

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方的优化及抗应激作用

储金秀,韩淑英,余红,张博男,姚荣妹,董晓鹏,马慧霞,李洁,包巨太^{*}
(河北联合大学,河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:正交试验法优化抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)复方。方法:用不含交互作用的“正交 *t* 值法”设计,以小鼠缺氧存活时间为指标,筛选出 K-CoxB-JN 的优化处方,对优选的新组方用抗应激反应(心肌缺血后耐缺氧、负重游泳)实验验证。结果:原方中 7 味药优选出西洋参、黄芪、麦冬、五味子四药作为优化方。异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血后常压耐缺氧试验结果显示与正常对照组比较,在缺氧情况下生存时间以模型组最短,差异显著($P<0.01$),与模型组比较,原方中、低剂量组及新方组小鼠存活时间均明显延长($P<0.01$)。负重游泳试验结果显示对照组小鼠游泳时间最短,K-CoxB-JN 原方与优化方低剂量组均能明显延长小鼠游泳时间,有明显的抗疲劳作用。两组试验结果均显示原方和优化方中、低剂量组作用无明显差异。结论: K-CoxB-JN 优化方与原方具有相似的提高小鼠抗应激反应能力的作用,但用药剂量明显减少。

[关键词] 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊;优化;抗应激反应;病毒性心肌炎

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0153-04

Optimization of Anti-coxsackie B Complex Capsule for Treating Myocarditis Induced by Coxsackie B Virus and Anti-stress Effect of Capsule

CHU Jin-xiu, HAN Shu-ying, YU Hong, ZHANG Bo-nan, YAO Rong-mei,
DONG Xiao-peng, MA Hui-xia, LI Jie,BAO Ju-tai^{*}
(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] Objective: To optimize anti-coxsackie B complex capsule for treating myocarditis induced by coxsackie B virus with the method of orthogonal test. Method: The optimized prescription of anti-coxsackie B complex capsule was selected according to the survival time of mice after oxygen deficiency with the method of orthogonal *t* value design. The optimized prescription was verified by anti-stress reaction experiments including tolerance to oxygen deficiency after myocardial ischemia and weight loading swimming. Result: Four of the seven components in the original prescription were selected preferentially to compose the optimized prescription, including *Panax quinquefolius*, *Astragalus mongholicus*, *Radix Ophiopogonis* and Chinese magnoliavine fruit. Both the original prescription and the optimized prescription could remarkably prolong the survival time of oxygen deficient mice and the swimming time of weight loading mice, however, there was no significant difference between the two prescriptions. Conclusion: The optimized prescription had similar effects on elevating the ability of anti-stress action in mice as the original one with less dosage.

[Key words] anti-coxsackie B complex capsule; optimization; anti-stress action; viral myocarditis

[收稿日期] 20101008(013)

[基金项目] 国家“十一五”规划科技重大专项课题(重大新药创制,2009ZX09103-442)

[第一作者] 储金秀,硕士,讲师,从事中药防治心血管疾病研究,Tel: 0315-3725870, E-mail: chujinxiu@126.com

[通讯作者] ^{*}包巨太,硕士,教授,硕士生导师,从事中药防治心血管疾病研究,Tel: 0315-3725030, E-mail: baojutai@sohu.com

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊 (K-CoxB-JN) 是本院包巨太教授临床应用 20 多年的治疗病毒性心肌炎复方,有益气养阴、补益心气、增加机体免疫功能等作用,可缩短病程、具疗效稳定确切等优点^[1]。但 K-CoxB-JN 临床用量较大,给患者带来了不利。为改进上述缺点,进行了初步的处方优化研究,并对优化方进行了抗应激反应的验证实验,为后续的研究提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物 雌性昆明种小鼠(北京中国医学科学院实验动物研究所),许可证号 SCKX(京)2004-0001,清洁级,体重(20±2)g。常规颗粒饲料喂养,自由饮水,室温 22℃~25℃。

1.2 试药与仪器 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方药材(西洋参、黄芪、丹皮、麦冬、五味子、莱菔子、王不留行),均购自石家庄市柏林药材加工厂;盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso):上海禾丰制药厂(批号 080801)。电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司,型号 98-1-B);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂,型号 RE-5205);电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,型号 GZX-9070 MBE);数显恒温水浴锅(国华电器有限公司,型号 HH-6);MP200A 型电子天平(上海第二天平仪器厂)。

2 方法

2.1 处方中各单味药的制备 按处方中各药材所占比例,分别称取 10 付药的各药量,除莱菔子和王不留行合并外,其余均按药味单独放置,分别在各药味中加适量水煎煮 2 次,每次 30 min,趁热过滤,合并 2 次滤液,80℃恒温水浴锅浓缩至一定体积备用。

2.2 Iso 致小鼠心肌缺血常压耐缺氧试验(耐缺氧实验)^[2] 小鼠随机分为 12 组,每组 12 只,按正交试验设计组方,组方中各药味按成年人每公斤体重每日临床生药用量的 10 倍量换算成小鼠每公斤体重每日的给药量,小鼠 ig 给药,每天 1 次,连续 7 d。末次给药 60 min 后,小鼠背部多点 sc Iso 20 mg·kg⁻¹致小鼠心肌缺血模型,正常对照组 sc 等容积生理盐水。15 min 后将小鼠投入盛有 25 g 钠石灰的 250 mL 容积的广口瓶中(每瓶 1 只),凡士林密封瓶口,以呼吸停止为指标,观察小鼠存活时间。

2.3 正交 t 值法设计^[3-5] K-CoxB-JN 复方由 7 味

中药组成,如用正规的正交试验工作量太大,因此用不含交互作用的“正交 t 值法”作各味药最佳组合分析。由于莱菔子和王不留行在方中所占比例较小,因此将二者合并作为单一因素,总计为六因素进行组合定量分析。以小鼠缺氧存活时间为指标,六因素(A:西洋参;B:黄芪;C:麦冬;D:五味子;E:丹皮;F:莱菔子+王不留行)二水平(1:用药;2:不用药),进行正交 t 值法设计(表 1)需 12 组。

2.4 优化方抗应激反应对正交优选的新组方进行试验验证

2.4.1 Iso 致小鼠心肌缺血后常压耐缺氧试验^[6] 小鼠 90 只,按每组 15 只随机分为 6 组:①正常对照组,②模型组,③原方组(原方 4.8 g·kg⁻¹),④优化方低剂量组(1.5 g·kg⁻¹),⑤优化方中剂量组(3 g·kg⁻¹),⑥优化方高剂量组(6 g·kg⁻¹)。以上给药按组 ig 给药,每天 1 次,连续 7 d,正常对照组和模型组 ig 等容量的蒸馏水。末次给药 60 min 后,按 2.2 方法造模,观察耐缺氧时间。

2.4.2 负重游泳实验^[3] 取小白鼠 75 只,按每组 15 只随机分为 5 组:①对照组,②原方组,③优化方低剂量组,④优化方中剂量组,⑤优化方高剂量组。各组给药方法同 2.4.1,对照组同时 ig 等容量的蒸馏水。末次给药 60 min 后,在每只小鼠尾部加体重 10% 质量的负荷,放置于水温(22±1)℃,水深 20 cm 的游泳槽内,观察小鼠游泳时间至小鼠沉到水底 6 s 内不再游出水面为止。

3 结果

3.1 Iso 致小鼠心肌缺血常压耐缺氧试验 由于 2 水平时 F 值恒为 t 值,故可作简化计算^[7],结果见表 1。

$$D = M1 - M2 \quad Se = \sqrt{\Sigma S^2 / n}$$
$$t = |D| / Se \quad f = G \times (n-1) = 132$$

M1:用药各组平均存活时间之和;M2:不用药各组平均存活时间之和;S 为误差;G 为实验次数;n 为样本数;m 为平均值。

分析提示:①耐缺氧药效显著者(主要)是西洋参、黄芪和麦冬,五味子为辅药,丹皮、莱菔子和王不留行作用不明显或为反药。②优化组合是 A1B1C1D1E2F2,即西洋参、黄芪、麦冬、五味子 4 药组合可取得较大作用(小鼠心肌缺氧后耐缺氧时间较长)。③预测优化组合的药效为:m' = Σm + Σ|D|/G = (334.63 + 9.49 + 6.47 + 5.65 + 4.05 + 0.57 + 2.59)/12 = 30.29

表 1 正交 *t* 值法的设计和耐缺氧实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

试验	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	药物	平均存活时间/min
1	1	1	1	1	1	1	原方	30.45 ± 2.82
2	1	1	1	2	2	2	<i>ABC</i>	29.42 ± 3.03
3	1	1	2	2	1	2	<i>ABE</i>	28.44 ± 3.11
4	1	2	2	1	2	1	<i>ADF</i>	28.27 ± 2.72
5	1	2	2	2	1	1	<i>AEF</i>	26.60 ± 3.25
6	1	2	1	1	2	2	<i>ACD</i>	28.88 ± 3.17
7	2	1	1	2	2	1	<i>BCF</i>	27.75 ± 2.84
8	2	1	2	1	2	1	<i>BDF</i>	26.57 ± 3.12
9	2	1	2	1	1	2	<i>BDE</i>	27.92 ± 3.08
10	2	2	1	1	1	2	<i>CDE</i>	27.25 ± 3.19
11	2	2	1	2	1	1	<i>CEF</i>	26.38 ± 3.06
12	2	2	2	2	2	2	—	26.70 ± 2.72
M1	172.06	170.55	170.14	169.34	167.03	166.02		
M2	162.57	164.08	164.49	165.29	167.60	168.61		
D	9.49	6.47	5.65	4.05	−0.57	−2.59		
<i>t</i>	3.148 6	2.146 6	1.874 6	1.344 0	0.873 5	1.542 8		
<i>P</i>	<0.01	<0.05						

优化组合后(优化方)药效为 30.29 min,与总方相近。

3.2 优化方对 Iso 致小鼠心肌缺血后常压耐缺氧的影响 由表 2 结果可见,小鼠注射 Iso 后,在缺氧情况下生存时间以模型组最短,与正常对照组比较,具有显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,原方组及优化方组小鼠存活时间均有延长,尤其是原方组和优化方中、低剂量组作用显著($P < 0.01$),优化方中、低剂量组与原方组间作用无明显差异。

表 2 优化方对注射 ISO 小鼠耐缺氧能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	存活时间/min
正常对照	—	33.62 ± 2.71 ¹⁾
模型	—	20.35 ± 2.82
原方	4.8	26.54 ± 3.55 ¹⁾
优化方	1.5	25.21 ± 2.97 ¹⁾
	3.0	24.47 ± 3.63 ¹⁾
	6.0	22.35 ± 2.74 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与原方组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 优化方对小鼠抗疲劳作用的影响 结果表明,与对照组比较,原方与优化方均可延长小鼠负重游泳持续时间,尤其是原方与优化方低剂量组作用显著($P < 0.05$),优化方各剂量组与原方组作用无显

著差异,结果见表 3。

表 3 优化方对小鼠负重游泳实时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	游泳时间/min
对照	—	2.35 ± 0.46
原方	4.8	2.92 ± 0.58 ¹⁾
优化方	1.5	2.91 ± 0.52 ¹⁾
	3.0	2.89 ± 0.48
	6.0	2.57 ± 0.66

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊临床用于治疗病毒性心肌炎能明显改善患者的心悸、胸闷、气短、乏力等症状;实验观察表明,本方可增加机体免疫功能,提高机体的抵抗力,具有益气养阴、清热解毒的作用^[1]。为了科学配伍复方,合理使用药物,减少用药量,方便患者,本文通过正交试验^[8],用药效学指标考察了该方不同药味的配伍,从实验结果和正交试验及统计学分析,优选出了与原方作用相近的优化方,优化组合是 A1B1C1D1E2F2,即西洋参、黄芪、麦冬、五味子 4 药组合。

为了进一步验证新组方药效,用小鼠应激反应实验(缺氧、耐疲劳),比较优化方与原方的药效差

异。结果二方均能明显提高小鼠的应激反应能力,二者作用相近,无明显差异,但优化方用药剂量明显低于原方。病毒感染导致的心肌炎,对机体来说也属于一种应激反应,异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血后常压耐缺氧试验和小鼠负重游泳实验虽然不能完全反映病毒性心肌炎机体状况,但在一定程度上能反映机体的抵抗力和抗病能力,具有一定的代表性,为该方的进一步研究奠定了基础。下一步将进一步研究新组方对柯萨奇 B 病毒性心肌炎的作用和疗效是否较原方优越。

本研究用“正交 t 值法”设计实验,本法可用于 3~11 味药物的方剂组合分析,尤其更多味药物组合更能体现优势,如用正规的正交试验工作量非常大,本法巧妙地安排设计,将交互作用不列在表中,重点分析药物的主因素,只需 12 组实验,大大减少了工作量,凸显其优越性。

[参考文献]

[1] 邢纪萍,包巨太,李志田,等. 抗柯萨奇 B 中药胶囊治

疗病毒性心肌炎的临床疗效评价[J]. 中国临床药理学与治疗学,2003,8(6):701.

[2] 陈奇. 中药药理实验[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1988:182,185.

[3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:57.

[4] 冯岗,张静. Visual Basic 在药物配方优化中的应用[J]. 中国农药通报,2010,26(10):259.

[5] 伍利锋,罗燕玉,李伟东,等. 正交设计筛选风湿跌打凝胶剂处方[J]. 中国药业,2008,17(13):41.

[6] 吴波,陈思维,王敏伟,等. 瓜蒌薤白白酒汤提取物抗心肌缺血缺氧及最佳处方的筛选[J]. 中草药,2001,31(11):844.

[7] 沈映君,徐秋萍,陈奇,等. 中药药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:60.

[8] 左文,陆兔林,毛春芹,等. 正交试验法优选山茱萸高压酒蒸工艺的研究[J]. 中草药,2010,41(3):403.

[责任编辑 聂淑琴]