

本文引用:邓松华,谢彪,彭天书,何永恒.应用正交设计优化天马颗粒剂配方的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):266-269.

应用正交设计优化天马颗粒剂配方的实验研究

邓松华¹,谢彪¹,彭天书²,何永恒^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙410005)

〔摘要〕目的 优化天马颗粒剂的最佳配方。方法 天马颗粒剂的17味药物按L20(2¹⁷)正交表分为20组,并通过对20组大鼠灌胃获取含药血清。用5%、10%、20%含药血清分别对人大肠癌细胞HCT8、HCT116、HT29、COLO320、SW480、SW620干预24、48、72 h,CCK-8法检测细胞的吸光度,比较各组含药血清对细胞的增殖抑制率。结果 经直接分析和方差分析,原方中蜈蚣、全蝎、半边莲、黄柏、三棱、大黄、胆南星、海藻、黄芪、山药均在大肠癌细胞的增殖抑制中发挥主要作用(均 $P<0.05$, $P<0.01$),而其它药物则无明显作用(均 $P>0.05$)。结论 根据正交设计优选天马颗粒剂的最佳配方为:蜈蚣、全蝎、半边莲、黄柏、三棱、大黄、胆南星、海藻、黄芪、山药。

〔关键词〕 天马颗粒剂;正交设计;大肠癌;增殖抑制;优化配方

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.03.009

Experimental Study of Formula Optimization of Tianma Granules by Orthogonal Design

DENG Songhua¹, XIE Biao¹, PENG Tianshu², HE Yongheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕 Objective To optimize the best compatibility of Tianma granules. **Methods** The 17 Chinese medicines of Tianma granules were divided into 20 groups by L20 (2¹⁷) orthogonal table. The serum containing drugs of rats by gavage were obtained. The optical density (OD) of colorectal cancer cell HCT8, HCT116, HT29, CoLo320, SW480, SW620, which were intervened at 24 h, 48 h, 72 h by 5%, 10%, 20% serum, were detected by CCK-8 methods. The inhibitory rate of 20 groups on cell proliferation was analyzed. **Results** The Wugong (centipede), Quanxie (scorpion), Banbianlian (lobelia), Huangbai (cortex phellodendri), Sanleng (burreed), Dahuang (rhubarb), bile arisaema, seaweed, milkvetch root, Shanyao (common yam rhizome) had inhibitory effect on the proliferation of colorectal cancer cell lines ($P<0.05$, $P<0.01$) in intuitive analysis and variance analysis, but the others had no significant effect on proliferation inhibition (all $P>0.05$). **Conclusion** The best compatibility of Tianma granules is Wugong, Quanxie, Banbianlian, Huangbai, Sanleng, Dahuang, Dannanxing, Haizao, Huangqi, Shanyao.

〔Keywords〕 Tianma granules; orthogonal design; colorectal cancer; proliferation inhibition; optimized formulation

大肠癌包括结肠癌和直肠癌,是消化系中最常见的恶性肿瘤之一,其在全球范围内的发病率和死亡率位居第3位^[1],2010年结直肠癌在我国城市地区

已成为第4位的常见恶性肿瘤^[2]。由于受吸烟、体力活动过少、肥胖、食用红肉与加工肉制品及过度饮酒等因素影响,大肠癌发病率呈现上升趋势^[3]。目前临

〔收稿日期〕2017-03-03

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81673986);湖南省研究生科研创新项目(CX2016B356)。

〔作者简介〕邓松华,男,主治医师,在读博士研究生,研究方向:肛肠疾病的防治。

〔通讯作者〕*何永恒,男,教授,主任医师,E-mail:hyhys1984@163.com。

床上,手术虽然是治疗大肠癌的主要方法,但术后单纯放化疗并不能完全有效的减少复发及转移,并且复发和转移是其死亡的主要原因。近年来,大量的临床研究与实验研究均表明,中医药在大肠癌根治术后预防复发和转移、减毒增效、减轻疼痛以及提高生存质量,延长生存期等方面发挥着非常重要的作用^[4]。

天马颗粒剂是由何永恒教授研发,在临床应用用于大肠癌的治疗取得了较好的临床疗效^[5-7],但该方由 17 味中药组成,为了节约中药资源,减少患者用药费用,有必要对天马颗粒剂原方进行拆方研究,以达到精减药物组成、优化方剂配伍的目的,并为该方的进一步开发奠定基础。现将应用正交设计优化配方的研究结果报道如下。

1 材料与方

1.1 细胞株及动物

人大肠癌细胞株 HCT8、HCT116、HT29、CO-LO320、SW480、SW620 购于中南大学湘雅医学院细胞培养中心。SD 大鼠 120 只购于湖南斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2013-0004, SPF 级,体质量(200±20)g,雌雄各半。室温 18~20 ℃,湿度为 65%~70%,自由进食饮水。

1.2 药品及试剂

天马颗粒剂配方颗粒购于湖南中医药大学第二附属医院中药房(批号:(湘)卫药剂 9706024)。按正交设计将各实验组药物用纯净水溶解后,冰箱贮存备用。

7Sea-Cell Counting Kit 试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司),0.25%胰蛋白酶(北京 Solarbio 公司),FBS 南美胎牛血清(美国 Serapro 公司),RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司),PBS 磷酸盐缓冲液(美国 Hyclone 公司)。

1.3 主要仪器

MK3 型酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司);TDZ5-WS 台式低速离心机(湖南汀湘仪实验室仪器开发有限公司);SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 正交设计

天马颗粒剂由蜈蚣、全蝎、重楼、半边莲、黄柏、三棱、莪术、大黄、胆南星、海藻、夏枯草、当归、黄芪、党参、山药、车前子、火麻仁等组成,分别由 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q 代表。每味药为一个因素,其代号随机选定,均取“用药”和“不用药”两个水平。实验选用 L20(2¹⁷)正交表。因素与水平的安排见表 1,正交设计分组见表 2。

表 1 因素与水平表

水平	因素/g																
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	2	3	9	15	6	10	10	6	3	10	10	20	10	10	20	10	10
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1.5 含药血清制备

将 120 只大鼠随机分为 20 组,每组 6 只,雌雄各半。标准食料适应性喂养 1 周后,予 20 组药物溶解后灌胃给药,给药剂量相当于成人日用量的 5 倍^[8],分早晚 2 次给药,连续 7 d,末次给药 2 h 后麻醉,腹主动脉采血,室温静置 2 h,1 500 r/min,离心 15 min 分离血清,同组血清混匀,56 ℃、30 min 灭活补体,0.22 μm 过滤器除菌后分装,-80 ℃冰箱保存备用。

1.6 细胞培养

将人大肠癌细胞 HCT8、HCT116、HT29、CO-LO320、SW480、SW620 培养于含 10%的胎牛血清、100 μg/mL 的青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养基中,37 ℃、5% CO₂、相对湿度为 95%的恒温培养箱内培养,每 2~3 天使用 0.25%的胰蛋白酶消化传代

一次。取对数期细胞用于实验。

1.7 制作标准曲线

每孔以含细胞数分别为 2 000、4 000、8 000 的细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板,每组设置 6 个复孔。培养箱中培养 24 h,在避光条件下每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,轻敲培养板四周使其混匀,培养箱中分别孵育 0.5、1、2、4 h 后,酶标仪上 450 nm 测定吸光度,使用 Origin 6.0 制作标准曲线。选取吸光度值 1.0 时的细胞密度和加入 CCK-8 后的孵育时间用于后续实验。

1.8 细胞增殖检测

收集对数期的细胞,根据标准曲线确定每种细胞的接种密度,将细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板中,共 20 组,同时设对照组(只加细胞和培养基)和空白组(只加培养基不加细胞),每组设 6 个复孔。

待细胞贴壁,将原培养基更换为浓度分别5%、10%、20%含药血清的培养基100 μL,不加细胞组和空白对照组均更换为等体积的完全培养基,继续培养24、48、72 h。加入CCK-8溶液10 μL同“1.7”,根据标准曲线确定每种细胞继续孵育时间,在培养箱中孵育后,酶标仪上450 nm测定吸光度值(A)。实验重复3次。计算细胞增殖抑制率(IR): $IR\%=[1-(\text{干预组}A-\text{空白组}A)/(\text{对照组}A-\text{空白组}A)]\times 100$ 。每组选取最佳细胞增殖抑制率用于统计分析实验结果。

1.9 数据分析

所有数据使用SPSS 17.0软件包进行统计分析,采用正交设计方差分析。以 $P<0.05$ 为差别有统

计学意义。

2 结果

2.1 直观分析

经20组含药血清干预后,用CCK-8法检测人大肠癌细胞株HCT8、HCT116、HT29、COLO320、SW480、SW620的吸光度值,经过计算所得到的细胞抑制率(IR)。根据表2可知,天马颗粒剂的最优配方为:A1、B1、C2、D1、E1、F1、G2、H1、I1、J1、K2、L2、M1、N2、O1、P2、Q2,因水平1为原剂量,水平2为不用,故最优配方为:A1、B1、D1、E1、F1、H1、I1、J1、M1、O1。见表2。

表2 天马颗粒剂正交设计直观分析表

($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	Q	实验结果					
																	a	b	c	d	e	f
1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	0.144±0.033	0.143±0.126	0.182±0.017	0.073±0.120	0.252±0.017	0.185±0.027
2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	2	0.110±0.042	0.363±0.181	0.165±0.010	0.212±0.019	0.219±0.024	0.202±0.005
3	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	0.173±0.037	0.808±0.097	0.287±0.018	0.164±0.127	1.122±0.087	0.349±0.077
4	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	0.136±0.076	0.690±0.036	0.135±0.116	0.163±0.046	0.240±0.028	0.311±0.082
5	1	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	0.344±0.312	0.475±0.193	0.209±0.017	0.251±0.029	0.374±0.103	0.471±0.062
6	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	0.153±0.136	0.936±0.080	0.110±0.027	0.190±0.029	0.793±0.064	0.234±0.032
7	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	0.041±0.016	0.696±0.048	0.219±0.114	0.120±0.083	0.270±0.026	0.215±0.009
8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.068±0.020	0.768±0.074	0.176±0.012	0.216±0.048	0.783±0.231	0.264±0.089
9	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	0.525±0.039	0.649±0.041	0.183±0.091	0.171±0.055	0.296±0.015	0.212±0.039
10	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.513±0.058	0.567±0.115	0.359±0.013	0.206±0.045	0.222±0.020	0.270±0.030
11	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	0.107±0.026	0.600±0.089	0.209±0.146	0.216±0.034	0.200±0.010	0.130±0.022
12	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	0.113±0.061	0.701±0.105	0.144±0.026	0.212±0.016	0.329±0.022	0.225±0.296
13	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	0.111±0.064	0.503±0.138	0.150±0.007	0.168±0.050	0.302±0.012	0.221±0.035
14	2	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	0.027±0.003	0.675±0.116	0.137±0.015	0.166±0.054	0.398±0.112	0.220±0.050
15	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	0.152±0.009	0.441±0.036	0.212±0.017	0.229±0.023	0.366±0.060	0.516±0.100
16	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	1	0.201±0.142	0.464±0.212	0.174±0.016	0.145±0.024	1.123±0.076	0.429±0.099
17	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	0.958±0.224	0.495±0.124	0.171±0.006	0.170±0.006	0.382±0.053	0.308±0.038
18	1	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2	0.874±0.230	0.504±0.177	0.192±0.024	0.234±0.034	0.290±0.055	0.374±0.034
19	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	1	1	2	0.117±0.026	0.400±0.214	0.322±0.141	0.128±0.019	0.292±0.045	0.208±0.033
20	1	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	0.167±0.017	0.796±0.144	0.272±0.126	0.197±0.126	0.448±0.072	0.462±0.094
\bar{x}_1	589.89	581.57	561.72	601.89	584.80	574.89	559.71	583.08	576.79	573.11	559.58	580.60	587.76	557.11	575.64	564.88						
\bar{x}_2	551.97	560.30	580.15	539.97	557.07	566.97	582.16	558.79	565.08	568.75	582.29	561.26	564.11	584.76	566.22	576.98						
R	37.92	21.28	18.44	61.92	27.73	7.92	22.45	24.29	11.71	4.36	22.71	19.34	33.65	27.64	9.42	12.10						

注:a,b,c,d,e,f分别为6种人大肠癌细胞HCT8、HCT116、HT29、COLO320、SW480、SW620。

2.2 方差分析

经正交设计方差分析,天马颗粒剂中各药物在抑制大肠癌细胞增殖中的主次分别为:A、F、J、E、I、D、B、M、O、H、Q、C、G、L、N、K、P。蜈蚣、全蝎、黄柏、三棱、大黄、胆南星、海藻、半边莲、黄芪、山药抑制大肠癌细胞的增殖比较,差异有统计学意义(均 $P<0.05$);而重楼、莪术、夏枯草、当归、党参、车前子、火麻仁对大肠癌细胞的增殖抑制作用比较,差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表3。

3 讨论

何永恒教授通过总结先秦到民国时期关于“大肠癌”病因病机、辨证体系和防治的中医相关记载^[9-10],将该病的病因病机归纳为“毒、瘀、痰、虚”,根据古代名方化痞膏、黄芪益损汤和内消瘰疬丸化裁,而研发出天马颗粒剂。经临床多年应用,该方治疗中晚期结直肠癌及抑制大肠癌术后复发转移均取得了较好的临床疗效^[5-7]。且体外实验表明,天马颗粒

表3 天马颗粒剂各拆方组含药血清对大肠癌细胞增殖影响的方差分析表

源	自由度	Ⅲ型平方和	均方差	F	P
A	1	19 424	29 424	1160.0	0.001
B	1	543.57	543.57	32.462	0.029
C	1	273.99	273.99	16.363	0.056
D	1	1 263.3	1 263.3	75.446	0.013
E	1	2 143.3	2 143.3	127.998	0.008
F	1	3 571.0	3 571.0	213.264	0.005
G	1	259.45	259.45	15.494	0.059
H	1	440.02	440.02	26.278	0.036
I	1	1 854.3	1 854.3	110.74	0.009
J	1	2 721.8	2 721.8	162.55	0.006
K	1	12.460	12.460	0.7440	0.479
L	1	178.64	178.64	10.668	0.082
M	1	534.62	534.62	31.928	0.030
N	1	67.367	67.367	4.023	0.183
O	1	468.26	468.26	27.965	0.034
P	1	2.8760	2.8760	0.172	0.719
Q	1	298.01	298.01	17.797	0.052
误差	2	33.489	16.745		
总计	19	34 090	19 424		

注: $R^2=0.999$ (调整 $R^2=0.991$)。

剂可显著抑制大肠癌细胞增殖,诱导其凋亡^[11]。第一代方由 19 味药物组成,即蜈蚣、全蝎、马钱子、重楼、半边莲、黄柏、大黄、三棱、莪术、胆南星、海藻、夏枯草、黄芪、党参、当归、石斛、火麻仁、车前子、山药,经过近 20 年的临床应用、研究和总结,减去原方中马钱子和石斛后,配方精减至 17 味中药,即本实验所使用的配方。本实验旨在精减方药组成,优化天马颗粒剂的处方配伍。

正交试验设计是使用正交表来安排试验的方法,具有“均匀分散,齐整可比”的特点,是一种高效率、快速、经济的试验设计方法。在中药复方研究中,应用正交设计有利于分析中药复方配伍的主次关系,发现中药复方最佳配伍,指导临床合理用药^[12]。故本实验采用正交设计,探讨优化天马颗粒剂原方中药物的最佳配伍。本实验中所采用的 CCK-8 法,通过检测水溶性四唑盐被活细胞线粒体内脱氢酶氧化还原后生产的甲臞间接反映活细胞的数量,生成的甲臞物的数量与活细胞的数量成正比。本法具有灵敏度高,重复性较好,毒性低,操作简单,检测时间短的优点,已常规应用于生物活性因子检测、抗肿瘤药物筛选、肿瘤药敏试验、细胞增殖测定及细胞毒性检测等^[13-17]。本实验直观分析结果表明天马颗粒剂作用于大肠癌细胞的优化处方配伍为:蜈蚣 2 g,全蝎 3 g,半边莲 15 g,黄柏 6 g,三棱 10 g,胆南星 3 g,海藻 10 g,黄芪 20 g,山药 20 g,大黄 6 g。方差分析结果显示,天马颗粒剂原方中 17 味中药的主次顺序为:蜈蚣>三棱>海藻>黄柏>胆南星>半边莲>全蝎>黄芪>山药>大黄>火麻仁>重楼>莪术>当归>党参>夏枯草>车前子。天马颗粒剂原方对大肠细胞增殖抑制作用主要与蜈蚣、三棱、海藻、黄柏、胆南星、半边莲、全蝎、黄芪、山药、大黄等有关(均 $P<0.05$),与重楼、莪术、夏枯草、当归、党参、车前子、火麻仁等药无关(均 $P>0.05$)。

天马颗粒剂优化方中蜈蚣、全蝎攻毒散结、通络止痛,以毒攻毒为君药;半边莲味辛,性平,功效清热解毒、利水消肿,黄柏味苦,性寒,具有清热燥湿、解毒疗疮之效。二者合用清热解毒,共为臣药;三棱破血消积止痛,胆南星清热化痰,海藻软坚散结,黄芪、山药益气养阴以扶正,同时防攻伐之药耗伤正气,共为佐药;大黄泻下通腑以助大肠之传导,以通降为补,引邪外出,且兼活血化瘀之妙,为使药。全方具拔癌毒、消结肿、通经络、止疼痛之效。全方以攻毒祛邪为主,兼以扶正培本,攻补兼施,从而达到“祛邪不

伤正,扶正不留邪”的目的,切合大肠癌“毒、瘀、痰、虚”病因病机特点。

本实验通正交设计优化了天马颗粒剂配方组成,尚未对该优化处方进行更深一步研究,下一阶段拟在分子水平和体内外实验中对大肠癌细胞增殖和凋亡影响及体内的抑瘤效果进一步探索,为天马颗粒剂优化方治疗大肠癌提供相关实验依据。

参考文献:

- [1] SIEGEL R, DESANTIS C, JEMAL A. Colorectal cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117.
- [2] 陈万青,张思维,曾红梅,等.中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤,2014,23(1):1-10.
- [3] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, et al, Forman D. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011,61(2):69-90.
- [4] 李克桑,李琦.中医药防治大肠癌临床研究进展[J].辽宁中医杂志,2012,39(5):953-955.
- [5] 黄国栋,黄媛华,黄敏,等.天马颗粒剂配合希罗达治疗中晚期大肠癌的临床研究[J].中药材,2009,32(5):831-832.
- [6] 黄晨容,何永恒.天马颗粒剂对延长大肠癌根治术后生存期的临床研究[J].同济大学学报(医学版),2004,25(1):58-60.
- [7] 彭天书,谢彪,裴甜,等.天马颗粒剂在抑制结肠直肠癌术后肿瘤复发中的临床效果[J].中药药理与临床,2016,32(3):191-193.
- [8] 丁宁,杨宇飞,刘羿男,等.健脾活血解毒法拆方含药血清对人大肠癌细胞 HCT-116 细胞的增殖抑制作用及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):272-275.
- [9] 何永恒,成立祥,刘丽,等.大肠癌的中医药防治发展脉络初探(一)[J].中医药导报,2010,16(3):1-3.
- [10] 何永恒,成立祥,刘丽,等.大肠癌的中医药防治发展脉络初探(二)[J].中医药导报,2010,16(6):4-8.
- [11] 彭天书.天马颗粒剂的拆方研究[D].长沙:湖南中医药大学,2015.
- [12] 杨清华,孙博,郭艳艳,等.应用正交设计法筛选天麻钩藤饮优化处方研究[J].浙江中西医结合杂志,2009,19(7):410-412.
- [13] 张大伟,邢雪,邓乃梅,等.人肝癌细胞培养中 CCK-8 法与 BrdU-ELISA 法检测细胞增殖的比较[J].临床普外科电子杂志,2013,1(4):4-7.
- [14] 高丕尧,龙军先,甘嘉亮,等.CCK-8 法与 Alamar blue 法对 RKO 细胞株增殖活力测试条件的对比分析[J].华西药理学杂志,2015,30(1):38-41.
- [15] 陈冲,焦宁,靖景艳,等.台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J].中国医药导报,2013,10(12):24-26.
- [16] MA L, SONG B, JIN H, et al. Cinobufacini induced MDA-MB-231 cell apoptosis-associated cell cycle arrest and cytoskeleton function[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012,22(3):1459-1463.
- [17] KIM H, LIM H Y. Novel EGFR-TK inhibitor EKB-569 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by AKT and MAPK pathways[J]. J Korean Med Sci, 2011,26(12):1563-1568.