

· 学术探讨 ·

三拗汤类方宣肺功效的共性论析

范欣生^{1,2} 唐于平^{1,3} 许惠琴³ 徐立³ 俞晶华¹ 李育² 段金康¹

摘要 三拗汤及其后世历代衍化而成的类方系列,是中医治疗以咳嗽、哮喘为主证的呼吸病常用方剂,配伍宣肺祛风、宣泄化痰、宣肺化饮是其主要衍化形式。方中物质基础主要来源于其组方药材,但配伍后有效物质溶出量有变化,且有新成分产生。笔者通过多层次的效应评价发现,类方间既具有宣肺效应的共性特点,又存在据证衍化的优效性。其共性的效应途径涉及了保护结构细胞、抗炎、抗氧化和免疫调节等多个环节。

关键词 三拗汤;类方;宣肺

On the Commonness of San'ao Decoction and Its Analogous Formulas in Facilitating Fei FAN Xin-sheng^{1,2}, TANG Yu-ping^{1,3}, XU Hui-qin³, XU Li³, YU Jing-hua¹, LI Yu², and DUAN Jin-ao¹ 1 Key Laboratory of Chinese Medical Formulae Study, Nanjing (210023); 2 Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 3 Pharmacy College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023)

ABSTRACT San'ao Decoction (SD) and its analogous formulas derived in the following generations are common used prescriptions for treating pulmonary diseases with principal symptoms such as cough and asthma. They are usually compatible with Chinese herbs for facilitating Fei, dispelling wind, resolving phlegm and fluid retention. Material bases in these formulas are mainly derived from Chinese drugs, but dissolution contents of active components are changed and new components are produced after compatibility. By multilevel effect evaluation, these analogous formulas all have commonness in ventilating Fei and superiorities of evidence-based derivation. The effect pathway of commonness was involved in cell structure protection, anti-inflammation, antioxidant, and immuno-regulation.

KEYWORDS San'ao Decoction; analogous formulas; facilitating Fei

以方类方是在中医临床实践的历史发展中,在基本方基础上,根据辨证原则加减衍化而形成的方剂系列模式,经典方剂的类方体系是中医方剂组方理论的重要组成部分,反映了中医辨证组方思想和方法。分析经典方剂类方的配伍特点、效应的共性和各异性、辨识类方效应物质基础^[1],对阐明方剂复杂体系的科学内涵、揭示方剂配伍规律、创新方药研究具有重要意义。

笔者通过对经典方剂三拗汤及代表性衍化方进行系统研究,评价其共性基础和具有证特征的优势特点,分析中医宣肺效应、效应机制、功效物质,以此阐述中医经典方剂类方体系的科学内涵。

1 三拗汤类方特点

经典方剂三拗汤(出自《太平惠民和剂局方》)及其后世衍化而成的类方系列,是中医治疗以咳嗽、哮喘为主证的呼吸病常用方剂。三拗汤由麻黄、杏仁、甘草组成,具有宣肺散寒之功效,在临床呼吸病的治疗中应用十分广泛。统计《中医方剂大辞典》及现代文献报道中具有完整方药组成、剂量及疗程的治哮方剂 420 张,经关联规则分析,麻黄、杏仁、甘草 3 味药物的支持度最高,为 51.8%~62.4%,是哮喘发作期的一个重要基础方^[2]。以三拗汤类方为代表,探讨类方基本方的组方与主证特点、基本方与衍化方的配伍关系,具有典型意义。

三拗汤属于药味少而变化多的一类方剂,变化组方主要适用于肺气闭塞,失于宣降,发为咳嗽、痰喘之

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81473580, No. 1072748),国家“十一五”技支撑计划项目(No. 2006BAI06A02)

作者单位:1.江苏省方剂研究重点实验室(南京 210023);2.南京中医药大学基础医学院(南京 210023);3.南京中医药大学药学院(南京 210023)

通讯作者:范欣生, Tel: 025 - 85811945, E-mail: fanxsh@njutcm.edu.cn

证;同时通过加味配伍使主治证候进一步扩充。在配伍上主要是加味疏风解表、降气化痰、温肺化饮及清肺化痰等。如加减三拗汤(《普济方》)、五拗汤(《仁斋直指方》)、加味三拗汤(《张氏医通》)、加味三拗汤(《世医得效方》)、麻黄杏仁汤(《症因脉治》)、新加三拗汤(《重订通俗伤寒论》)及七拗汤《摄生众妙方》等。现代临床也多以三拗汤加减或与其他方组合运用。因此对于三拗汤类方研究更切中为临床治疗提供依据与指导。

三拗汤在呼吸病中应用主要以宣肺祛风、宣泄清化、宣肺化饮为主加味配伍形成其配伍衍化形式,如五拗汤、七拗汤、三拗汤加味方,在三拗汤核心方上分别加桔梗、荆芥以宣肺祛风平喘,加半夏、石膏、五味子、细辛以宣泄清化平喘,加细辛以宣肺化饮平喘,随病机变化加减,体现了类方基本方的典型性和类方的系统性特点。

课题组近年来通过三拗汤为代表的类方系统研究,认识到按照中医辨证思维认识类方、解读方剂并指导复方研究,分析类方核心方配伍、比较类方共性和差异性、辨识类方效应物质基础等也是阐明方剂复杂体系的科学内涵、揭示方剂配伍规律、创新方药研究的一个重要方面。研究中还发现,类方研究的优势在于,其核心组成结构的稳定性提供了可参照的基础,一系列加减衍化的类方效应以及作用靶点上的异同,形象地演示了配伍和变化的基本面貌;通过运用现代科学技术,揭示经典方剂类方效应、效应途径、效应基础(有效组分和有效成分)间的内在联系,有利于更全面的揭示临床用方的辨证特点、科学阐释方药配伍理论。比较分析类方共有规律与各异性,并由此切入揭示组方配伍规律是一条值得尝试的有效途径。

2 三拗汤类方宣肺共性效应与机制

2.1 三拗汤类方病证结合的宣肺效应评价

本课题组依据三拗汤主证哮喘,复制及制备小鼠、大鼠、豚鼠等多种哮喘模型,包括卵蛋白(OVA)致敏哮喘模型、合胞病毒(RSV)诱导重症哮喘模型、内毒素(LPS)诱导重症哮喘模型、低分子量化工原料偏苯三酸酐(TMA)诱导哮喘模型等,以动物体描箱气管插管和机械通气有创方法测定肺功能变化/乙酰胆碱(ACh)激发条件下气道反应性[肺阻力(RL)]、气道和肺组织炎细胞浸润、病理学改变,以及气管灌洗液(BALF)和血清中炎细胞和相关细胞因子水平变化,评价三拗汤基本方宣肺效应及代表性衍化方剂(五拗汤、七拗汤、三拗汤加味方)的全方、挥发性成分、水提液部分、醇沉淀部分、醇溶液回收乙醇后部分、环己烷

部分、正丁醇部分、乙酸乙酯(EtOAc)部分、正丁醇萃取后水部分等8个部位的效应,探讨类方的共性基础和辨证衍化的各异性。结果发现三拗汤基本方在抗气道变应性炎症、降低气道反应性、保护气道上皮细胞、抗呼吸道病毒等方面具有重要作用,是“宣肺”效应的共性基础。类方优效性具有证的衍化特点和效应的各异性,祛风宣肺类方在OVA致敏诱导哮喘方面、宣泄清化类方在病毒和内毒素诱导的重症哮喘方面、宣肺化饮类方在小分子化学物质诱导哮喘方面具有优效性。(1)三拗汤基本方对OVA致敏急、慢性哮喘小鼠模型具有降低气道阻力、BALF中嗜酸性细胞(EOS)百分率、降低BALF中白细胞介素(IL)-4等细胞因子水平、改善肺组织病理学的作用。类方主要效应部位在EtOAc和挥发油部分,其中类方五拗汤EtOAc部位不同剂量组作用尤为显著,可明显延长引喘潜伏期,降低行为学评分、气道阻力和BALF中EOS百分率、降低BALF中IL-4、IL-5,升高干扰素- γ (IFN- γ)、降低肺组织病理学评分^[3,4]。(2)呼吸道感染是临床哮喘急性加重及慢性气道炎症改变的重要原因。以OVA致敏结合OVA持续雾化吸入和滴低度RSV多次气道激发的方法制备急性病毒性哮喘模型。结果提示三拗汤类方不同程度降低气道阻力和炎症病变、BALF中炎细胞总数、EOS百分率、改善BALF中Th1/Th2相关因子水平,其中以类方七拗汤以及活性部位具有显著作用^[5,6]。(3)临床上细菌感染能够与其他可导致气管炎症的物质(如过敏物)相互作用,加重气道炎症。建立OVA致敏激发结合LPS诱导BALB/c小鼠加重型哮喘模型,检测气道炎症、气道阻力以及BALF中炎症因子水平变化,结果见七拗汤对气道炎症和气道阻力的影响优于基本方,对LPS加重型哮喘有良好的干预作用;主要活性部位为正丁醇和EtOAc部位^[7-9]。(4)职业性哮喘是指接触工作环境中某些化学致喘物而诱发的哮喘。采用TMA作为致敏剂建立大鼠哮喘模型。通过检测模型动物行为学体征、血及BACF细胞水平变化、肺组织病理学、离体气管条ACh激发收缩变化,对三拗汤类方及活性部位进行评价。结果提示类方中,三拗汤加味对TMA致哮喘模型大鼠各指标的改善最为明显,其EtOAc部位对TMA致哮喘模型作用较优,且呈明显的量效关系^[10,11]。

2.2 三拗汤类方的功效途径

三拗汤类方的功效途径比较复杂,研究证实至少包括以下方面。(1)三拗汤类方其效应部位及成分激活过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)。PPAR γ 是核受体超家族成员,参与炎症控制并具有免疫调节

作用。采用诱导荧光素酶报道基因方法,对三拗汤类方、各不同部位及三拗汤 10 个效应成分的检测发现,芒柄花素和三拗汤 EtOAc 部位具有量效关系,当芒柄花素被逐渐加入到已被分离芒柄花素的 EtOAc 中,其量效关系的变化趋势与芒柄花素的量效关系基本相同,表明芒柄花素可能是激活三拗汤中 PPAR γ 的主要活性成分。对芒柄花素干预 OVA 致敏小鼠哮喘模型进行了效应验证,该成分也是三拗汤干预哮喘的主要效应成分之一^[12,13]。此方法适用于其他复杂中药活性物质的研究。(2)对支气管上皮细胞嗜酸细胞趋化因子(EOTaxin) mRNA 表达和细胞因子的影响。建立 IL-4 刺激人支气管上皮细胞损伤模型,用三拗汤不同剂量予以干预,结果大剂量三拗汤对细胞的保护作用最强,有效降低细胞的凋亡率、支气管上皮细胞 EOTaxin-3 表达量,说明三拗汤可以降低经 IL-4 刺激后的气道炎症反应,减少 EOS 在气管上皮细胞的募集^[14]。其主要活性成分甘草酸、芒柄花素、麻黄碱、苦杏仁苷等作用明显,且具有剂量依赖性。(3)对树突细胞(DC)成熟和分化的影响。成熟分化的 DC 是专职性抗原递呈细胞,能显著刺激初始 T 细胞增殖,可调节 Th1/Th2 反应。三拗汤对发作期患者外周血单核细胞来源的 DC 成熟具有影响,提示其对 DC 成熟和分化的抑制是其治疗哮喘的可能机制之一^[15]。(4)对 Treg/Th17 平衡的调节。既往 Th1/Th2 失衡理论在研究哮喘发病机制中发挥了重要作用,近年来 Treg/Th17 相关效应机制受到关注^[16]。在急性哮喘小鼠模型中,实验发现 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞数在 CD4⁺ 细胞中所占的比例较正常对照组明显降低,三拗汤高、中、低剂量组不同程度提高急性哮喘小鼠体内 Treg 水平;而在慢性哮喘小鼠模型中,Th17/Treg 较正常对照组明显升高,三拗汤 EtOAc 部位组明显提高慢性哮喘小鼠体内 Treg 水平,降低慢性哮喘小鼠体内 Th17 水平,提示三拗汤能同时通过调节机体的 Treg/Th17 水平而发挥抗哮喘的作用^[17]。(5)对内源性物质代谢的影响。三拗汤可调节内源性物质代谢。如溶血性磷脂酰胆碱的不同亚型、前列腺素、白三烯、雌激素等,三拗汤通过调节这些物质代谢发挥抗哮喘和气道炎症的作用。(6)三拗汤及类方体外对合胞病毒、甲型流感病毒 H1N1、乙型流感病毒具有程度不同的抑制作用,综合评价以挥发部分和 EtOAc 部分效应更为显著。

3 三拗汤配伍效应的物质基础

通过提取分离与生物效应跟踪评价,发现 EtOAc 部位和挥发油部位为三拗汤及其类方主要效应物质部

位。运用气相-质谱联用(GC-MS)分段式对三拗汤及其类方以及组方药材的挥发性成分进行比较,发现方中成分主要来源于其组方药材,但各方皆有新成分产生;采用高效液相串联质谱法(HPLC/ESI-MS)对各方效应部位 EtOAc 部位主要色谱峰进行归属与指认和比较,有效物质的溶出受药物相互作用的影响有增有减。三拗汤及组方药材在比格犬体内药动学显示,配伍前后的药动学也存在显著性差异。综合来看,配伍共煎对方剂有效成分确存在一定影响。

3.1 三拗汤及类方挥发部位的化学成分

本课题组从三拗汤及其组方药材挥发油中鉴定出 50 个化合物、从三拗汤加味及其组方药材挥发油中鉴定出 86 个化合物、从五拗汤及其组方药材挥发油中鉴定出 105 个化合物、从七拗汤及其组方药材挥发油中鉴定出 84 个化合物,分别发现 2~11 个峰仅在类方中发现而在单味药材中未检测到^[18-21],显示共煎液后可能存在新的成分。

3.2 三拗汤及类方水提部位的化学成分

对三拗汤共性部分进行色谱、光谱分离和结构鉴定,共得到 11 个化合物,鉴定其化学结构:糖苷类 2 个,为苦杏仁苷及甘草酸;黄酮类 3 个,为芒柄花素、甘草素和异甘草素;甾醇类 1 个,为 β -谷甾醇;有机酸类 3 个,为苯甲酸、琥珀酸及正三十烷酸;生物碱类 2 个,为麻黄碱及伪麻黄碱;以及苦杏仁苷的水解产物扁桃腈^[22]。有效物质的定量比较分析,甘草、麻黄和杏仁在组成方剂三拗汤后有效物质的溶出受药物相互作用有增有减。三拗汤及其类方效应部位的 HPLC/ESI-MS 分析表明,各类方中检识的主要化学成分为黄酮类、小分子有机酸,包括少量木质素和香豆素等^[23,24]。

3.3 三拗汤及组方药材比格犬体内药动学比较

三拗汤配伍前后的药动学存在明显差异,尤其是药物浓度-时间曲线下面积、血药峰浓度、达峰时间、半衰期等,可知三拗汤配伍后有效成分生物利用度有显著提高,在体内发挥疗效时间延长^[25]。就这个现象而言,三拗汤配伍在药动学角度上体现了其优越性,为三拗汤在临床治疗哮喘等疾病提供了理论基础。

总之,类方衍化形式以及其共性和各异性特点的认识,对方剂研究具有重要价值。围绕基本方的主证特点和系列方衍化特征,建立能够反映中医治疗优势的类方效应评价体系和方-证-病相关联的类方研究模式,形成多层次、多指标观察类方生物效应、比较类方共性规律及优效性、主要药效部分与整体功效的相关性等共性关键技术,是进行类方复杂体系研究的关键点。

笔者以经典方剂三拗汤为切入点,通过体内、体外,整体水平-组织器官水平-细胞分子水平的类方效应评价,以三拗汤、五拗汤、七拗汤、三拗汤加味方的全方、部位、组分等分层次进行了以哮喘为主证的类方综合效应系统研究,客观评价了不同病原诱导条件下的类方效应和具有证特征的优势方剂,阐述了中医宣肺平喘以及临床据证灵活加减的科学内涵。依据生物效应追踪物质基础,分析三拗汤主要活性成分,对比部位和单体的量效关系,验证其主要活性成分以确认类方的共性效应基础。此方法也为研究其它中药复方的生物活性奠定一定基础,提高了新药创制的针对性,适用于中医方剂的系统研究。

参 考 文 献

- [1] 范欣生,段金廛,丁安伟,等.类方研究的四个层面[J].中国中西医结合杂志,2010,30(3):246-251.
- [2] 张欢,范欣生,王崇骏,等.古今哮喘方用药规律对比的关联规则研究[J].中国中医药信息杂志,2009,16(3):94-96.
- [3] 马春华,汪姗姗,马世平,等.三拗汤对哮喘小鼠变应性气道炎症的影响及其成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):149-153.
- [4] 汪珊珊,范欣生,徐立,等.基于正交试验的三拗汤配伍关系研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(20):149-153.
- [5] 许惠琴,顾鹏程,范欣生,等.三拗汤及其类方对 RSV 诱导的哮喘小鼠气道反应性的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2009,11(5):702-706.
- [6] 张颖,童黄锦,俞晶华,等.三拗汤类方对哮喘小鼠气道炎症反应的影响[J].中西医结合学报,2009,7(4):354-359.
- [7] 顾鹏程,许惠琴,范欣生,等.内毒素诱导致敏小鼠建立支气管哮喘动物模型的实验研究[J].中华结核和呼吸杂志,2010,1(33):56-59.
- [8] Jiang CX, Fan XS, Gu PC, et al. The effect of Qi'ao Decoction on ovalbumin induced and lipopolysaccharide enhanced severe asthma mice and its mechanism [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(6): 638-644.
- [9] Gu P, Fan XS, Jiang C, et al. Effect of San'ao Decoction on the airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of lipopolysaccharide-enhanced asthma[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(7): 537-541.
- [10] 徐立,时乐,冯里,等.偏苯三酸酐诱导职业性哮喘大鼠模型的研究[J].国际呼吸杂志,2012,32(20):1536-1540.
- [11] 汪珊珊,冯理,徐立,等.三拗汤及加味对 TMA 致大鼠哮喘模型气道炎症的影响[J].南京中医药大学学报,2011,(6):542-545.
- [12] Zhou L, Tang YP, Gao L, et al. Separation, characterization and dose-effect relationship of the PPAR γ -activating bioactive constituents in the Chinese herb formulation 'San-Ao Decoction' [J]. Molecules, 2009, 14(10): 3942-3951.
- [13] Zhou L, Tang YP, Liu CM, et al. Chemical constituents from San-ao Decoction and their effects on the activation of PPAR γ [J]. Asian Chemistry Lett, 2009, 13(1&2): 47-52.
- [14] Li Y, Wang MY, Fan XS, et al. Effect of San-ao Decoction, a traditional Chinese prescription, on IL-4 treated normal human bronchial epithelium [J]. Ethnopharmacology, 2010, 131(1): 104-109.
- [15] 李育,姜静,齐栩,等.三拗汤对人外周血来源的树突状细胞成熟的影响[J].临床肺科杂志,2008,13(11):1415-1416.
- [16] Singh A, Yamamoto M, Ruan J. Th17/Treg ratio derived using DNA methylation analysis is associated with the late phase asthmatic response [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2014, 10(1): 32.
- [17] Li Y, Fan XS, Shang EX, et al. CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells, Foxp3 gene and protein expression's contribution to anti-asthmatic effects of San'ao Decoction in mice model of asthma [J]. Phytomedicine, 2014, 21(5): 656-662.
- [18] 周玲,唐于平,吴德康,等.五拗汤及其组方药材挥发油 GC-MS 比较分析[J].中国中药杂志,2009,34(10):1245-1250.
- [19] 周玲,范欣生,吴德康,等.三拗汤及其组方药材挥发性成分比较分析[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(2):1-4.
- [20] 周玲,范欣生,唐于平,等.气相色谱-质谱联用分析三拗汤加味及其组方药材挥发性成分[J].中国药科大学学报,2008,39(6):515-518.
- [21] Ma CH, Qian YF, Fan XS, et al. Using UPLC-QTOF-MS to analyze the chemical changes between traditional and dispensing granule decoctions of San-Ao-Tang [J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52(4): 277-292.
- [22] 周玲.三拗汤治疗支气管哮喘的效应物质基础研究[D].南京:南京中医药大学,2009.
- [23] Shu XY, Tang YP, Jiang CX, et al. The quantitative comparative analysis for nine main bioactive components of San-Ao Decoction, its herb pairs and three single herbs [J]. J Liq Chromatogr R T, 2013, 36(8): 1030-1042.
- [24] Shu X, Tang Y, Jiang C, et al. Comparative analysis of the main bioactive components of San-ao Decoction and its series of formulations [J]. Molecules, 2012, 17(11): 12925-12937.
- [25] Ma CH, Ma ZQ, Fu Q, et al. Pharmacokinetic properties of ephedrine, amygdalin and glycyrrhizic acid after oral gavage of San-Ao-Decoction in beagle dogs using a UPLC-MS method [J]. Anal Methods, 2013, 8(5): 2119-2125.

(收稿:2014-06-15 修回:2015-07-25)