互作用的规律, 而且还可以

寻找到效果满意、不良反应最小的药物间的最佳阈值反映范围。Minto 等^[18]首次报道了使用响应曲面法研究麻醉药物间的相互作用。响应曲面研究可以使用多种设计方案, 本实验采用辐射 (radial) 设计用于响应曲面研究所需要的样本例数, 将二维坐标平均分成 8 等分, X 轴表示 RRR 单味药, Y 轴表示 PS 单味药, 即得 9 个 PS-RRR 配比, 分别为 0 : 1、1 : 5、2 : 5、2 : 3、1 : 1、3 : 2、5 : 2、5 : 1、1 : 0。PS 和 RRR 单味药设置为 6 个临床等效量的不同倍数, 分别为 0.5、1、2、4、6、10 倍。另外的 7 个 PS-RRR 不同配比 (1 : 5、2 : 5、2 : 3、1 : 1、3 : 2、5 : 2、5 : 1), 分别设置高、低 2 个不同剂量。

3.4.1 PS-RRR 的药效学数学模型 本研究应用响应曲面分析法探讨 PS-RRR 对寒凝血瘀大鼠活血作

表 4 各指标化后的效应值及总效应值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 4 Standardized indexes and total effect values ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	V_{WBV}				V_{EAI}	V_{PT}	V_{APTT}	V_{TT}	V_{ESR}	V_{FIB}	$V_{总}$
	$200 s^{-1}$	$30 s^{-1}$	$5 s^{-1}$	$1 s^{-1}$							
PS (0.5)	0.15	0.14	0.19	0.07	0.10	0.12	0.03	0.05	0.11	0.04	1.85
PS (1)	0.26	0.25	0.30	0.24	0.31	0.23	0.06	0.11	0.18	0.10	3.80
PS (2)	0.37	0.34	0.42	0.42	0.43	0.36	0.26	0.17	0.30	0.35	6.19
PS (4)	0.49	0.43	0.55	0.61	0.56	0.42	0.51	0.32	0.42	0.58	8.78
PS (6)	0.55	0.55	0.61	0.70	0.68	0.61	0.66	0.45	0.48	0.74	10.84
PS (10)	0.70	0.85	0.66	0.86	0.96	0.78	0.78	0.61	0.49	0.88	13.77
RRR (0.5)	0.13	0.14	0.15	0.02	0.07	0.04	0.03	0.01	0.05	0.03	1.26
RRR (1)	0.21	0.29	0.27	0.12	0.14	0.13	0.05	0.05	0.11	0.09	2.72
RRR (2)	0.28	0.40	0.32	0.22	0.29	0.22	0.12	0.06	0.20	0.12	4.14
RRR (4)	0.39	0.49	0.43	0.37	0.46	0.37	0.20	0.12	0.39	0.18	6.23
RRR (6)	0.46	0.57	0.55	0.46	0.63	0.48	0.25	0.16	0.44	0.2	7.76
RRR (10)	0.58	0.64	0.57	0.61	0.67	0.66	0.51	0.33	0.60	0.35	10.09
PS-RRR (1 : 5, 1)	0.52	0.60	0.56	0.59	0.47	0.13	0.26	0.08	0.43	0.69	7.54
PS-RRR (1 : 5, 6)	0.58	0.62	0.58	0.67	0.69	0.48	0.39	0.29	0.64	0.80	10.04
PS-RRR (2 : 5, 2)	0.54	0.61	0.57	0.60	0.50	0.55	0.42	0.30	0.45	0.72	9.35
PS-RRR (2 : 5, 7)	0.73	0.62	0.60	0.69	0.71	0.57	0.45	0.31	0.68	0.82	10.86
PS-RRR (2 : 3, 3)	0.79	0.69	0.67	0.76	0.76	0.64	0.51	0.38	0.75	0.85	12.00
PS-RRR (2 : 3, 8)	0.84	0.83	0.75	0.79	0.82	0.66	0.53	0.41	0.84	0.90	13.00
PS-RRR (1 : 1, 4)	0.92	0.97	0.85	0.87	0.92	0.72	0.70	0.64	0.91	0.92	15.01
PS-RRR (1 : 1, 9)	0.98	1.05	0.98	0.92	1.01	0.84	0.97	0.80	1.03	0.98	17.11
PS-RRR (3 : 2, 4)	0.82	0.90	0.77	0.79	0.88	0.61	0.53	0.33	0.82	0.88	12.96
PS-RRR (3 : 2, 8)	0.89	1.03	0.83	0.86	0.93	0.69	0.61	0.34	0.91	0.91	14.18
PS-RRR (5 : 2, 4)	0.52	0.62	0.54	0.56	0.62	0.58	0.51	0.32	0.42	0.77	9.73
PS-RRR (5 : 2, 10)	0.64	0.69	0.61	0.64	0.67	0.59	0.53	0.40	0.53	0.81	10.88
PS-RRR (5 : 1, 5)	0.56	0.74	0.64	0.61	0.74	0.60	0.63	0.49	0.48	0.84	11.34
PS-RRR (5 : 1, 12)	0.79	0.92	0.66	0.70	0.82	0.63	0.69	0.59	0.64	0.90	13.14

用的药效学相互作用规律。由于中药中多成分、多靶点的共同作用，本研究采用二次多项式来更好地描述两药合用的量效曲线，并以合并指数来描述两药的相互作用强度。为了便于绘图，将合并指数减 1，以 0 作为典型的加和作用。

3.4.2 模型参数加合构建响应曲面 应用非线性回归的方法确定量效曲线的各个参数，建立三维响应面模型，应用 Matlab 软件构建响应曲面的三维图形。

3.4.3 PS-RRR 相互作用的评价 在三维响应面模型中，颜色的深浅代表了该点处两药相互作用的强度。根据合并指数的计算方法，当指数接近于 0 时，提示药物间为相加作用；大于 1 时，提示药物间为拮抗作用，小于 1 时为协同作用。指数值越高，表

示相互作用的强度越大，在图中表现为颜色越接近于黄或蓝两端^[19]。

在图 1 中，X 轴表示不同剂量的 PS 单味药，Y 轴表示不同剂量的 RRR 单味药，坐标数值表示给予大鼠体内单次用药的实际用药量，Z 轴表示 PS-RRR 在不同剂量下的效应值，由 X、Y、Z 轴形成的三维空间区域表示不同比例 PS-RRR 的效应值形成的曲面图^[12]。经过响应曲面处理后，发现在 PS-RRR 的配比 2 : 3~3 : 2，表现出明显的协同作用（强度为 -0.8）；在 PS 剂量 5.5~10 g，RRR 剂量 2.1~5.8 g 内，表现出拮抗作用（强度最大为 0.6）；而其他比例并未表现出明显的协同或者拮抗作用。见图 2。

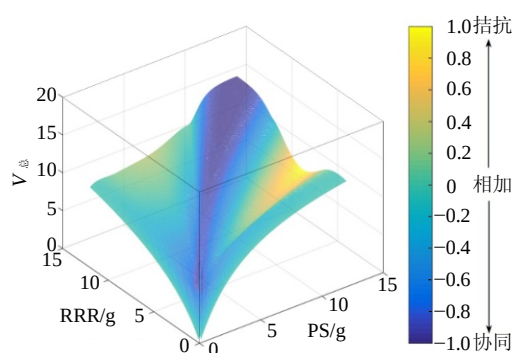


图 1 PS-RRR 活血化癥效应曲面图

Fig. 1 Three-dimensional response surfaces of acute blood stasis total blood circulation effects of PS-RRR

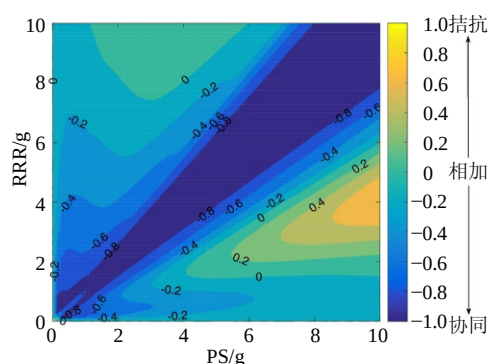


图 2 PS-RRR 活血化癥作用强度分布图

Fig. 2 PS-RRR on promoting blood circulation and removing blood stasis intensity distribution map

本课题组前期挖掘 PS-RRR 中医古今应用数据发现, PS-RRR 配伍比例在 1:3 与 2:1 处出现的概率最大, 且大多用于妇科疾病, 以血癥证较多, PS-RRR 比例 1:1 频次最高, 本实验也印证了这一结果。以 PS-RRR 为组方用药的桃核承气汤的比例为 1:1, 恰好在 2:3~3:2, 表现出活血化癥效应的协同作用 (相互作用强度为-0.8), 从而揭示了桃核承气汤配伍应用的科学性与合理性。

4 讨论

血癥证, 中医认为七情中的“忧怒”和六淫中的“寒邪”为主要病因、病机, 治疗主要采用活血化癥法; 现代医学表明其主要是由于血液的流动性和黏度变化所致。

故依据中医药理论关于血癥证的“暴怒”“寒邪”病因、病机, 以复制设计动物的急性血癥模型。通过给大鼠 sc 盐酸肾上腺素来模拟暴怒时的机体状态, 结合冰水浸泡, 模拟寒邪侵袭, 二者综合作

用复制大鼠急性血癥模型。血液流变学和凝血指标的改变 (血液呈黏、浓、凝、聚) 伴随临床症状和体征的消失前后^[20-21], 因此 PS-RRR 活血化癥疗效的评价确定以血液流变学和凝血指标为参考指标。

本实验采用血液流变学、凝血相关指标, 从黏、浓、凝、聚等方面来考察 PS-RRR 对模型大鼠的活血化癥功效。结果表明, 不同剂量 PS、RR、以及不同配比的 PS-RRR 均对大鼠急性血癥模型引起的血流变的变化有不同程度的改善作用。通过响应曲面分析发现 PS-RRR 配伍在不同配比相互作用的性质与程度都有所不同, PS-RRR 的配比 2:3~3:2, 表现出明显的协同作用 (协同作用强度为-0.8); 在 PS 剂量 5.5~10 g, RRR 剂量 2.1~5.8 g 区域内, 表现出拮抗作用 (拮抗作用强度最大为 0.6)。笔者前期研究 PS-RRR 不同配比对 RRR 中 10 种成分提取量的影响发现, RRR-PS 不同配比 (1:5、2:5、2:3、1:1、3:2、5:2、5:1) 中, 与 RRR 对照组比较, RRR-PS 不同配比 (5:1、5:2、3:2) 样品中随着 PS 比例的升高, RRR 中的没食子酸、儿茶素、番泻苷 B、蒽醌类提取量逐渐减低; 而在 PS-RRR 配比达到 1:1 时, 样品中 RRR 的蒽醌类、鞣质类化学成分总提取量到达最低值。进而改变 RRR 与 PS 配比分分别为 2:3、2:5、1:5 时, 样品中随着 PS 比例的升高, RRR 中的没食子酸、儿茶素、蒽醌类、番泻苷 B 提取量明显升高, 整个变化呈现近“U”型曲线分布^[22]。张慧林等^[23]报道大黄有明显的促进血凝作用, 其止血有效成分可能是大黄酚、大黄素甲醚、儿茶素及没食子酸等。从而证明 PS-RRR 在不同配比条件下, 表现出其协同作用、拮抗作用的程度和范围的差异, 与其活性成分的变化有密切关系。为下一步深入研究提供了初步的理论支持。

药物相互作用的观点被人们认可以及认识的不断深化, 相继出现了许多评价药效相互作用模型^[24]。等辐射分析法、分数分析法、平行线分析法等方法只能定性地分析药物之间的相互作用的局限性, 而只有定量才能更加直观地体现药物之间的相互作用。响应曲面法近年来报道了对抗生素类、抗癫痫类, 抗炎类以及麻醉类等多种效应药物相互作用的定量分析。对于指导临床用药起到了非常重要的作用。而用于中药配伍药效学相互作用研究报道较少。本研究采用响应曲面法定量对中药 PS 和 RRR 活血化癥效应相互作用进行研究, 为指导

PS-RRR 临床用药提供了依据,进一步为中药配伍相互作用研究提供了思路与方法的参考。

参考文献

- [1] 李家琳. 张仲景与王清任活血化癥方剂用药规律比较研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [2] 许筱凰, 李 婷, 王一涛, 等. 桃仁的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2649-2655.
- [3] 尹立敏, 王红艳, 颜永刚, 等. 桃仁分离物对急性寒凝血癥模型大鼠血液流变学和血常规水平的影响 [J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(2): 85-88.
- [4] 裴 瑾, 颜永刚, 万德光, 等. 桃仁油对动物血液流变学及微循环的影响 [J]. 中成药, 2011, 33(4): 587-589.
- [5] 刘三洪, 韩 冰, 宋殿荣. 韩冰教授活血化癥药在妇科用药的经验拾零——桃仁、红花与三棱、莪术之别 [J]. 天津中医药, 2016, 33(7): 390-393.
- [6] 宋雨泽, 曾滨阳, 任 历, 等. 生物效价法测定大黄炮制品活血化癥功效 [J]. 中成药, 2014, 36(9): 1921-1924.
- [7] 杨 涛, 胡昌江, 李文兵, 等. 生、熟大黄对高分子右旋糖酐所致血癥大鼠血液流变性的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 248-250.
- [8] 张艳慧. 大黄蜚虫丸对动脉粥样硬化模型大鼠内皮功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(11): 2012-2014.
- [9] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 桃仁-大黄药对对内毒素脂多糖所致蓄血症模型大鼠的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(5): 1148-1151.
- [10] 魏 滨, 杨 璐. 麻醉药物药效学相互作用研究方法新进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(12): 1041-1046.
- [11] Jin Y, Qu C, Tang Y, *et al.* Herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* (Danggui): A review of bio-active constituents and compatibility effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 181: 158-171.
- [12] 黄美艳, 唐于平, 尚尔鑫, 等. 基于响应曲面分析法对归芍药对活血效应相互作用研究 [J]. 中国药理学通

报, 2012, 28(10): 1407-1413.

- [13] 龚千锋. 中药炮制学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012.
- [14] 李伟霞, 黄美艳, 唐于平, 等. 大鼠急性血癥模型造模方法的研究与评价 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1761-1765.
- [15] 李淑娇, 李伟霞, 唐于平, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法的当归-红花不同配比活血化癥作用比较 [J]. 药学报, 2014, 49(9): 1304-1309.
- [16] Schumacher P M, Dossche J, Mortier E P, *et al.* Response surface modeling of the interaction between propofol and sevoflurane [J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(4): 790-804.
- [17] Hannam J, Anderson B J. Explaining the acetaminophen ibuprofen analgesic interaction sing a response surface model [J]. *Paediatr Anaesth*, 2011, 21(12): 1234-1240.
- [18] Minto C F, Schnider T W, Short T G, *et al.* Response surface model for anesthetic drug interactions [J]. *Anesthesiology*, 2000, 92(6): 1603-1616.
- [19] 李伟霞, 唐于平, 郭建明, 等. 比较评价当归川芎配伍对急性血癥大鼠血液流变学及凝血功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 806-811.
- [20] 刘昌孝, 张铁军, 何 新, 等. 活血化癥中药五味药性功效的化学及生物学基础研究的思考 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 615-624.
- [21] 庞汉青, 唐于平, 史旭芹, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法丹参不同有效部位的活血化癥作用比较 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3239-3247.
- [22] 颜永刚, 尹立敏, 王红艳, 等. 大黄-桃仁药对不同配比对大黄中 10 种成分提取量的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(7): 1579-1582.
- [23] 张慧林, 赵 妍. 大黄的药理作用及临床应用分析 [J]. 光明中医, 2015, 30(5): 119-1121.
- [24] 郑青山, 何迎春, 杨 娟, 等. 药物相互作用分析与复方药效模拟: 一个方法学研究 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1106-1112.