

· 药学基础 ·

基于均匀试验设计的黄芪-当归主要化学成分剂量配伍对血管平滑肌细胞增殖的影响

陈凌波¹, 任芮彬², 阎卉芳¹, 邓常清^{1*}

(1. 湖南中医药大学 中西医结合学院, 医学院, 长沙 410208;

2. 西南交通大学 数学学院, 成都 611756)

[摘要] 目的:采用均匀试验设计方法,构建黄芪-当归中6种主要成分配伍抗血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的函数模型,分析这6种成分配伍与抑制VSMCs增殖的相关性,探讨黄芪-当归主要化学成分配伍对VSMCs增殖的影响、均匀设计试验在中药多成分配伍研究中的可行性。方法:采用细胞增殖及活性检测试剂盒(CCK-8)法测定黄芪-当归中6种成分配伍对血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)诱导的大鼠VSMCs增殖的抑制作用,求得各成分半数抑制浓度(IC₅₀)后,以芒柄花素、黄芪皂苷I、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷6种成分分别为自变量X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆,细胞增殖抑制率为因变量Y,选用U₂₄^(24⁹)均匀设计表和线性、二次多项式2种数学模型,以逐步回归方法筛选变量,得出理论上拟合较好的方程式。通过设定不同剂量的6种成分配伍进行验证试验,筛选出实际较优的关系方程式,并根据实验目的对筛选出的回归方程进行数据中心化处理,比较方程的各回归系数,以分析药物与药效的相关性。结果:黄芪-当归中6种成分均能抑制VSMCs增殖,且呈浓度依赖性。芒柄花素、黄芪皂苷I、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷的IC₅₀分别为123.453、113.184、81.655、141.159、101.187、151.016 mg·L⁻¹。经验证试验筛选出2个较优的数学模型,方程1和方程2分别为Y₁=73.137 897-0.207 888X₁+0.000 508X₂²+0.000 347X₁X₆、Y₂=70.038 433-0.236 665X₁+0.000 577X₂²+0.000 260X₁X₄+0.000 415X₁X₆+0.000 370X₃X₅。方程2经数据中心化处理后为Y=-1.480 260-0.146 281X₁+0.000 673X₂²+0.000 314X₁X₄+0.000 456X₁X₆+0.000 737X₃X₅,回归系数表明黄芪皂苷I对细胞增殖抑制率起正向作用,芒柄花素与毛蕊异黄酮、芒柄花素与毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷与阿魏酸是以交互作用形式对细胞增殖发挥抑制效应,且黄芪甲苷与阿魏酸的协同作用高于其他交互项。结论:黄芪-当归中6种主要成分配伍后对VSMCs异常增殖有抑制作用,证明均匀试验设计可用于预测中药化学成分配伍与药效的相关性,可为合理运用均匀设计与回归分析构建数学模型研究中中药配伍关系提供实验依据。

[关键词] 均匀设计; 回归分析; 二次多项式; 黄芪; 当归; 化学成分; 半数抑制浓度(IC₅₀)

[中图分类号] R22;R28;R289;O213 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0143-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220451

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220418.1154.004.html>

[网络出版日期] 2022-04-20 08:01:48

Effect of Dose Compatibility of Main Chemical Components from Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on Proliferation of VSMCs Based on Uniform Design

CHEN Lingbo¹, REN Ruibin², YAN Huifang¹, DENG Changqing^{1*}

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. School of Mathematics, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, China)

[Abstract] **Objective:** The functional model of six major components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix combination against the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) was constructed

[收稿日期] 2022-03-15

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874406);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2018ZXYJH02)

[第一作者] 陈凌波,在读博士,从事中西医结合心脑血管疾病防治及方剂配伍原理研究,E-mail:407544282@qq.com

[通信作者] * 邓常清,教授,博士生导师,从事中西医结合心脑血管疾病防治及方剂配伍原理研究,E-mail:dchangq@sohu.com

by uniform design, the relationship between the compatibility of these six main components and the inhibition of VSMCs proliferation was analyzed, and the effect of the compatibility of these main components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on the proliferation of VSMCs as well as the feasibility of uniform design test in the study of multi-component compatibility of Chinese medicines were discussed. **Method:** Cell proliferation and toxicity assay kit (CCK-8) method was used to determine the inhibitory effect of the six components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix on platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB)-induced VSMCs proliferation in rats and the half inhibitory concentration (IC_{50}) of each component were obtained. Six chemical components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix (formononetin, astragaloside I, astragaloside IV, calycosin, ferulic acid and calycosin-7-O- β -D-glucoside) were taken as the independent variables $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$, respectively, and the cell proliferation inhibition rate as the dependent variable Y . $U_{24}^*(24^9)$ uniform design table and mathematical models (including linear and quadratic polynomial) were selected, the stepwise regression method was used to screen the variables, and the better equations were obtained in theory. The actually better relationship equations were screened by setting the different dose compatibility of these six components for verification tests. According to the purpose of the experiment, the selected regression equation was processed by data centralization, so as to compare the regression coefficients of the data centralization equation and analyze the correlation between components and efficacy. **Result:** The six components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix could inhibit abnormal proliferation of VSMCs in a dose-dependent manner. IC_{50} values of formononetin, astragaloside I, astragaloside IV, calycosin, ferulic acid and calycosin-7-O- β -D-glucoside were 123.453, 113.184, 81.655, 141.159, 101.187, 151.016 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. Two superior models were selected by experimental verification, including equation 1 of $Y_1=73.137-0.207-0.888X_1+0.000-0.508X_2^2+0.000-0.347X_1X_6$ and equation 2 of $Y_2=70.038-0.433-0.236-0.665X_1+0.000-0.577X_2^2+0.000-0.260X_1X_4+0.000-0.415X_1X_6+0.000-0.370X_3X_5$. After data centralization, equation 2 was adjusted to $Y=-1.480-0.260-0.146-0.281X_1+0.000-0.673X_2^2+0.000-0.314X_1X_4+0.000-0.456X_1X_6+0.000-0.737X_3X_5$, the regression coefficients showed that the astragaloside I had a positive effect on the inhibition rate of cell proliferation, formononetin-calycosin, formononetin-calycosin-7-O- β -D-glucoside and astragaloside IV-ferulic acid had an interaction effect on the inhibition rate of cell proliferation, and the synergistic effect of astragaloside IV and ferulic acid was higher than other interaction items. **Conclusion:** The combination of six main components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix can inhibit the abnormal proliferation of VSMCs, and it is demonstrated that the uniform test design can be used to predict the correlation between the chemical composition of Chinese medicines with their pharmacological effects, which can provide an experimental basis for the rational use of uniform design and regression analysis to construct mathematical models to study the compatibility relationship of Chinese medicines.

[Keywords] uniform design; regression analysis; quadratic polynomial; Astragali Radix; Angelicae Sinensis Radix; chemical composition; half inhibitory concentration (IC_{50})

中药配伍研究由于其成分复杂,在考察药物越多的情况下成分之间相互关系越复杂。如何对药物剂量进行合理配比,定量描述中药与药效之间的关系是关键。均匀试验因试验点均匀分散且较正交试验次数少的特点而被广泛用于中药方剂配伍研究^[1-2];同时,由于其研究的因素数量较多且试验次数较少,所得数据不能采用传统的方差分析,常借助于回归分析法^[3-4],即通过建立统计模型来揭示变量之间的相互关系^[5]。目前,均匀试验设计在中药复方研究中的应用侧重于依据回归分析进行中

药成分的筛选和药物最佳配伍剂量的筛选,对于回归建模的分析与讨论则较少,而在均匀试验中如何选择试验数,合理地进行回归分析并选择合适的数学模型和变量,对模型的可靠性与变量结果的预测能力有很大的影响。因此,选择合适的数学模型来表达药物相互配伍的规律,从而定量描述中药成分与药效之间的关系,并通过模型参数进行结果预测,对研究中药配伍关系具有重要意义。

血管平滑肌细胞(VSMCs)是血管内膜增生的主要细胞,在血管重构性病变的发生发展中有重要

作用,血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)主要由血小板和内皮细胞合成并分泌,通过自分泌、旁分泌等方式作用于VSMCs,诱导VSMCs增殖,是引起动脉粥样硬化等血管病变的主要因子,参与了血管增殖性病变的发生发展^[6]。据报道,黄芪和当归配伍对大鼠血管内皮损伤后血管内膜增生具有抑制作用,可抑制VSMCs表型转化和细胞增殖^[7-8],降低血管局部炎性细胞因子表达^[9];黄芪-当归可由肠吸收的主要化学成分为芒柄花素、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷^[10];黄芪甲苷、黄芪皂苷I、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸和芒柄花素配伍可增强抗血管内皮细胞氧化损伤的作用^[11]。此外,有研究表明黄芪-当归5种主要活性成分毛蕊异黄酮苷、黄芪甲苷、黄芪皂苷I、芒柄花素、阿魏酸能吸收入血^[12],提示以上化学成分可能是黄芪和当归的主要药效物质。综上分析,本实验以PDGF-BB诱导VSMCs增殖模型为研究对象,选取芒柄花素、黄芪皂苷I、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷进行中药化学成分配伍,以细胞增殖抑制率作为药效评价指标,研究上述6种成分配伍对VSMCs异常增殖的影响,运用均匀设计结合回归分析方法,利用数学模型研究各成分不同剂量的配伍规律,为解析黄芪-当归抗VSMCs增殖的主要药效成分,以及探索中药多成分配伍量效关系的研究方法提供依据。

1 材料

Series 8000 WJ型CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher公司),Axio Vert.A1型倒置显微镜(德国 Zeiss公司),Cytation3型多功能酶标仪(美国 BioTek公司)。PDGF-BB(美国 PeproTech公司,批号101704J0418),磷酸盐缓冲液(PBS,0.1 mol·L⁻¹,pH 7.4)、DMEM高糖培养基(美国 HyClone公司,批号分别为 NAN1449、AE29163339),胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶溶液(美国 Gibco公司,批号分别为 1861242、1928609),细胞增殖及活性检测试剂盒(CCK-8)试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号68096017),二甲基亚砜(DMSO,批号1129E033)和芒柄花素、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷对照品(批号分别为121A024、412D021、527G021、328D022、527D021,纯度≥98%)均购自北京索莱宝科技有限公司,黄芪皂苷I对照品(上海麦克林生化科技有限公司,批号C10070259,纯度≥98%)。A-10细胞来自大鼠主动脉VSMCs,购自美国模式培养物集存库(ATCC),编号CRL-14760。

2 方法

2.1 细胞培养 A-10细胞株用含10% FBS的DMEM培养基制备成细胞悬液,在37℃、5% CO₂、95%饱和湿度下常规培养,2 d换液并传代1次,传代第4代后取对数生长期细胞进行实验。

2.2 试验药物的制备 将芒柄花素、黄芪皂苷I、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷溶于DMSO中,经0.22 μm滤膜过滤,分别配制成5 g·L⁻¹母液避光保存。实验时用DMEM稀释至所需浓度,DMSO终体积分数不超过0.5%,现用现配。

2.3 细胞活性试验 将细胞以含10% FBS的DMEM制成细胞悬液,以2 500个/孔接种于96孔培养板。置37℃、5% CO₂、95%饱和湿度培养箱中培养24 h后,更换为无血清DMEM饥饿12 h,使细胞同步化于G₀期,然后随机分组,即正常组(无血清培养基培养24 h)、给药组(按表1设计,分别加入不同质量浓度药物培养24 h)及空白组(加入仅含有药物的培养基且不加入细胞)。培养24 h后每孔加入CCK-8溶液10 μL继续孵育1 h。于450 nm处测定吸光度A,计算细胞存活率,药物的细胞毒性评价标准参考GB/T 14233.2—2005细胞活性试验,按照细胞毒性反应分级,药物的细胞毒性反应应不大于1级^[13],细胞存活率>80%表示对细胞无毒性,公式为细胞存活率=[(A_{给药组}-A_{空白组})/(A_{正常组}-A_{空白组})]×100%。每组重复5个样本。

表1 黄芪-当归6种成分细胞活性试验的剂量设定

Table 1 Dose setting of six components of Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix in cytotoxicity assay

水平	质量浓度/mg·L ⁻¹					
	芒柄花素	黄芪皂苷I	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.50	2.00	2.00	2.50	2.25	2.50
3	3.00	4.00	4.00	5.00	4.50	5.00
4	6.00	8.00	8.00	10.00	9.00	10.00
5	12.00	16.00	16.00	20.00	18.00	20.00
6	24.00	32.00	32.00	40.00	36.00	40.00

2.4 PDGF-BB对VSMCs的促增殖作用 细胞处理同2.3项下,细胞同步化后分别加入终质量浓度为0、5、10、20、40、80 μg·L⁻¹的PDGF-BB,继续培养24 h,以CCK-8法测定细胞增殖活性,选取对细胞具有明显促增殖作用的质量浓度进行后续实验。

2.5 6种成分对VSMCs增殖的影响 参照上述

CCK-8法,以密度2 000个/孔接种于96孔培养板,每组设6个复孔。细胞同步化于G₀期后,随机分为正常组(无血清培养基培养25 h)、模型组(用无血清DMEM培养基培养1 h后加入40 μg·L⁻¹ PDGF-BB培养24 h)、给药组(按表2设定的不同药物浓度预处理1 h后加入40 μg·L⁻¹ PDGF-BB继续培养24 h)和空白组(加入仅含有药物的培养基且不加入细胞),于450 nm处测定A,计算各药物的细胞增殖抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀),公式为细胞增殖抑制率=[(A_{模型组}-A_{给药组})/(A_{模型组}-A_{空白组})]×100%。

表2 黄芪-当归6种成分抗VSMCs增殖作用的剂量设定
Table 2 Dose setting of anti-VSMCs proliferation effect of six components in Astragali Radix-Angelicae Sinensis Radix

水平	质量浓度/mg·L ⁻¹					
	芒柄花素	黄芪皂苷 I	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	3.00	2.00	2.00	2.50	2.25	2.50
3	6.00	4.00	4.00	5.00	4.50	5.00
4	12.00	8.00	8.00	10.00	9.00	10.00
5	24.00	16.00	16.00	20.00	18.00	20.00
6	48.00	32.00	32.00	40.00	36.00	40.00
7	96.00	64.00	64.00	80.00	72.00	80.00
8	192.00	128.00	128.00	160.00	144.00	160.00

2.6 黄芪-当归6种成分配伍抗VSMCs增殖的均匀设计试验

2.6.1 均匀设计方案 以芒柄花素、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、毛蕊异黄酮苷作为考察因素,分别用X₁、X₂、X₃、X₄、X₅、X₆表示。综合考虑各成分之间可能存在的交互作用,均匀设计的回归分析模型拟采用多元线性方程与二次多项式回归方程拟合。每个因素设置24个水平,选用删行好格子点法均匀试验表U₂₄^{*}(24⁹)^[5],因素数为6个时取1、2、4、6、7、9列,偏差为0.206 4。利用DPS7.05统计软件对各变量进行回归分析,求得回归方程式。

2.6.2 各成分剂量确定 以成分IC₅₀作为中间值,各成分剂量设为芒柄花素7.5~180 mg·L⁻¹、黄芪甲苷5~120 mg·L⁻¹、阿魏酸6.25~150 mg·L⁻¹、黄芪皂苷 I 6.875~165 mg·L⁻¹、毛蕊异黄酮8.75~210 mg·L⁻¹、毛蕊异黄酮苷9.375~225 mg·L⁻¹,将试验域等分为24个水平。以CCK-8法检测的细胞增殖抑制率作为指标Y,按照以上因素水平进行试验。每组设6个复孔,实验分为正常组(无血清DMEM培养基培养

25 h)、模型组(用无血清DMEM培养基培养1 h后加入40 μg·L⁻¹ PDGF-BB培养24 h)及各均匀设计试验组(按均匀设计表设定的药物终质量浓度预处理1 h后加入40 μg·L⁻¹ PDGF-BB继续培养24 h)。

2.6.3 拟合模型验证试验 观察拟合出的5个方程发现,方程3~5中给出的Y最大值时各自变量取值趋向一致,为进一步验证模型方程的准确性,设置为①6个药物成分IC₅₀剂量配伍组(以下简称“IC₅₀组”)^[14];②方程1最优剂量组;③方程2最优剂量组;④方程3最优剂量组。此外,为了确保实验重复性,加入均匀设计试验结果Y最高组(均匀试验2组),采用CCK-8法检测各组细胞增殖抑制率。各成分给药剂量见表3。

表3 拟合模型验证试验分组与6种成分的剂量
Table 3 Validation test grouping of fitting models and doses of six components

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹					
	芒柄花素	黄芪皂苷 I	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮	阿魏酸	毛蕊异黄酮苷
IC ₅₀ 组	120.00	110.00	80.00	140.00	100.00	150.00
均匀试验2组	15.00	41.25	70.00	192.50	150.00	122.00
方程1最优剂量组	7.50	165.00	5.20	209.00	24.00	109.00
方程2最优剂量组	7.50	165.00	120.00	210.00	150.00	225.00
方程3最优剂量组	7.50	165.00	120.00	8.75	150.00	221.72

2.7 统计学分析 采用SPSS 25.00软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多元线性回归、二次多项式逐步回归分析采用DPS7.05进行分析。方程的差异性检验采用非参数卡方检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 6种化学成分对正常细胞的毒性 当芒柄花素1.5~24 mg·L⁻¹、黄芪皂苷 I 2~32 mg·L⁻¹、黄芪甲苷2~32 mg·L⁻¹、毛蕊异黄酮2.5~40 mg·L⁻¹、毛蕊异黄酮苷2.5~40 mg·L⁻¹、阿魏酸2.25~36 mg·L⁻¹时,细胞存活率均>80%,提示各成分在以上质量浓度范围内对细胞无毒性效应。见表4。

3.2 PDGF-BB对VSMCs的促增殖作用 PDGF-BB质量浓度分别为5、10、20、40、80 μg·L⁻¹时,细胞存活率分别为(114.16±3.68)%、(119.11±3.12)%、(129.35±4.65)%、(147.13±4.30)%、(164.06±8.59)%。说明PDGF-BB在终质量浓度为5~80 μg·L⁻¹时可浓度依赖性地诱导VSMCs增殖,故选取可诱导VSMCs增殖的半数有效浓度(EC₅₀)40 μg·L⁻¹作为

表4 不同质量浓度的6种化学成分对VSMCs细胞毒性的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of six components at different concentrations on cytotoxicity of VSMCs ($\bar{x}\pm s, n=5$)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞存活率/%	成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞存活率/%	成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
芒柄花素	1.50	133.61±3.95	黄芪甲苷	2.00	124.67±6.27	阿魏酸	2.25	122.21±7.92
	3.00	122.26±7.64		4.00	139.12±9.13		4.50	132.66±9.75
	6.00	137.17±3.93		8.00	146.28±10.50		9.00	132.35±9.26
	12.00	123.22±11.33		16.00	112.13±6.68		18.00	111.24±11.15
	24.00	96.09±6.71		32.00	87.33±9.09		36.00	106.58±6.97
黄芪皂苷 I	2.00	127.35±5.96	毛蕊异黄酮	2.50	136.90±8.85	毛蕊异黄酮苷	2.50	102.28±4.37
	4.00	141.08±8.56		5.00	134.66±8.86		5.00	103.98±4.96
	8.00	127.88±3.25		10.00	135.37±9.64		10.00	105.41±3.34
	16.00	121.84±5.34		20.00	122.25±5.41		20.00	100.26±4.28
	32.00	96.83±8.17		40.00	96.32±8.40		40.00	100.39±4.33

注:正常组的细胞存活率为100%

PDGF-BB 诱导 VSMCs 增殖的质量浓度。

3.3 黄芪-当归 6 种化学成分对 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 细胞增殖的影响 以模型组细胞增殖抑制率为对照,芒柄花素在 3~192 mg·L⁻¹、黄芪皂苷 I 在 8~128 mg·L⁻¹、黄芪甲苷在 2~128 mg·L⁻¹、毛蕊异黄

酮在 10~160 mg·L⁻¹、阿魏酸在 18~144 mg·L⁻¹、毛蕊异黄酮苷在 2.5~160 mg·L⁻¹ 时呈浓度依赖性地抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖。上述 6 个成分的 IC₅₀ 分别为 123.453、113.184、81.655、141.159、101.187、151.016 mg·L⁻¹。见表 5。

表5 不同质量浓度6种化学成分对PDGF-BB诱导的VSMCs增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of six components at different concentrations on proliferation of VSMCs induced by PDGF-BB ($\bar{x}\pm s, n=4$)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞增殖 抑制率/%	成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞增殖 抑制率/%	成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞增殖 抑制率/%
芒柄花素	3.00	6.11±3.69	黄芪甲苷	2.00	3.42±4.94	阿魏酸	2.25	-11.34±4.37
	6.00	10.93±4.35		4.00	7.60±3.17		4.50	-2.66±3.33
	12.00	15.78±6.77		8.00	10.09±5.69		9.00	-5.25±8.13
	24.00	18.26±6.21		16.00	11.23±4.25		18.00	0.71±8.14
	48.00	23.72±5.31		32.00	22.86±8.42		36.00	8.19±6.04
	96.00	37.86±1.92		64.00	28.91±7.25		72.00	27.95±4.11
	192.00	63.34±8.97		128.00	65.27±7.60		144.00	71.67±7.35
黄芪皂苷 I	2.00	-12.10±5.33	毛蕊异黄酮	2.50	-9.88±6.47	毛蕊异黄酮苷	2.50	6.37±1.36
	4.00	-5.53±4.46		5.00	-5.02±2.18		5.00	9.45±2.88
	8.00	1.25±4.21		10.00	0.61±3.58		10.00	10.47±1.72
	16.00	1.96±4.33		20.00	3.71±3.26		20.00	12.42±2.57
	32.00	7.22±5.86		40.00	5.24±2.61		40.00	17.78±2.12
	64.00	23.08±2.28		80.00	25.88±4.75		80.00	31.65±2.58
	128.00	57.41±2.54		160.00	53.80±4.91		160.00	62.76±0.25

3.4 均匀设计试验及回归分析 采用 DPS7.05 软件将响应值 Y 与各因素取值进行多元线性回归和二次多项式逐步回归分析。通过相关系数(r)、F、P 对模型进行评价。用多元线性方程回归拟合,回归系数 t 检验,除自变量 X₁、X₂,其余各变量回归系数检验 P 均>0.05,说明因素各剂量之间的变化对细胞增殖

抑制率的影响不是单纯的线性关系,不能用多元线性模型进行回归分析。利用二次多项式逐步回归方法,根据 r、F、P 综合考虑,对回归方程参数进行纳入与剔除,筛选引入、剔除相关变量后得到 5 个适合的二次多项式回归方程,以及 Y 取最大值时各因素组合值。见表 6 和表 7。

表6 均匀试验各因子水平的取值与细胞增殖抑制率(n=6)

Table 6 Values of each factor level and inhibition rate of cell proliferation in uniform design (n=6)

No.	质量浓度/mg·L ⁻¹						细胞增殖抑制率(Y)/%
	X ₁ 芒柄花素	X ₂ 黄芪皂苷 I	X ₃ 黄芪甲苷	X ₄ 毛蕊异黄酮	X ₅ 阿魏酸	X ₆ 毛蕊异黄酮苷	
1	7.500	20.625	35.000	96.250	75.000	178.125	71.880
2	15.000	41.250	70.000	192.500	150.000	121.875	78.280
3	22.500	61.875	105.000	70.000	68.750	65.625	74.250
4	30.000	82.500	15.000	166.250	143.750	9.375	63.400
5	37.500	103.125	50.000	43.750	62.500	187.500	73.950
6	45.000	123.750	85.000	140.000	137.500	131.250	76.430
7	52.500	144.375	120.000	17.500	56.250	75.000	72.560
8	60.000	165.000	30.000	113.750	131.250	18.750	74.890
9	67.500	13.750	65.000	210.000	50.000	196.875	56.730
10	75.000	34.375	100.000	87.500	125.000	140.625	62.760
11	82.500	55.000	10.000	183.750	43.750	84.375	65.560
12	90.000	75.625	45.000	61.250	118.750	28.125	51.860
13	97.500	96.250	80.000	157.500	37.500	206.250	62.630
14	105.000	116.875	115.000	35.000	112.500	150.000	61.600
15	112.500	137.500	25.000	131.250	31.250	93.750	64.000
16	120.000	158.125	60.000	8.750	106.250	37.500	62.750
17	127.500	6.875	95.000	113.750	25.000	215.625	60.570
18	135.000	27.500	5.000	201.250	100.000	159.375	53.670
19	142.500	48.125	40.000	78.750	18.750	103.125	40.590
20	150.000	68.750	75.000	175.000	93.750	46.875	53.830
21	157.500	89.375	110.000	52.500	12.500	225.000	56.510
22	165.000	110.000	20.000	148.750	87.500	168.750	56.940
23	172.500	130.625	55.000	26.250	6.250	112.500	50.980
24	180.000	151.250	90.000	122.500	81.250	56.250	52.410

表7 回归方程的拟合分析

Table 7 Fitting analysis of regression equations

编号	回归方程式	r	F	P	f	最优解
方程1	$Y_1=73.137897-0.207888X_1+0.000508X_2^2+0.000347X_1X_6$	0.899	27.95	0.0001	3.2	$Y=85.69, X_1=7.50, X_2=165.00, X_3=5.21, X_4=209.38, X_5=24.27, X_6=109.44$
方程2	$Y_2=70.038433-0.236665X_1+0.000577X_2^2+0.000260X_1X_4+0.000415X_1X_6+0.000370X_3X_5$	0.920	19.94	0.0001	5.2	$Y=91.73, X_1=7.50, X_2=165.00, X_3=120.00, X_4=210.00, X_5=150.00, X_6=225.00$
方程3	$Y_3=76.102678-0.394420X_1+0.000879X_2^2+0.000721X_1X_2+0.001312X_1X_4-0.000850X_1X_5+0.000768X_1X_6-0.000799X_2X_3-0.000637X_2X_4+0.001364X_3X_5-0.000351X_4X_6$	0.948	11.54	0.0001	10.1	$Y=105.49, X_1=7.50, X_2=165.00, X_3=120.00, X_4=8.75, X_5=150.00, X_6=221.72$
方程4	$Y_4=76.582256-0.419964X_1+0.000708X_2^2+0.000999X_1X_2+0.001625X_1X_4-0.001307X_1X_5+0.000799X_1X_6-0.000843X_2X_3-0.000908X_2X_4+0.000456X_2X_5+0.001438X_3X_5-0.000386X_4X_6$	0.950	10.12	0.0002	11.1	$Y=112.36, X_1=7.50, X_2=165.00, X_3=120.00, X_4=8.75, X_5=150.00, X_6=225.00$
方程5	$Y_5=76.049709-0.410155X_1+0.000693X_2^2+0.000982X_1X_2+0.001756X_1X_4-0.001469X_1X_5+0.000705X_1X_6-0.000959X_2X_3-0.001049X_2X_4+0.000599X_2X_5+0.000162X_2X_6+0.001497X_3X_5-0.000402X_4X_6$	0.952	8.81	0.0005	12.1	$Y=119.18, X_1=7.50, X_2=165.00, X_3=120.00, X_4=8.75, X_5=150.00, X_6=225.00$

3.5 均匀设计拟合方程验证试验 按照表3的剂量进行验证试验得到细胞增殖抑制率实际值,另将

表3各成分给药剂量值分别代入到5个方程得到相应的预测值,见表8。计算预测值与实际值的相对

偏差,选取各方程平均相对偏差作为实际回归方程拟合程度的判断,公式为相对偏差= $(Y_{\text{实际值}}-Y_{\text{预测值}})/Y_{\text{实际值}}\times 100\%$ 。见表9。结果发现方程1~5的平均相对偏差分别为6.32%、6.58%、12.44%、17.91%、19.75%,根据平均相对偏差大小并结合实验情况可知,以细胞增殖抑制率 Y 作为因变量的拟合函数,函数的 Y 值应 ≤ 100 ,故方程3、方程4和方程5不纳入考虑。对方程1、方程2的平均相对偏差进行差异性检验,采用卡方检验,结果 $P>0.05$,表明二者差异无统计学意义。说明在表6试验域下芒柄花素、黄芪皂苷I、黄芪甲苷等6个成分之间的剂量关系可以用方程1或方程2进行预测。

表8 验证试验中各方程的预测值与实际值($n=7$)

Table 8 Predicted and actual values of each equation in verification test ($n=7$)

组别	Y/%					实际值
	方程1 预测值	方程2 预测值	方程3 预测值	方程4 预测值	方程5 预测值	
IC ₅₀ 组	60.58	63.41	61.28	60.95	60.95	70.30
均匀试验2组	71.52	72.86	74.12	74.54	74.45	74.43
方程1最优剂量组	85.69	84.77	69.93	57.98	55.35	76.76
方程2最优剂量组	85.99	91.73	70.42	67.16	68.80	86.83
方程3最优剂量组	85.98	91.33	105.49	112.35	119.09	87.08

表9 各方程预测值与实际值的相对偏差

Table 9 Relative deviation of predicted and actual values of each equation

组别	相对偏差/%				
	方程1	方程2	方程3	方程4	方程5
IC ₅₀ 组	13.83	9.80	12.83	13.30	13.30
均匀试验2组	3.92	2.11	0.42	0.14	0.03
方程1最优剂量组	11.64	10.44	8.90	24.47	27.89
方程2最优剂量组	0.97	5.64	18.90	22.65	20.76
方程3最优剂量组	1.27	4.88	21.14	29.01	36.75

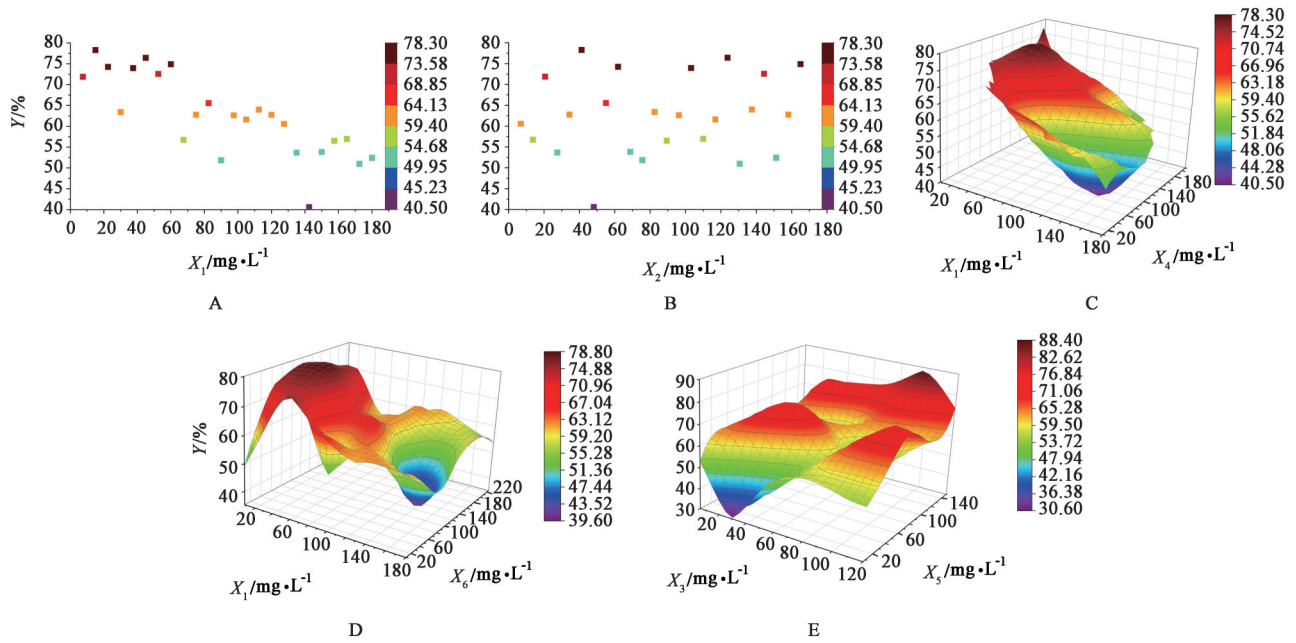
3.6 回归方程的回归系数比较 为了探讨6个自变量与效应值之间的量效关系,选择包含了6个自变量的方程2进行回归系数分析。因为试验域的设置未包含0,导致方程2的回归系数不能直接反映自变量之间的关系,故对方程2中含乘积项的二次多项式回归系数的判断需对每个自变量取值进行数据中心化处理,然后再次进行回归,得“对中”后回归方程 $Y=-1.480\ 260-0.146\ 281X_1+0.000\ 673X_2^2+0.000\ 314X_1X_4+0.000\ 456X_1X_6+0.000\ 737X_3X_5$ 。结果在试验域内黄芪皂苷I回归系数为正号,呈正向增

效作用;芒柄花素和毛蕊异黄酮、芒柄花素和毛蕊异黄酮苷交互项回归系数为正数,即对细胞增殖抑制率起正向交互作用;交互项中黄芪甲苷与阿魏酸乘积项的回归系数最大,说明二者对细胞增殖抑制率起到协同作用且效果大于其他交互项。

3.7 效应关系分析 分析方程2各项与 Y 的效应关系,由 X_1 与 Y 、 X_2 与 Y 作用的散点图可知,在试验域内芒柄花素用量越大,细胞增殖抑制率越小。黄芪皂苷I对 Y 的作用不是线性相关。在 X_1 与 X_4 、 X_1 与 X_6 的交互项中,随着芒柄花素取值越小,毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷取值越高,细胞增殖抑制率越大。 X_3 与 X_5 对 Y 的作用显示,黄芪甲苷与阿魏酸的交互作用在细胞增殖抑制率的体现中呈多峰形式,且当黄芪甲苷质量浓度取值在20~40 mg·L⁻¹,阿魏酸质量浓度取值在0~20 mg·L⁻¹处时 Y 值较低,随着黄芪甲苷与阿魏酸各自剂量的增加, Y 逐渐增高,黄芪甲苷与阿魏酸同时取较大值时,细胞增殖抑制率越高。见图1。

4 讨论

回归分析的目的是利用变量间的简单函数关系,通过自变量对因变量进行预测,使理论预测值尽可能地接近因变量的实际观测值^[15]。回归方程的最优解实际上是指相对较优的回归方程,没有绝对的最优^[16]。均匀设计试验数的确定与回归分析能够采用的模型息息相关,根据试验目的的不同,采用线性、曲线或者非参数回归模型来表达变量间关系所需试验数是不同的,从数学理论上来说,试验数越多拟合的方程越准确,能反映出来的药物配伍相互关系也就越多^[17]。本研究首先采用CCK-8法检测黄芪-当归主要化学成分对正常VSMCs的细胞毒性和对VSMCs增殖的抑制作用,计算出各成分的IC₅₀,通过均匀设计及逐步回归分析得到理论上各成分剂量与细胞增殖抑制率的回归关系函数,并通过回归方程的验证,找出符合各成分配伍关系的方程式。本实验旨在找出黄芪-当归中6个成分的配伍关系,以及其与因变量细胞增殖抑制率之间的量效关系。因考察因素较多,共有6个自变量,考虑到成分之间可能存在交互作用,选择线性和二次多项式2个回归模型进行分析,为使模型拟合更加准确,本实验选取4倍因素数的水平数,即每个因素24水平,试验24次。二次多项式回归模型中纳入考虑的有截距项、一次项、二次项、二次交互项共28个待估参数。但本实验总共仅设24个不同的水平组合,不足以估计二次多项式全模型,因此采用



注:A. X_1 与 Y 作用的散点图;B. X_2 与 Y 作用的散点图;C. X_1 、 X_4 与 Y 作用的三维曲面图;D. X_1 、 X_6 与 Y 作用的三维曲面图;E. X_3 、 X_5 与 Y 作用的三维曲面图

图1 回归方程2各自变量与响应值的效应关系

Fig. 1 Relationship between each independent variable and response value in regression equation 2

逐步回归方法进行变量筛选。结果显示,黄芪-当归中化学成分对正常VSMCs无明显毒性作用,不同质量浓度的各成分对PDGF-BB诱导的VSMCs增殖具有抑制作用。

在回归分析拟合的二次多项式模型中,本文拟合所得5个方程经 F 检验的 P 均 <0.05 ,说明这5个方程在均匀设计试验组合下对细胞增殖抑制率的拟合结果理论上都是可行的。五者的 r 大小排序为方程5 $>$ 方程4 $>$ 方程3 $>$ 方程2 $>$ 方程1, F 大小排序为方程1 $>$ 方程2 $>$ 方程3 $>$ 方程4 $>$ 方程5。方程5引入的参数变量最多,可见引入的参数变量越多, r 越大,但与此同时模型参数估计的稳定性会受到影响,在实际变量筛选中,遵循简约原则,一般需减少变量数。比较各组细胞增殖抑制率的预测值与实际值,发现理论上回归分析的最优方程虽然 r 最大,但实际运用上,其预测能力并不一定最好,提示回归分析得出的方程式,其最优解并不一定是唯一的,需根据研究目的不同综合考虑。例如,当需要对药物剂量与响应的拟合程度进行评价时,主要是看方程 r 的大小和显著性;当需要通过模型方程和设定药物剂量对响应做出预测时,要考虑模型方程的准确度,并进行多试验的验证对比;当研究各药物剂量组合的最优解或配比时,需对函数模型中每个变量的显著性综合考虑。

观察方程2发现,只有芒柄花素在式中为单独的一次项形式出现,同时与毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮作为乘积交互项共同对细胞增殖抑制率产生影响;同时,式中仅有黄芪皂苷I的二次项,且没有与之乘积的交互项。“对中”处理后的回归系数为0.000 673,说明黄芪皂苷I对细胞增殖抑制率起正相关作用,黄芪甲苷和阿魏酸对于细胞增殖抑制率也是以正向乘积项的形式存在。说明黄芪皂苷I、黄芪甲苷与阿魏酸合用能够抑制VSMCs增殖。由图1可知,在6种成分的配伍关系作用中,芒柄花素可能起到一个负性作用,但其与毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮配伍后可产生正向作用。除黄芪皂苷I以单独二次式出现,其他的药物都包含交互乘积的形式出现,所以“对中”后的回归系数无法比较出单个药物对细胞增殖抑制率的作用大小,6种成分之间主要是配伍的合用效果起到抑制VSMCs异常增殖的作用。

综上所述,中药成分的配伍并不只是单个成分药效之间的叠加,而是存在相互作用关系,这与中药方剂基于君臣佐使及合适剂量配伍的整体原则相符^[18-20]。建立目标分量效关系,分析确定合理的药效成分与用量范围,这一模式既可明确作用成分,还可确定量效关系,并且合理运用均匀设计与回归分析建模可以在某一设定效应下,建立合适的

数学模型对参数进行理论预测。本研究结合数理统计理论与方剂配伍原理揭示了黄芪-当归化学成分伍抗VSMCs异常增殖的量效关系,为研究中药配伍关系提供了一种研究思路与方法。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 方开泰. 均匀试验设计的理论、方法和应用——历史回顾[J]. 数理统计与管理, 2004, 23(3): 69-80.

[2] 方开泰, 刘民千, 覃红, 等. 均匀试验设计的理论和应用[M]. 北京: 科学出版社, 2020: 150-153.

[3] 王元, 方开泰. 关于均匀分布与试验设计(数论方法)[J]. 科学通报, 1981, 26(2): 65-70.

[4] 方开泰, 李久坤. 均匀设计的一些新结果[J]. 科学通报, 1994, 39(21): 1921-1924.

[5] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 19-84.

[6] HU W N, HUANG Y. Targeting the platelet-derived growth factor signaling in cardiovascular disease [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 42 (12) : 1221-1224.

[7] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归不同配伍比例对大鼠血管内膜增生的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 56-59.

[8] YAN H F, PENG X W, XU H, et al. Inhibition of aortic intimal hyperplasia and vascular smooth muscle proliferation and extracellular matrix protein expressions by astragalus-angelica combination [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 1508637.

[9] 彭熙炜, 阎卉芳, 黄娟, 等. 黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型炎性反应的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 580-584.

[10] 唐蓉, 张依人, 陈叶童, 等. 不同剂量配伍对黄芪-当归中5种化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,

2016, 22(23): 1-5.

[11] 谭婊子, 刘彩霞, 朱秋燕, 等. 黄芪当归主要活性成分配伍对人脐静脉内皮细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(24): 4141-4148.

[12] WEN X D, QI L W, PING L, et al. Simultaneous determination of calycosin-7-O-beta-D-glucoside, ononin, astragaloside IV, astragaloside I and ferulic acid in rat plasma after oral administration of Danggui Buxue Tang extract for their pharmacokinetic studies by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2008, 865(1/2): 99-105.

[13] 国家食品药品监督管理总局. 医用输液、输血、注射器具检验方法第2部分生物试验方法: GB/T 14233. 2—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005: 9.

[14] 刘天竹, 王帅, 李天娇, 等. 基于均匀设计法东北天南星治疗肺癌药效组分配伍优化研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 2023-2025.

[15] DETTE H, TITOFF S, VOLGUSHEV S, et al. Dose response signal detection under model uncertainty [J]. Biometrics, 2015, 71(4): 996-1008.

[16] 何晓群, 刘文卿. 应用回归分析[M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2001: 139.

[17] XIE M Y, FANG K T. Admissibility and minimaxity of the uniform design measure in nonparametric regression model [J]. J Stat Plan Inference, 2000, 83 (1): 101-111.

[18] 王阶, 郭丽丽, 王永炎. 中药方剂有效成(组)分配伍研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 5-9.

[19] 王喜军, 张伯礼. 基于药物代谢组学的方剂配伍规律及配伍科学价值揭示[J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (10): 1346-1348.

[20] 王娅杰, 崔羲和, 陈颖, 等. 戊己丸不同配伍方治疗肠易激综合征的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13): 1-9.

[责任编辑 刘德文]