

基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠 脑保护作用的谱效关系

王莹, 吴红杰, 管庆霞, 陈大忠*, 王云鹏
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:探讨芍药甘草汤物质组分对癫痫小鼠脑组织中丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)和三磷酸腺苷(ATP)酶水平影响的谱效关系,揭示芍药甘草汤抗癫痫作用的物质基础。方法:利用HPLC建立15批芍药甘草汤煎液的指纹图谱,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min,19%A;15~45 min,19%~50%A;45~46 min,50%~90%A;46~48 min,90%A),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长237 nm。采用青霉素诱导小鼠癫痫模型,考察15批芍药甘草汤煎液对癫痫模型小鼠脑组织中MDA,SOD和ATP酶水平的影响;利用灰色关联分析法将15批芍药甘草汤煎液指纹图谱特征峰峰面积与药效学指标MDA,SOD和ATP酶活性进行关联分析,建立不同物质组分与药效学指标之间的谱效关系数学模型。结果:芍药甘草汤煎液能够提高癫痫小鼠脑组织中ATP酶和SOD的含量,降低MDA含量,且大部分具有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)。在15批芍药甘草汤煎液的指纹图谱中标定出了28个共有峰,其中15个特征峰。灰色关联分析法发现对MDA,SOD和ATP酶活性影响有贡献的特征峰包括2号峰(芍药内酯苷),3号峰(芍药苷),5号峰(甘草苷)等,具体排序为3号峰>6号峰>12号峰>8号峰>2号峰>5号峰>9号峰>4号峰>10号峰>7号峰>13号峰>11号峰>15号峰>1号峰>14号峰。结论:芍药甘草汤是通过多组分协同作用来影响癫痫小鼠脑组织中SOD,MDA和ATP酶活性的。将灰色关联分析法引入中药复方组分与药效之间的谱效关系相关性评价中,能客观反映中药多组分协同发挥药效作用的本质,是筛选和预测中药药效物质组分的一种有效分析方法。

[关键词] 芍药甘草汤; 指纹图谱; 谱效关系; 灰色关联度分析; 高效液相色谱法(HPLC); 青霉素; 癫痫

[中图分类号] R2;R28;R742.1;O657.7;R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)16-0056-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201160

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200323.1758.001.html>

[网络出版日期] 2020-3-24 11:13

Investigation of Spectrum-effect Relationship of Brain Protection of Shaoyao Gancaotang on Epileptic Mice Based on Grey Correlation Analysis

WANG Ying, WU Hong-jie, GUAN Qing-xia, CHEN Da-zhong*, WANG Yun-peng
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the spectrum-effect relationship of effect of material components in Shaoyao Gancaotang on the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and adenosine triphosphatase (ATPase) in brain tissue of epileptic mice, and to reveal the material basis of the antiepileptic effect of Shaoyao Gancaotang. **Method:** HPLC was used to establish the fingerprint of 15 batches of Shaoyao Gancaotang, the mobile phase was consisted of acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-15 min, 19%A; 15-45 min, 19%A-50%A; 45-46 min, 50%A-90%A; 46-48 min, 90%A), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 237 nm. The mouse epilepsy model was induced by penicillin, the protective effect of 15 batches of Shaoyao Gancaotang on MDA, SOD and ATPase levels in brain tissue of epileptic mice was investigated. Grey correlation analysis was used to analyze the

[收稿日期] 20200306(025)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2016076)

[第一作者] 王莹,在读硕士,从事药剂学研究,Tel:0451-87266827,E-mail:1415773792@qq.com

[通信作者] *陈大忠,研究员,从事中药物质基础及药剂学研究,Tel:0451-87266817,E-mail:cdz89@163.com

correlation between the peak areas of characteristic peaks in the fingerprint of 15 batches of Shaoyao Gancaotang and three pharmacodynamic indexes (the activities of MDA, SOD and ATPase), and the mathematical model of spectrum-effect relationship between different material components and pharmacodynamic indexes was established. **Result:** Shaoyao Gancaotang could increase the contents of ATPase and SOD and reduce the content of MDA in the brain tissue of epileptic mice, and most of the differences were significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There were 28 common peaks in the fingerprint of 15 batches of Shaoyao Gancaotang, and 15 of them were characteristic peaks. Grey correlation analysis found that the characteristic peaks contributed to the activities of MDA, SOD and ATPase included peak 2 (albiflorin), peak 3 (paeoniflorin), peak 5 (liquiritin), and so on, the specific ranking was peak 3>peak 6>peak 12>peak 8>peak 2>peak 5>peak 9>peak 4>peak 10>peak 7>peak 13>peak 11>peak 15>peak 1>peak 14. **Conclusion:** Shaoyao Gancaotang can affect the activities of SOD, MDA and ATPase in brain tissue of epileptic mice by multi-component synergy. Simultaneously, introducing the grey correlation analysis into the correlation evaluation of the spectrum-effect relationship between components and efficacy of Chinese herbal compounds, it can objectively reflect the essence of the synergistic action of multiple components in traditional Chinese medicine (TCM), and it is an effective analysis method for screening and predicting the pharmacodynamic components of TCM.

[Key words] Shaoyao Gancaotang; fingerprint; spectrum-effect relationship; grey correlation analysis; high performance liquid chromatography (HPLC); penicillin; epilepsy

基于中药组分复杂、多靶点协同作用的特点,将数学模型分析方法引入到中药相关评价体系中,建立和发展多学科交叉融合的中药评价手段,具有实际研究意义。数学模型能够容纳多元化信息,拥有大数据处理的优势,这使其在中药领域中获得了创新性的运用,例如层次分析法、熵权法、误差逆传播(BP)神经网络和灰色关联度法等数学模型,均在中药评价体系的多个领域中发挥了重要的作用。

关于芍药甘草汤抗癫痫作用的研究还未见有大量文献报导,芍药甘草汤最早记载于东汉·张仲景所著的《伤寒论》中,具有调和肝脾、柔筋止痛、解痉的功效,被历代医家用于治疗骨骼肌痉挛、神经性疼痛和关节骨痛等^[1]。现代药理学研究表明,芍药中的芍药内酯苷具有抗癫痫、镇痛、戒毒、止眩晕等功效^[2-3];芍药苷具有良好的解热解痉、抗炎镇痛等功效^[4],其抗炎镇痛作用主要通过激活小胶质细胞影响其趋化性,抑制脊髓中蛋白激酶B-核转录因子- κ B(Akt-NF- κ B)等信号通路从而有效缓解炎症性疼痛^[5];甘草中的甘草苷具有清热解毒、缓急止痛、抗抑郁^[6]、抗氧化、抗炎等作用,其抗炎作用机制是通过减少促炎症因子和趋化因子的表达,抑制致炎因子及类固醇代谢酶活性从而协同发挥抗炎作用;甘草酸铵则具有抗炎、抗氧化、保肝解毒、调节内分泌紊乱等药理作用^[7]。芍药甘草汤在日本作为汉方制剂被划归为临床处方,用于癫痫等疾病的治疗,而我国目前针对芍药甘草汤抗癫痫作用的研

究较少。

基于芍药甘草汤具有解痉作用并结合日本将该汉方用于抗癫痫的背景下,本研究选择芍药甘草汤对癫痫小鼠的脑保护作用为研究内容,采用灰色关联度分析法,以15批芍药甘草汤指纹图谱特征峰面积与癫痫小鼠脑组织中超氧化物歧化酶,丙二醛,Na⁺-K⁺-三磷酸腺苷(ATP)酶, Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶活性之间的关联性建立数学分析模型^[8],探讨芍药甘草汤有效物质与抗癫痫药效之间的谱-效关系,以期能为客观揭示中药物质基础发挥药效作用的机制提供一种预测和分析方法。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AL-204型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。注射用青霉素钠(哈药集团,批号18020304-2),丙戊酸钠片(山东仁和堂药业有限公司,批号171202),超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20180322),丙二醛(MDA)检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号20180326),三磷酸腺苷(ATP)酶检测试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,批号20180317),芍药苷、甘草苷、甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-201741,111610-201106,110731-201418,纯度依次为99.4%,98.1%,98.8%),芍药内酯苷对照品(宝鸡市晨光生物科技有限公司,批号39011-90-0,纯度98.5%),水

为纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。白芍、甘草(炙)饮片均购自哈尔滨世一堂中医馆有限公司,经黑龙江中医药大学孙慧峰教授鉴定分别为毛茛科植物白芍 *Paeonia lactiflora* 的干燥根,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根及根茎,均符合2015年版《中国药典》(一部)相关项下的规定,15批饮片的相关信息见表1。

表1 15批不同来源的饮片信息

Table 1 Information of 15 batches of decoction pieces from different sources

No.	甘草(炙)		白芍	
	批号	产地	批号	产地
S1	G161222	甘肃省榆中县	B160511	浙江金华
S2	G161221	甘肃省榆中县	B160513	浙江金华
S3	G161108	甘肃省榆中县	B160702	浙江金华
S4	G160522	甘肃省榆中县	B170914	浙江金华
S5	G160905	甘肃省榆中县	B161115	浙江金华
S6	G160401	新疆维吾尔自治区温泉县	B170522	四川德阳
S7	G160402	新疆维吾尔自治区温泉县	B170521	四川德阳
S8	G160403	新疆维吾尔自治区温泉县	B160612	四川德阳
S9	G160405	新疆维吾尔自治区温泉县	B160613	四川德阳
S10	G160416	新疆维吾尔自治区温泉县	B160614	四川德阳
S11	G160711	内蒙古自治区克什克腾旗	B170309	安徽亳州
S12	G160712	内蒙古自治区克什克腾旗	B170412	安徽亳州
S13	G160713	内蒙古自治区克什克腾旗	B170416	安徽亳州
S14	G160714	内蒙古自治区克什克腾旗	B170417	安徽亳州
S15	G160715	内蒙古自治区克什克腾旗	B170418	安徽亳州

昆明种小鼠180只,体质量(30±2)g,雌雄各半,SPF/VAF级,饲养温度20~24℃,相对湿度50%~60%,日光照与黑暗时间各12h,购自黑龙江中医药大学实验动物中心,合格证号SCXK(黑)2013-004,并按3R原则给予人道关怀。本文涉及的动物实验经黑龙江中医药大学伦理委员会批准,批准号DXLL20151108001。

2 方法与结果

2.1 芍药甘草汤煎液指纹图谱的建立

2.1.1 芍药甘草汤的制备 通过对从东汉起至近代有关度量衡历史沿革的文献整理和对古代医籍所记载的芍药甘草汤用法、用量等方面的考证,称取随机组合的15批炙甘草、白芍饮片各62.4g,加水600mL,浸泡20min,武火加热至沸腾,调至文火保持微沸,煎煮至药液300mL,趁热用纱布滤过(滤过温度恒定),取滤液,冻干,即得^[9],将其编号为S₁~S₁₅

样品。

分别取S₁~S₁₅样品各0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇30mL,称定质量,超声(功率250W,频率33kHz)处理30min使溶解,放冷,精密称定,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,经定量滤纸过滤后,取续滤液,经0.45μm微孔滤膜滤过,依次将滤液编号为S₀₁~S₀₁₅,作为供试品溶液。

2.1.2 色谱条件 采用Phenomenex-C₁₈色谱柱(4.6mm×250mm,5μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15min,19%A;15~45min,19%~50%A;45~46min,50%~90%A;46~48min,90%A),流速1.0mL·min⁻¹,进样量10μL,柱温35℃,检测波长237nm,二极管阵列检测器(DAD)。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取芍药苷1.98mg,甘草苷1.30mg,芍药内酯苷2.37mg和甘草酸铵5.60mg对照品,置于10mL棕色量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,得质量浓度分别为0.198,0.130,0.237,0.560g·L⁻¹的混合对照品溶液,混匀,备用。

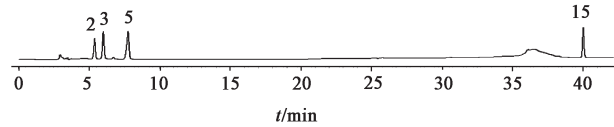
2.1.4 精密度试验 取芍药甘草汤S₀₁供试品溶液,按2.1.2项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,以5号峰甘草苷为参照,计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均<3.0%,表明仪器具有良好的精密度。

2.1.5 稳定性试验 取芍药甘草汤S₀₁供试品溶液,分别在制备后2,4,6,8,10,12h按2.1.2项下色谱条件测定,记录色谱图,以5号峰甘草苷为参照,计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均<3.0%,表明供试品溶液在12h内基本稳定。

2.1.6 重复性试验 分别精密称取2.1.1项下芍药甘草汤S₁样品6份并制成芍药甘草汤供试品溶液,按2.1.2项下色谱条件测定,记录色谱图,以甘草苷5号峰为参照,计算各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均<3.0%,表明该方法具有良好的重复性。

2.1.7 样品测定及相似度评价 分别精密吸取供试品溶液S₀₁~S₀₁₅,按2.1.2项下色谱条件测定,记录色谱图。相关数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”(2004A版),以S₀₁为参照色谱,自动匹配图谱,利用中位数法生成指纹图谱和对照指纹图谱。根据色谱图中物质组分的分离度、保留时间结合峰面积值,确定将甘草苷作为参比峰,一共

匹配出15个特征峰,与对照品色谱峰比对,确定2号峰为芍药内酯苷,3号峰为芍药苷,5号峰为甘草苷,15号峰为甘草酸铵,采用自动匹配模式计算出15批芍药甘草汤指纹图谱相似度处于0.92~0.99。见图1~3。



2. 芍药内酯苷; 3. 芍药苷; 5. 甘草苷; 15. 甘草酸铵

图1 混合对照品的HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed reference substance

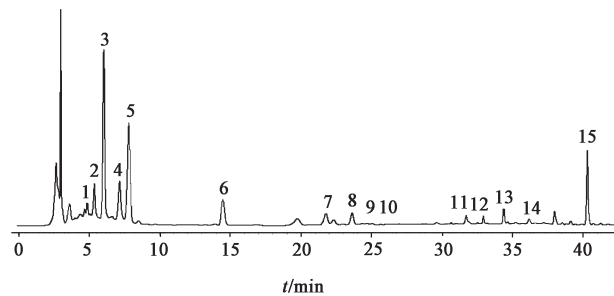


图2 芍药甘草汤的HPLC对照指纹谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of Shaoyao Gancaotang

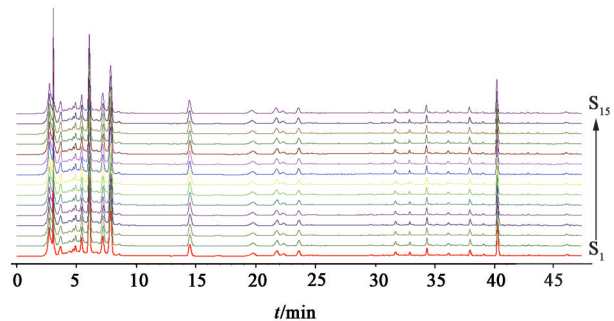


图3 15批芍药甘草汤的HPLC指纹谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of 15 batches of Shaoyao Gancaotang

2.2 芍药甘草汤对致痫小鼠脑保护作用

2.2.1 动物模型制备与给药 将小鼠随机分为芍药甘草汤给药组($S_1 \sim S_{15}$ 组),空白组,阳性药组(丙戊酸钠组)和模型组,每组10只,雌雄各半。芍药甘草汤给药剂量 $1.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当生药量 $10.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),丙戊酸钠组给药剂量 $0.156 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,模型组和空白组均给予等体积生理盐水。以上各组动物分别连续灌胃给予相应药物或生理盐水7 d,在最后1 d给予药物或生理盐水1 h后,除空白组外,其余各组小鼠按 $600 \text{ 万 U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射青霉素^[10],并参照Racine分级标准评判致癫痫程度^[11]。待小鼠癫痫发作了30 min后,腹腔注射4%水合氯醛($0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)进行麻醉,解剖头部,取出脑组织处理后称定质量,将脑

组织与生理盐水按比例配制成20%脑组织匀浆液,置于离心管中,离心($2\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 离心半径14 cm),取上清液,将上清液与生理盐水按比例配制成体积分数分别为2%,10%和1%的脑组织匀浆液,备用。

2.2.2 生化指标检测及数据分析 取2%脑组织匀浆液,按ATP酶检测试剂盒说明书操作,测定 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATP}$ 酶, $\text{Ca}^{2+} \text{-ATP}$ 酶和 $\text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ 酶活性;取1%脑组织匀浆液,按SOD检测试剂盒说明书操作,测定SOD水平;取10%脑组织匀浆液,按MDA检测试剂盒说明书操作,测定MDA含量。所采集的数据均用SPSS 17.0软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量数据。

2.2.3 脑保护作用考察 与空白组比较,模型组的ATP酶活性降低,MDA含量升高,SOD含量降低,且均具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,芍药甘草汤给药组($S_1 \sim S_{15}$ 组)能够提高 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATP}$ 酶, $\text{Ca}^{2+} \text{-ATP}$ 酶和 $\text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ 酶活性,降低MDA含量,提高SOD含量,且大部分具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表2。

2.3 谱效关系建立与分析 利用灰色关联分析(GRA)计算芍药甘草汤指纹图谱中代表性的特征峰与癫痫小鼠脑组织中SOD,MDA和ATP酶活性之间的关联度,以特征峰峰面积对 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATP}$ 酶, $\text{Ca}^{2+} \text{-ATP}$ 酶, $\text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ 酶,SOD和MDA量值进行GRA。将特征峰峰面积及药效学指标采用均值无量纲化处理后^[12],消除原始数据的量纲性,使数据变异性的特点得以最大化保留。采用均值法处理,均值化数据计算公式为 $X'_i(k) = X_i(k) / \bar{X}_i(k)$,其中 $X_i(k)$ 为样本中的原始数据, $\bar{X}_i(k)$ 为样本中原始数据的均值, $X'_i(k)$ 为处理后数据^[13]。

结合表2中的数据,将药效学指标 $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATP}$ 酶, $\text{Ca}^{2+} \text{-ATP}$ 酶, $\text{Mg}^{2+} \text{-ATP}$ 酶,SOD和MDA的水平设定为母序列(参考序列, Y_j),依次记为 $Y_1 \sim Y_5$,色谱图中各特征峰峰面积设定为子序列(比较序列, X_i)^[14],即 $X_1 \sim X_{15}$,计算特征峰峰面积与5组药效学指标的关联系数。参考序列 Y_j 与比较序列 X_i 在第 k 个指标上差值的绝对值 $\Delta_0(k) = |Y_j(k) - X_i(k)|$,序列 Y_j 相对于 X_i 在 k 个指标的关联系数 $\xi_i(k) = [\Delta(\min) + \rho \times \Delta(\max)] / [\Delta_0(k) + \rho \times \Delta(\max)]$,式中 k 为峰号,参数 $\Delta_0(k)$ 为5组药效学指标(参考序列)与特征峰峰面积(比较序列)分别均值化处理后绝对差值,参数 $\Delta(\max) = \max |Y_j(k) - X_i(k)|$,代表两者绝对差值的最大值^[15], $\Delta(\min) = \min |Y_j(k) - X_i(k)|$,代表两者的绝对

表2 芍药甘草汤对ATP酶,SOD和MDA活性的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Shaoyao Gancaotang on activities of ATPase, SOD and MDA ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶 /μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	Ca ²⁺ -ATP酶 /μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	Mg ²⁺ -ATP酶 /μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹
空白	-	3.13±1.50 ¹⁾	4.93±2.13 ²⁾	4.05±2.75 ²⁾	129.20±55.94 ²⁾	2.09±1.25 ²⁾
模型	-	1.50±0.92	2.19±1.22	1.60±1.01	74.37±31.92	6.18±1.29
丙戊酸钠	0.156	3.31±1.71 ¹⁾	4.59±1.40 ²⁾	3.40±1.53 ¹⁾	112.18±40.60 ¹⁾	2.45±1.25 ²⁾
S ₁	1.32	3.24±1.66 ¹⁾	4.18±1.30 ¹⁾	3.88±1.51 ²⁾	127.91±58.33 ²⁾	2.67±1.25 ²⁾
S ₂	1.32	3.02±1.31 ¹⁾	3.65±1.27 ¹⁾	3.41±1.09 ¹⁾	120.44±39.16 ¹⁾	3.02±1.73 ²⁾
S ₃	1.32	2.96±1.42 ¹⁾	3.29±1.35 ¹⁾	3.64±1.37 ¹⁾	118.62±48.35 ¹⁾	2.95±1.47 ²⁾
S ₄	1.32	3.57±1.81 ¹⁾	3.70±1.72 ¹⁾	3.34±1.26 ¹⁾	97.03±31.87	3.31±1.16 ²⁾
S ₅	1.32	2.96±2.03 ¹⁾	3.53±2.45 ¹⁾	2.98±1.19 ¹⁾	125.54±50.18 ¹⁾	4.11±1.52 ¹⁾
S ₆	1.32	2.47±0.93	3.01±1.82	3.10±1.48 ¹⁾	102.58±40.76	2.83±1.37 ²⁾
S ₇	1.32	3.85±3.06 ²⁾	3.71±2.31 ¹⁾	3.54±1.96 ¹⁾	126.82±52.05 ¹⁾	4.72±2.29
S ₈	1.32	4.01±1.77 ²⁾	3.94±3.22 ¹⁾	3.11±2.05 ¹⁾	115.79±37.85 ¹⁾	3.59±1.54 ²⁾
S ₉	1.32	2.89±1.54 ¹⁾	3.37±1.94 ¹⁾	3.05±1.78 ¹⁾	127.18±49.81 ²⁾	2.96±1.38 ²⁾
S ₁₀	1.32	3.66±2.28 ¹⁾	3.15±1.09 ¹⁾	3.28±1.26 ¹⁾	122.82±43.37 ¹⁾	3.12±1.30 ²⁾
S ₁₁	1.32	3.23±1.58 ¹⁾	2.96±0.89	3.11±1.44 ¹⁾	131.07±55.04 ²⁾	2.65±1.21 ²⁾
S ₁₂	1.32	3.11±2.33 ¹⁾	2.72±1.66	2.95±2.13	100.27±45.16	4.26±1.34 ¹⁾
S ₁₃	1.32	4.26±2.25 ²⁾	3.85±2.58 ¹⁾	3.38±3.02 ¹⁾	124.39±51.02 ¹⁾	3.49±1.21 ²⁾
S ₁₄	1.32	2.69±1.10 ¹⁾	2.88±1.44	3.15±1.22 ¹⁾	107.96±44.75	2.38±1.28 ²⁾
S ₁₅	1.32	3.04±1.91 ¹⁾	3.20±1.87 ¹⁾	3.41±1.59 ¹⁾	120.68±43.24 ¹⁾	3.21±1.19 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

差值的最小值,ρ为分辨系数,取值区间0~1,通常选取ρ=0.5^[16]。特征峰峰面积与5组药效学指标的关

联度 $r_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \xi_i(k)$,其大小反映了参考序列Y_j与比较序列X_i间的整体关联程度^[17],式中n为比较序列中所含的数据个数(i=1,2,3,……,15;k=1,2,3,4,5),结果见表3,4。设定关联度>0.7为影响谱-效的主要贡献者,由表4可知,芍药甘草汤HPLC指纹图谱中2~13号色谱峰对各药效学指标有明显的影响。

3 讨论

芍药甘草汤在临床上应用广泛,多用于缓解痉挛、治疗神经性痛等^[18]。本文从芍药甘草汤影响癫痫小鼠脑保护作用机制方面进行研究,利用GRA分析芍药甘草汤抗癫痫作用与中药物质组分之间的谱效关系^[19]。结果发现采用青霉素诱导癫痫模型小鼠后,模型组脑组织中Na⁺-K⁺-ATP酶, Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶量值较空白组显著降低,其作用机制可能是由于氧自由基造成致痫小鼠脑细胞损伤,促使细胞膜通透性和细胞结构构型改变,导致Na⁺-K⁺-ATP酶, Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶活性降低,进

表3 各药效学指标的均值化处理

Table 3 Average treatment of each pharmacodynamic index

编号	均值化处理后数值				
	Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶	Ca ²⁺ -ATP酶	Mg ²⁺ -ATP酶	SOD	MDA
S ₁	0.99	1.23	1.18	1.08	0.81
S ₂	0.93	1.07	1.04	1.02	0.92
S ₃	0.91	0.96	1.11	1.01	0.90
S ₄	1.09	1.09	1.02	0.82	1.01
S ₅	0.91	1.04	0.91	1.06	1.25
S ₆	0.76	0.88	0.94	0.87	0.86
S ₇	1.18	1.09	1.08	1.08	1.44
S ₈	1.23	1.16	0.95	0.98	1.09
S ₉	0.89	0.99	0.93	1.08	0.90
S ₁₀	1.12	0.92	1.00	1.04	0.95
S ₁₁	0.99	0.87	0.95	1.11	0.81
S ₁₂	0.95	0.80	0.90	0.85	1.30
S ₁₃	1.31	1.13	1.03	1.05	1.06
S ₁₄	0.82	0.84	0.96	0.92	0.73
S ₁₅	0.93	0.94	1.04	1.02	0.98

而影响Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺和K⁺转运,引起神经元的膜电位异常活动;给予芍药甘草汤干预后,给药组能够

表4 芍药甘草汤特征峰相对峰面积与药效学指标的谱效关系分析
Table 4 Analysis of spectrum-effect relationship between relative peak areas of characteristic peaks and Pharmacodynamic indexes of Shaoyao Gancaotang

子序列	关联度					均值	综合排序
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5		
X_1	0.644 67	0.694 00	0.699 04	0.670 97	0.645 10	0.670 76	14
X_2	0.732 67	0.774 67	0.782 53	0.737 78	0.709 08	0.747 35	5
X_3	0.782 00	0.817 33	0.804 38	0.763 56	0.745 97	0.782 65	1
X_4	0.730 67	0.759 33	0.764 14	0.722 38	0.696 49	0.734 60	8
X_5	0.738 67	0.768 67	0.768 99	0.725 71	0.702 30	0.740 87	6
X_6	0.784 67	0.773 33	0.780 93	0.772 24	0.777 55	0.777 74	2
X_7	0.725 33	0.753 33	0.758 69	0.716 51	0.690 98	0.728 97	10
X_8	0.774 00	0.798 00	0.809 60	0.758 70	0.725 78	0.773 22	4
X_9	0.741 33	0.760 00	0.768 24	0.723 62	0.699 15	0.738 47	7
X_{10}	0.733 33	0.752 67	0.756 93	0.716 47	0.689 19	0.729 72	9
X_{11}	0.720 00	0.749 79	0.752 93	0.711 23	0.691 25	0.725 04	12
X_{12}	0.755 33	0.791 60	0.815 40	0.764 58	0.739 24	0.773 23	3
X_{13}	0.726 67	0.753 04	0.751 23	0.710 06	0.689 12	0.726 02	11
X_{14}	0.612 67	0.602 14	0.582 07	0.604 69	0.628 36	0.605 99	15
X_{15}	0.701 33	0.719 67	0.715 10	0.679 39	0.664 80	0.696 06	13

明显提高癫痫小鼠脑组织中ATP酶的活性,使细胞内外的 Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} 和 K^+ 动态平衡得以维持,从而改善了癫痫小鼠脑损伤的程度。另外,与空白组比较,模型组中SOD水平显著降低,而MDA水平则显著上升。SOD活性通常作为评价清除氧自由基能力的主要指标,SOD水平越高表明其清除自由基的能力越强,组织中自由基的含量就越低,对细胞的损伤程度就越小;MDA含量能够反映体内氧自由基生成水平的高低,MDA的产生量与氧自由基量以及脂质过氧化反应程度是相平行的,其可以间接反映氧自由基含量的变化和细胞膜损伤的程度。由此可知,模型组中SOD降低和MDA升高,推测其机制可能是由于癫痫发作的反复性引起组织在氧化代谢过程中产生了大量自由基,导致细胞产生过氧化损伤,其中细胞膜是氧自由基的主要侵蚀对象,自由基过氧化反应物能够促使细胞膜构型和其离子通透性发生改变^[20]。以MDA, SOD, Na^+ -ATP酶, Ca^{2+} -ATP酶和 Mg^{2+} -ATP酶水平作为谱效关系分析的药效学指标^[21],利用GRA计算这5个药效学指标与HPLC指纹图谱中特征峰峰面积的关联度,发现芍药甘草汤中不同化学成分对这5个药效学指标表现出了不同强度的关联性,提示在指纹图谱中由多个色谱峰共同参与了对MDA, SOD和ATP酶的

调控作用,而且每个色谱峰对MDA, SOD和ATP酶的影响程度各不相同,验证了中药及其复方制剂以多组分、多靶点发挥作用的特点。

采用均值化处理使不同数列量纲标准化,形成一致性量纲是提高GRA准确度的必要手段^[22]。本研究将各组药效学指标利用平均值变换成为一致性量纲再与色谱峰进行关联分析,进而评价出各色谱峰所对应的物质组分在影响MDA, SOD和ATP酶活性上的贡献强度大小。通过谱效关系分析,在15个指纹图谱特征峰中,除15号峰甘草酸铵对MDA, SOD和ATP酶活性影响较小外,其余色谱峰与药效之间都表现出了不同程度的相关性,其中包含3号峰芍药苷,2号峰芍药内酯苷及5号峰甘草苷等,尤其2号峰芍药内酯苷以该数学模型计算出的抗癫痫关联强度结果与文献中报道其具有抗癫痫作用高度吻合^[23]。由此可以初步证实,利用GRA建立芍药甘草汤对致痫小鼠脑组织中MDA, SOD和ATP酶影响的谱效关系分析方法是可行的^[24],具有实际研究意义。GRA是在灰色理论分析系统中最为常用的方法之一^[25],其特点是对数据信息采集量没有过多的要求,通过较小的计算量,可以对非确定性关系的参考序列(MDA, SOD和ATP酶活性)与比较序列(色谱峰峰面积)关联程度进行曲线分析,曲线越接近表示两随机变量之间的关联程度越高。

数学模型为筛选发挥药效作用的中药物质组分提供了一条有效的分析途径,但由于任何一种数学模型对于数据和信息的纳入也都存在自身的局限性,所以还需要对数学模型所筛选出的中药物质组分进行药效学实验验证,才能更加客观地揭示芍药甘草汤物质组分抗癫痫作用的相关机制,这也是下一步着力研究的方向。另外,本研究在谱效关系对比分析中^[26],除指认了指纹图谱中的2号,3号,5号和15号色谱峰的归属外,对其他影响MDA, SOD和ATP酶水平关联度较大的色谱峰(6号,12号和8号等)的结构还未确定,有待于进一步结构鉴定和解析,并对获得的有关物质成分进行含量限度测定,从而建立芍药甘草汤的质量标准控制体系。

[参考文献]

[1] 高志刚,戴卫红. 芍药甘草汤的临床应用及方剂研究进展[J]. 河北中医, 2019, 41(5): 792-796.
[2] 张爱宁,王学工. 芍药甘草汤的临床应用概况[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(102): 96-97.

- [3] 吴丽,王丽丽,侯燕,等.芍药苷、芍药内酯苷对原发性痛经模型小鼠的解痉镇痛作用[J].环球中医药,2018,11(11):1670-1674.
- [4] 胡增晓,徐岚,闫蓉,等.芍药苷作用于神经系统的研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(3):297-301.
- [5] 王冰,孙义.芍药苷镇痛机制的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(72):239-240.
- [6] 李想,李冀.甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J].江苏中医药,2019,51(5):81-86.
- [7] 张光辉,郭惠,张拴,等.甘草苷的合成及抗氧化活性研究[J].化学与生物工程,2019,36(10):16-19.
- [8] 李慧,包永睿,王帅,等.基于灰色关联分析的茜草醇提取物抗氧化、抗肝癌谱效关系研究[J].中南药学,2019,17(6):815-819.
- [9] 唐晓章,林美斯,周菲,等.经典名方芍药甘草汤的物质基准量值传递分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(14):62-69.
- [10] 范彦英,廖玉芳,肖奕,等.蝇蕈醇激动GABA_c受体对青霉素致大鼠癫痫的影响[J].山西医科大学学报,2014,45(4):267-271.
- [11] 宋立群,肖洪彬,赵丹阳,等.安痢宁冲剂对小鼠癫痫模型脑组织中MDA、SOD、ATP酶的影响[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(3):44-46.
- [12] 杨添富,张泽.云南茶叶总产值的影响因子灰色关联分析[J].保山学院学报,2019,38(2):47-51.
- [13] 陈勇,陈明,王钧,等.基于灰色关联分析法辨识中药生产过程关键工艺参数[J].中草药,2019,50(3):582-587.
- [14] 耿媛媛,胡昌江,潘新,等.二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究[J].中草药,2014,45(18):2658-2663.
- [15] 黄毅彪,叶国盛,林燕萍.福建省茶产业发展影响因子的灰色关联分析[J].武夷学院学报,2016,35(3):42-45.
- [16] 温聪聪,鞠成国,张强,等.麸煨诃子不同部位抗溃疡性结肠炎的谱效关系[J].中成药,2019,41(8):1910-1914.
- [17] ZHU N Q, HOU J Y, MA G Y, et al. Network pharmacology identifies the mechanisms of action of shaoyao gancào decoction in the treatment of osteoarthritis [J]. Med Sci Monitor, 2019, doi: 10.12659/MSM.915821.
- [18] 孙婷,姜建国,张广钦.芍药甘草汤的镇痛抗炎作用研究[J].中国药业,2016,25(3):18-20.
- [19] 丰秀存,周莲.不同产地黄连药用成分的灰色关联及聚类分析[J].广东化工,2019,46(14):13-14.
- [20] 林少珠,陈广斌,吴铁,等.丹参素对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤脑组织SOD、MDA的影响[J].中国实用医药,2012,7(24):12-14.
- [21] 陈奇.中药药理研究方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2011:1127-1128.
- [22] 李若诗,袁会琼,刘江,等.基于灰色关联度分析和聚类分析的3种滇产重楼抗肝癌作用谱效关系探索[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(8):192-198.
- [23] 曾洁,华丽萍,黄彬,等.白芍中芍药苷和芍药内酯苷在大鼠血浆中含量测定及药动学研究[J].中国中医药信息杂志,2018,25(2):89-94.
- [24] GAO S, CHEN H G, ZHOU X. Study on the spectrum-effect relationship of the xanthine oxidase inhibitory activity of *Ligustrum lucidum* [J]. J Sep Sci, 2019, doi: 10.1002/jssc.201900531.
- [25] LI Y C, LU S Z, YU H L. Grey correlation analysis of factors affecting nitrogen oxide concentration in cement production process [A]. Advanced Science and Industry Research Center. Proceedings of 2019 2nd International Conference on Informatics, Control and Automation [C]. New York: DEStech Publications, 2019:471-477.
- [26] 曹明霞.灰色关联分析模型及其应用的研究[D].南京:南京航空航天大学,2007.

[责任编辑 刘德文]