

基于主成分分析、聚类分析和典型相关分析的漏芦 抗胃癌谱效关系探索

于海帅*

(吉林工业职业技术学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:**研究漏芦化学成分和抗胃癌药效之间的谱效关系。**方法:**采用 HPLC 分析 7 种产地漏芦的化学成分,对共有峰进行主成分分析,根据相关系数矩阵、特征值和累计方差贡献率,初步推断漏芦的主成分;采用噻唑蓝法检测 7 种产地漏芦抑制胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 增殖的作用,对 7 批漏芦进行聚类分析;利用典型相关分析对漏芦成分、药效数据进行相关分析。**结果:**在漏芦 17 个共有峰中,主成分为迷迭香酸、齐墩果酸和甾甾醇。7 个产地漏芦抑制 SGC-7901 细胞和 AGS 细胞增殖的作用顺序均为河南 > 山东 > 辽宁 > 山西 > 安徽 > 江苏 > 甘肃。聚类分析显示河南和山东产地为 1 类,辽宁和山西产地为 1 类,安徽、江苏和甘肃产地为 1 类。**结论:**河南产地的漏芦抑制胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 增殖的作用最强,漏芦抗胃癌的主成分可能为迷迭香酸、齐墩果酸、甾甾醇等。

[关键词] 漏芦; 抗胃癌; 谱效关系; 主成分分析; 聚类分析; 典型相关分析

[中图分类号] R945;R284.1;R285.5;R283.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210027

Research on Spectrum-activity Relationship of Echinopsis Radix for Anti-gastric Cancer Based on Principal Component Analysis, Cluster Analysis and Canonical Correlation Analysis

YU Hai-shuai*

(Jilin Vocational College of Industry and Technology, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To study on spectrum-activity relationship between chemical composition and anti-gastric cancer efficacy of Echinopsis Radix in Yuzhou. **Method:** Chemical composition in Echinopsis Radix from seven regions was analyzed by HPLC, and principal component analysis was carried out for its comom peak, according to correlation coefficient matrix, characteristic value and accumulated variance contribution rate, principal components of Echinopsis Radix were inferred. MTT was used to assay proliferation inhibition rate of Echinopsis Radix from seven regions for gastric cancer cell line SGC7901 and AGS, then for cluster analysis. Canonical correlation analysis was used to analyze relationship between chemical composition and anti-gastric cancer efficacy of Echinopsis Radix. **Result:** Principal components of Echinopsis Radix were rosmarinic acid, oleanolic acid and stigmasterol in seventeen common peaks. Proliferation inhibition rates of Echinopsis Radix from different region on SGC-7901 and AGS cell were in the order of Henan > Shandong > Liaoning > Shanxi > Anhui > Jiangsu > Gansu. Cluster analysis showed that Henan and Shandong classified the same species, Liaoning and Shanxi classified the same species, Anhui, Jiangsu and Gansu classified the same species. **Conclusion:** Echinopsis Radix from Henan has the strongest proliferation inhibition effect on gastric cancer cell line SGC7901 and AGS. Rosmarinic acid, oleanolic acid and stigmasterol in Echinopsis Radix may be these principal components for anti-gastric cancer.

[Key words] Echinopsis Radix; anti-gastric cancer; spectrum-activity relationship; principal component analysis; cluster analysis; canonical correlation analysis

[收稿日期] 20150818(015)

[通讯作者] * 于海帅, 硕士, 副教授, 从事中药化学研究, Tel:13844631856, E-mail: yuhaishuaijl@163.com

漏芦味苦,性寒,归胃经,功效清热、解毒、消痈、除肿等^[1-2]。药理研究显示漏芦具有抗肿瘤、抗氧化、促进免疫等作用^[3-4]。漏芦中含有三萜类、甾醇类、酚酸类、黄酮类、植物激素等化合物^[5],其中三萜类、甾醇类和酚酸类成分具有显著的抗肿瘤药理活性^[6-10],有可能是该药物抗癌症的主要活性成分。漏芦临床用于抗肿瘤已有一定时间,但其抗肿瘤的物质基础有待进一步阐明。本实验拟通过考察漏芦醇提部位对胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 的抑制作用,建立不同产地漏芦的 HPLC 图谱,结合主成分分析、聚类分析、典型相关性分析探讨漏芦抗胃癌的成分和药效之间的谱效关系,为进一步研究漏芦抗胃癌的药效物质基础研究提供依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AG135 型 1/1 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。漏芦共 7 批,产地分别为河南、山东、辽宁、山西、安徽、江苏、甘肃,批号依次为 20140703001, 20140703002, 20140703003, 20140703004, 20140703005, 20140703006, 201407007,均购自安徽亳州,经南京中医药大学药理学教研室吴德康教授鉴定;甘草苷、迷迭香酸、齐墩果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110885-200102, 110839-200403, 110709-200505, 110546-13060501, 110945-13101515),人胃癌细胞株 SGC-7901 和 AGS 均购于中国科学院上海细胞生物研究所,水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备

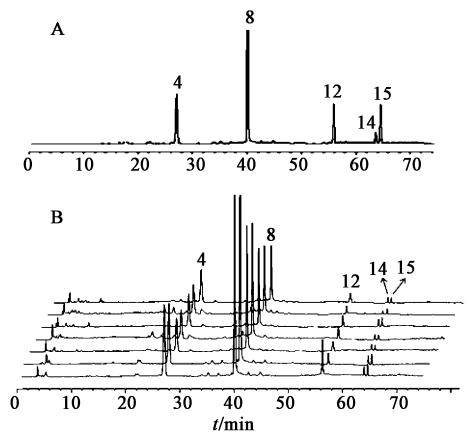
2.1.1 漏芦提取物^[3] 取漏芦适量,加 10 倍量 80% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,减压回收溶剂,即得。

2.1.2 供试品溶液 精密称取漏芦粉末(过四号筛)约 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 40 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,加甲醇补足缺失的质量,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.3 对照品溶液 精密称取甘草苷、迷迭香酸、齐墩果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇 2.0, 2.0, 1.0, 1.0, 1.0 mg,分别置于 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液。

2.2 HPLC 分析 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇(A)-0.04%

冰乙酸(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 10% A; 5 ~ 20 min, 10% ~ 25% A; 20 ~ 30 min, 25% A; 30 ~ 35 min, 25% ~ 45% A; 35 ~ 45 min, 45% A; 45 ~ 70 min, 45% ~ 100% A),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 25 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。见图 1 和表 1,得 17 个共有峰。



A. 混合对照品; B. 供试品; 4. 甘草苷; 8. 迷迭香酸; 12. 齐墩果酸; 14. β -谷甾醇; 15. 豆甾醇

图 1 不同产地漏芦的 HPLC

Fig. 1 HPLC of Echinopsis Radix from different region

表 1 不同产地漏芦中共有峰的峰面积

Table 1 Total peak areas of Echinopsis Radix from different region

No.	河北	山东	辽宁	山西	安徽	江苏	甘肃
1	726.7	543.1	432.1	322.1	289.2	119.0	89.1
2	841.7	762.3	673.3	610.3	521.3	486.5	278.9
3	354.7	219.4	200.7	174.3	163.9	148.9	76.4
4	2 882.9	1 549.0	1 329.0	1 183.2	976.3	872.3	498.2
5	6 512.3	5 210.4	4 219.0	3 876.0	3 211.4	2 311.0	890.4
6	1 653.4	983.4	764.3	653.2	587.3	478.2	267.2
7	1 621.1	872.1	742.2	642.3	532.3	428.2	214.9
8	1 161.5	973.1	842.5	720.3	641.0	524.9	286.4
9	5 670.8	4 921.8	4 123.0	3 538.2	3 022.5	2 563.0	1 021.0
10	11 170.0	9 736.2	8 723.4	7 652.1	6 211.0	4 398.1	1 765.4
11	2 600.3	1 832.4	987.4	670.3	532.1	411.8	178.0
12	1 439.1	943.0	720.3	643.2	543.1	421.3	176.4
13	8 349.0	6 732.4	5 109.8	4 065.2	2 072.2	1 052.1	512.4
14	2 786.1	1 032.3	765.3	654.2	421.0	276.2	127.9
15	694.6	542.2	421.0	319.0	243.1	132.0	67.0
16	608.4	548.3	421.9	365.9	219.4	101.3	43.9
17	4 899.4	3 921.5	2 764.2	2 100.3	1 532.9	1 087.5	654.2

2.3 主成分分析 以 7 个产地漏芦提取物共有峰峰面积为变量进行主成分分析,结果发现前 4 个因子的累计方差贡献率 100%,故选取前 4 个主成分

进行评价。第 1 主成分贡献度最显著,其中迷迭香酸、齐墩果酸、豆甾醇等载荷较高,说明第 1 主成分主要反映了这 3 种化学成分指标的信息;第 2 主成分主要体现甘草苷的信息。根据漏芦中各化学成分在不同因子上的载荷,可初步推断漏芦的主成分是以迷迭香酸为主的酚酸类,以齐墩果酸为主的三萜类,以豆甾醇为主的甾醇类,见表 2,3。

表 2 漏芦中各成分的特征值和方差贡献率

Table 2 Characteristic value and variance contribution rate of each component in Echinopsis Radix

成分	初始特征值			提取平方和载入		
	特征值	方差 /%	累积贡献率 /%	特征值	方差 /%	累积贡献率 /%
1	25.77	95.43	95.43	25.77	95.43	95.43
2	0.78	2.88	98.31	0.78	2.88	98.31
3	0.33	1.24	99.54	0.33	1.24	99.54
4	0.02	0.08	100.00	0.02	0.08	100.00

表 3 漏芦的主成分矩阵

Table 3 Principal component matrix of Echinopsis Radix

成分	主成分			
	1	2	3	4
1	0.971	-0.018	-0.008	0.093
2	0.965	-0.169	0.171	-0.092
3	0.959	0.226	0.160	-0.048
甘草苷	0.949	0.305	0.070	0.019
5	0.985	-0.072	0.140	-0.024
6	0.968	0.247	0.027	-0.013
7	0.960	0.268	0.076	0.028
迷迭香酸	0.987	-0.091	0.126	-0.040
9	0.976	-0.138	0.144	-0.085
10	0.959	-0.204	0.195	0.016
11	0.975	0.137	-0.160	-0.064
齐墩果酸	0.987	0.140	0.065	-0.027
13	0.991	0.065	-0.109	-0.028
β -谷甾醇	0.913	0.401	0.001	0.072
豆甾醇	0.997	-0.053	-0.012	0.056
16	0.971	-0.205	0.014	0.097
17	0.988	0.122	-0.095	-0.016

2.4 综合评价 将漏芦 4 个主成分对漏芦进行综合评价,其综合评价函数为 $F = 0.95430F_1 + 0.02877F_2 + 0.01237F_3 + 0.02650F_4$,结果发现不同产地漏芦的综合得分 (F) 及得分排名为河南 (40.354) > 山东 (20.778) > 辽宁 (5.327) > 山西

(-3.514) > 安徽 (-11.724) > 江苏 (-31.252) > 甘肃 (-43.485),产地河南的漏芦综合得分最高,道地药材具有优质性,见表 4。

表 4 不同产地漏芦主成分值

Table 4 Principal component values of Echinopsis Radix from different region

产地	F_1	F_2	F_3	F_4
河北	42.251	1.290	-0.055	-0.108
山东	21.815	-1.154	-0.391	-0.068
辽宁	5.600	-0.715	0.176	0.053
山西	-3.677	-0.356	0.314	0.054
安徽	-12.289	0.009	0.265	-0.016
江苏	-32.760	0.513	-0.478	0.079
甘肃	-45.584	0.386	0.698	-0.153

2.5 漏芦对胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 存活率的影响 取对数期的细胞 SGC-7901 和 AGS^[11-14],经胰酶消化后制成细胞悬液,调整细胞密度 1×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,每组设 6 个复孔,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h,取出 96 孔板,吸去培养基,加入药液使药物终质量浓度分别为 0.063,0.125,0.250,0.500,1.000 $g \cdot L^{-1}$,同时设定空白孔、阳性对照孔顺铂,给药质量浓度 10 $mg \cdot L^{-1}$,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中 24 h。加入噻唑蓝 (MTT) 10 μ L,继续孵育 4 h,每孔加入二甲基亚砷 100 μ L,振荡 10 min,于 570 nm 处测定吸光度 A ,计算肿瘤细胞生长抑制率 ($n = 3$)^[15-17]。不同产地漏芦对 SGC-7901 细胞和 AGS 细胞的增殖均有抑制作用,抑制作用的强弱顺序均为河南 > 山东 > 辽宁 > 山西 > 安徽 > 江苏 > 甘肃,河南产地的漏芦抑制作用均为最强,见表 5。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$$

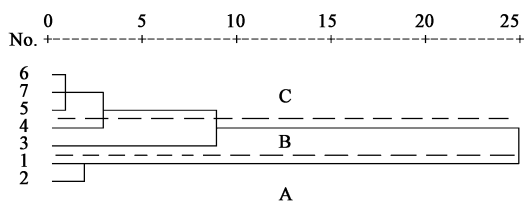
表 5 不同产地漏芦抑制胃癌细胞增殖的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 IC_{50} of Echinopsis Radix from different region on gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) $mg \cdot L^{-1}$

产地	SGC-7901 细胞	AGS 细胞
河南	331.73 \pm 24.60	383.35 \pm 17.03
山东	375.20 \pm 23.14 ¹⁾	407.06 \pm 18.46 ¹⁾
辽宁	406.06 \pm 26.45 ¹⁾	423.76 \pm 23.70 ¹⁾
山西	437.50 \pm 18.96 ¹⁾	483.36 \pm 16.08 ¹⁾
安徽	455.33 \pm 20.11 ²⁾	509.36 \pm 22.74 ²⁾
江苏	490.17 \pm 29.06 ²⁾	544.74 \pm 16.35 ²⁾
甘肃	526.03 \pm 30.90 ²⁾	572.08 \pm 19.40 ²⁾

注:与河南产地比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

2.6 聚类分析 以 7 个产地漏芦提取物抑制胃癌细胞增殖的半抑制浓度 (IC_{50}) 为变量,利用欧氏不相似系数平方矩阵,采用 Within-groups linkage 聚类法和欧氏距离系数对漏芦进行聚类分析。当阈值 > 20 时,可将其分为 2 类,河南产地和山东产地被划分为第 1 类,其他产地被划为第 2 类;当阈值介于 5 ~ 10 时,可将第 2 类继续细分为 3 类,即辽宁为 1 类,山西为 1 类,安徽、江苏和甘肃为 1 类。从整体上观察,可将其划分为连续的 3 个区域,其中 C 区位于聚类图的最上层,为安徽、江苏、甘肃产地的漏芦;B 区位于聚类图的中间层,为辽宁和山西产地的漏芦;A 区位于聚类图的底层,为河南和山东产地的漏芦,见图 2。



1. 河南;2. 山东;3. 辽宁;4. 山西;5. 安徽;6. 江苏;7. 甘肃

图 2 不同产地漏芦的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *Echinopsis Radix* from different region

2.7 典型相关分析 将漏芦醇提部位抑制胃癌细胞 SGC-7901 和 AGS 增殖的 IC_{50} 统一化变换后的数值为变量 U_1 和 U_2 ,描述不同产地漏芦抗胃癌药效;以 7 个产地漏芦共有峰中 8 号峰迷迭香酸 (A_8),12 号峰齐墩果酸 (A_{12}) 和 15 号峰豆甾醇 (A_{15}) 的峰面积对数为变量 V ,描述不同产地漏芦的化学信息。通过典型相关分析得出 U 和 V 的线性方程 $U_1 = -1.436\ln A_8 + 0.764\ln A_{12} + 0.402\ln A_{15}$, $U_2 = -0.306\ln A_8 + 0.217\ln A_{12} + 0.039\ln A_{15}$ 。说明迷迭香酸抑制胃癌细胞增殖的作用呈负相关,而齐墩果酸和豆甾醇抑制胃癌细胞增殖的作用则呈正相关。提示漏芦由迷迭香酸、齐墩果酸和豆甾醇等成分共同发挥抗胃癌药效,各成分对药效影响各异。

3 讨论

以漏芦共有峰为变量进行主成分分析,得到特征主成分信息,漏芦抗胃癌的主成分可能为以迷迭香酸为主的酚酸类,以齐墩果酸为主的三萜类,以豆甾醇为主的甾醇类等。以漏芦抑制 2 种胃癌细胞增殖的药效为变量进行聚类分类,获取不同产地漏芦分类差异的信息,河南和山东产地为 1 类,辽宁和山西产地为 1 类,安徽、江苏和甘肃产地为 1 类。河南产地漏芦抗胃癌作用最显著,提示道地产区为河南。

漏芦抗胃癌谱效关系研究中数据处理分析的核

心方法是典型相关性分析,将色谱和药效数据有效结合进行总体调控,最大限度地利用了数据信息,剔除相似性相对较差的变量,找出变量之间的相关性,精确数据,实现化学成分与药效 2 组变量之间的相关性分析^[18-20]。研究表明漏芦抑制胃癌细胞增殖的作用、主成分综合评价、聚类分析结果存在紧密联系。河南产地漏芦抑制胃癌细胞增殖的作用最强,综合评价得分最高;山东产地漏芦第 2;辽宁和山西产地漏芦居中;安徽和江苏产地漏芦较差;甘肃产地的漏芦抑制胃癌细胞增殖的作用最差,综合评价得分最低。说明漏芦抑制胃癌细胞增殖的作用越强,综合评价得分越高,药效更好。

单纯的 HPLC 图谱并不能体现化学成分与药效之间的相互关系,不能充分说明中药的整体性作用和多成分协同作用。将 HPLC 图谱与药效评价相结合进行相关性研究,可阐明中药可能的活性成分及各成分之间的协同作用。色谱解析和药效数据往往较为繁复,经典的数据处理方法渐渐显示出弱势性,恰当结合运用主成分分析、聚类分析、典型相关分析等数理统计学方法对数据进行简化精确处理,可进一步为漏芦抗胃癌的谱效关系和物质基础研究提供参考。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,2010:184.
 [2] 吴普. 神农本草经 [M]. 太原:山西科学技术出版社,2010:72.
 [3] 汪毅. 漏芦化学成分及生物活性研究 [D]. 沈阳:沈阳药科大学,2008.
 [4] Wang J, Gu S S, Pang N, et al. Alkyl caffeates improve the antioxidant activity, antitumor property and oxidation stability of edible oil [J]. PLoS One, 2014, 9 (4):e95909.
 [5] Zhang X P, Zhang J, Dong M, et al. Chemical constituents of plants from the genus *Rhaponticum* [J]. Chem Biodivers, 2010, 7(3):594-609.
 [6] Gleice G R, Marisol S, Kelly A L, et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(23):7355-7360.
 [7] Baskar A A, Ignacimuthu S, Paulraj G M, et al. Chemopreventive potential of β -sitosterol in experimental colon cancer model-an *in vitro* and *in vivo* study [J]. BMC Complement Altern Med, 2010, doi: 10.1186/1472-6882-10-24.
 [8] Shanthi S V, Raosaheb K K, Rana P S, et al. β -sitosterol

- induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2013,doi:10.1186/1472-6882-13-280.
- [9] Rzepecka-Stojko A, Kabała-Dzik A, Moździerz A, et al. Caffeic acid phenethyl ester and ethanol extract of propolis induce the complementary cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines [J]. Molecules, 2015,20(5):9242-9262.
- [10] Han S, Yang S, Cai Z, et al. Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in gastric cancer cells[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, doi: 10.2147/DDDT.S82342.
- [11] Sui C G, Meng F D, Li Y, et al. Antiproliferative activity of rosamultic acid is associated with induction of apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and caspase activation in human gastric cancer (SGC-7901) cells[J]. Phytomedicine, 2015, 22(9):796-806.
- [12] Zhu H, Zheng J, Zhang J, et al. Anticancer effect of 2,7-dihydroxy-3-methylanthraquinone on human gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Pharm Biol, 2016, 54(2):285-292.
- [13] Sun Z H, Bu P. Downregulation of phosphatase of regenerating liver-3 is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis induced by emodin in the SGC-7901 human gastric carcinoma cell line [J]. Exp Ther Med, 2012, 3(6):1077-1081.
- [14] Choi H S, Seo H S, Kim J H, et al. Ethanol extract of paeonia suffruticosa Andrews (PSE) induced AGS human gastric cancer cell apoptosis via fas-dependent apoptosis and MDM2-p53 pathways [J]. J Biomed Sci, 2012, doi:10.1186/1423-0127-19-82.
- [15] Wu X, Liao H B, Li G Q, et al. Cytotoxic rotenoid glycosides from the seeds of *Amorpha fruticosa* [J]. Fitoterapia, 2015, doi:10.1016/j.fitote.2014.11.015.
- [16] Chen S, Zhang Y, Zhao C, et al. Hawaiiolides E-G, cytotoxic cassane and eleistanthane diterpenoids from the entomogenous fungus *Paraconiothyrium hawaiiense* [J]. Fitoterapia, 2014, doi:10.1016/j.fitote.2014.09.021.
- [17] Gu G F, An L, Fang M, et al. Efficient one-pot synthesis of tigogenin saponins and their antitumor activities [J]. Carbohydr Res, 2014, doi: 10.1016/j.carres.2013.10.015.
- [18] 惠周利. 聚类分析中的若干问题研究及应用 [D]. 太原:中北大学, 2008.
- [19] 陈峰. 医用多元统计分析方法 [M]. 北京:中国统计出版社, 2006:125-127.
- [20] 张华锋, 刘炯, 张杰, 等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(19):2696-2702.

[责任编辑 刘德文]