

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

李若诗¹, 袁会琼^{1,2}, 刘江¹, 赵飞亚^{1,3}, 陶爱恩^{1,3}, 段宝忠¹, 王莹^{1*}, 夏从龙^{1*}

(1. 大理大学 药学与化学学院, 云南省高校滇西道地药材资源开发重点实验室, 云南 大理 671000;
2. 宜良县第一人民医院, 昆明 652100; 3. 云南大学 旅游文化学院, 云南 丽江 674100)

[摘要] 目的: 研究长柱重楼、滇重楼和南重楼的 HPLC 指纹图谱与其抗肝癌作用的谱效关系, 为明确重楼抗肝癌作用的物质基础提供实验依据。方法: 采用 HPLC 建立 3 种重楼提取物的指纹图谱, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%~25% A; 20~30 min, 25%~30% A; 30~40 min, 30%~35% A; 40~50 min, 35%~40% A; 50~60 min, 40% A; 60~75 min, 40%~45% A; 75~80 min, 45%~60% A), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长 203 nm; 利用噻唑蓝(MTT)比色法测定 3 种重楼提取物对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用, 计算半数抑制浓度(IC₅₀); 运用聚类分析(HCA)和灰色关联度分析(GRA)研究 3 种重楼指纹图谱和抗肝癌作用的关系, 找出对抗肝癌作用贡献较大的成分。结果: 在 3 种重楼的 HPLC 指纹图谱中, 确定其中 11 个色谱峰为共有峰。作用时间 72 h 时长柱重楼、滇重楼、南重楼的 IC₅₀ 分别为 148.33, 178.87, 208.09 mg·L⁻¹, 其中长柱重楼的抗肝癌活性最强。灰色关联度结果显示, 滇重楼共有峰中关联度较高的为 1~10 号峰, 长柱重楼共有峰关联度较高的为 1~7 号峰, 南重楼共有峰中关联度较高的为 1~4, 6~10, N1 号峰, 与 IC₅₀ 关联度均 > 0.7。各重楼变量的聚类分析结果显示, 可与 IC₅₀ 聚为一类的色谱峰的关联度均 > 0.7。结论: 建立了 3 种重楼的 HPLC 指纹图谱, 重复性良好。3 种重楼中的 1~4, 6 和 7 号色谱峰对抗肝癌药效贡献最大。

[关键词] 重楼; 指纹图谱; 抗肝癌作用; 聚类分析; 灰色关联度; 谱效关系; HepG2 细胞

[中图分类号] R22; R28; Q2; C37; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0192-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192449

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190904.0925.002.html>

[网络出版时间] 2019-09-04 10:18

Spectrum-effect Relationship of Anti-hepatoma Activity from 3 Kinds of Genus *Paris* Based on Cluster Analysis and Grey Relational Analysis

LI Ruo-shi¹, YUAN Hui-qiong^{1,2}, LIU Jiang¹, ZHAO Fei-ya^{1,3}, TAO Ai-en^{1,3},
DUAN Bao-zhong¹, WANG Ying^{1*}, XIA Cong-long^{1*}

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Key Laboratory of Universities in Yunnan Province on Development of Genuine Medicinal Materials Resources in Western Yunnan, Dali University, Dali 671000, China;
2. The First People's Hospital of Yiliang, Kunming 652100, China;
3. College of Tourism and Culture, Yunnan University, Lijiang 674100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and anti-hepatoma activity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, *P. forrestii* and *P. vietnamensis*, and to elucidate its

[收稿日期] 20190619(015)

[基金项目] 云南省州(市)区域创新能力提升专项(2018CA011-01); 大理大学中药资源与民族药创新团队项目(ZKLX2019318); 大理州科技局研究基金项目(D2018SA01); 国家自然科学基金项目(31860080); 昆明市科技计划项目(25318000000893)

[第一作者] 李若诗, 在读硕士, 从事中药资源及其品质评价研究, Tel:0872-2257415, E-mail:1767899093@qq.com

[通信作者] * 王莹, 博士, 讲师, 从事药效学研究, Tel:0872-2257415, E-mail:19985415@qq.com;

* 夏从龙, 教授, 从事天然药物资源调查及品质评价研究, Tel:0872-2257415, E-mail:long7484@126.com

effective substance. **Method:** HPLC was used to establish the fingerprint of three extracts from the plant. The mobile phase was consisted of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-10 min, 20% A; 10-20 min, 20% -25% A; 20-30 min, 25% -30% A; 30-40 min, 30% -35% A; 40-50 min, 35% -40% A; 50-60 min, 40% A; 60-75 min, 40% -45% A; 75-80 min, 45% -60% A), and the flow rate was $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The UV detection wavelength was 203 nm. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) array was used to detect the inhibitory effects of three extracts on the proliferation of HepG2 cells, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. Cluster analysis and grey relational analysis were used to analyze the data of spectrum and efficacy, and to find out the components that contributed a lot to the anti-liver cancer effect. **Result:** A total of 11 common peaks were identified as common peaks among HPLC fingerprints of three kinds of *Paris*. After treated 72 h, *P. forrestii* has the highest inhibitory effect on the HepG2 cells, the IC_{50} of *P. forrestii*, *P. polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. vietnamensis* were 148.33, 178.87, 208.09 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. According to the grey relational analysis, the common peaks 1-10 from *P. polyphylla* var. *yunnanensis* had great correlation to anti-tumor effect, and the common peaks 1-7 for *P. forrestii*, the common peaks 1-4, 6-10, N1 for *P. vietnamensis*, all the correlation degrees with IC_{50} were >0.7 . Cluster analysis of variables in each *Paris* showed that peaks with correlation degree >0.7 could cluster with IC_{50} . **Conclusion:** The established HPLC fingerprint method is reliable with good reproducibility. The peaks 1-4, 6 and 7 from three kinds of *Paris* have the greatest contribution to the anti-hepatoma effect.

[**Key words**] *Paridis Rhizoma*; fingerprint; anti-hepatoma effect; cluster analysis; grey correlation degree; spectrum-effect relationship; HepG2 cells

重楼为常用中药材,以干燥根茎入药,滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* 和七叶一枝花 *P. polyphylla* var. *chinensis* 是 2015 年版《中国药典》收录的基原植物^[1],其主要活性成分为甾体皂苷类化合物^[2-4]。近年来,由于市场需求日益剧增,重楼资源匮乏,多种重楼属近缘植物常作为重楼药材销售和使用,包括南重楼 *P. vietnamensis* 和长柱重楼 *P. forrestii*等^[5]。已有研究表明,长柱重楼和南重楼的皂苷类含量不逊于滇重楼和七叶一枝花,具有作为重楼替代资源使用的巨大潜力^[6-8]。现代药理研究表明,滇重楼^[9-10]及长柱重楼中总皂苷^[11]对多种肿瘤细胞均有一定的抑制作用;本课题组前期研究亦发现,南重楼总皂苷对多种肿瘤细胞具有抑制作用。目前临床上已有肝复乐片、益肺抗癌饮等^[12-15]多种以重楼为主要处方的成药用于多种肿瘤的治疗,因其广谱和毒性小,具有良好的临床应用前景。

中药谱效关系研究是将中药指纹图谱(活性物质)与药效学数据有机联系,通过合理的谱-效模型和分析方法,系统揭示中药活性成分与药理作用之间的关系,对中药药效物质基础的合理确定起到了积极作用^[16-18]。目前重楼甾体皂苷虽已被证实有良好的抗肿瘤活性,但其抗肿瘤药效物质基础研究尚停留在总皂苷或某几个单体皂苷的单一研究水平,通过谱效关系对其物质活性基础的研究尚未见报道。因此,本实验采用 HPLC 建立滇重楼、南重

楼、长柱重楼的指纹图谱,测定这 3 种重楼对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用,通过灰色关联度分析和聚类分析对三者的特征性指纹峰和抗肝癌作用进行关联,探讨其谱效关系,为进一步探讨重楼药材的药效物质基础提供实验依据,以期为重楼药材质量的全面评价及其代替资源开发提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪[美国 Agilent 有限公司,包括 G1322A 型在线脱气机, G1311A 型四元梯度泵, G1329A 型进样器, G1316A 型柱温箱, G1314B 型可变波长紫外检测器和 ChemStation 色谱工作站], AL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], FD-1C-80 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司), SW-CJ-IFD 型洁净工作台和 BSC-04IIA2 型生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司), NU-5510E 型 CO_2 培养箱(美国 Nuair 公司), CKX41SF 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), Gene5 型酶标分析仪(美国 BioTek 公司), FY135 型中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

人肝癌 HepG2 细胞株(上海海博科技有限公司), DMEM 高糖培养基(美国 HyClone 公司,批号 AD17218271); 磷酸盐缓冲液(PBS), 噻唑蓝(MTT), 胰蛋白酶及青链霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20181025, M8180, 20180911,

20180918); 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号 RNBD6084), 胎牛血清(FBS, 澳大利亚 Gibco 公司, 批号 1618862); 重楼皂苷 I, II, VI, VII 对照品(贵州迪大科技有限责任公司, 批号分别为 GZDD-0605, GZDD-0606, GZDD-0608, GZDD-0609, 纯度均 $\geq 98\%$), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

样品均购买或采集自云南省, 滇重楼 *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, 长柱重楼 *P. forrestii* 采集自大理白族自治州, 南重楼 *P. vietnamensis* 采集自文山壮族苗族自治州, 均经大理大学夏从龙教授鉴定, 药用部位为干燥根茎, 70 °C 烘干后粉碎, 过 60 目筛使用。凭证标本存放于大理大学药学与化学学院生药学教研室。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取干燥滇重楼、长柱重楼、南重楼粗粉适量, 分别加 70% 乙醇回流提取 2 次, 提取时间分别为 2, 1.5 h, 用 NaOH 调节提取液 pH 至 8, 过滤后取上清液减压浓缩, 用水重新溶解后冷冻干燥, 得各重楼提取物冻干粉。精密称定各重楼冻干粉 10 mg 置于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇超声使溶解并定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 以备建立指纹图谱使用。精密称定各重楼冻干粉 10 mg, 加入 DMSO 10 μL 使其溶解, 用 DMEM 培养基定容至 10 mL, 得 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, 临用前使用 DMEM 培养基配成所需质量浓度。

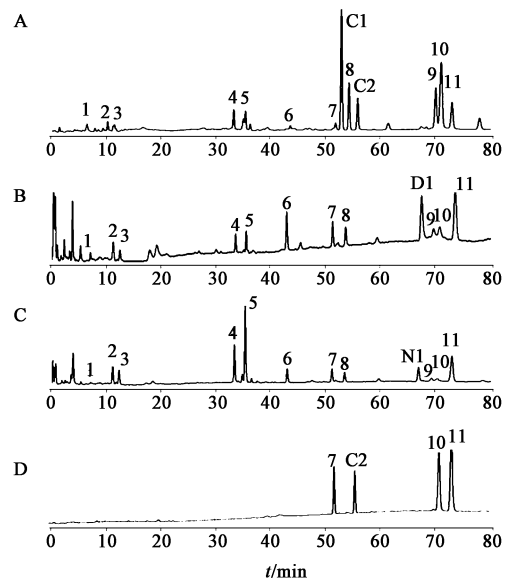
2.1.2 对照品溶液 分别精密称取重楼皂苷 I, II, VI, VII 对照品 0.64, 0.46, 0.26, 0.23 mg, 加甲醇定容至 4 mL, 临用前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得混合对照品溶液。

2.2 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 20% A; 10 ~ 20 min, 20% ~ 25% A; 20 ~ 30 min, 25% ~ 30% A; 30 ~ 40 min, 30% ~ 35% A; 40 ~ 50 min, 35% ~ 40% A; 50 ~ 60 min, 40% A; 60 ~ 75 min, 40% ~ 45% A; 75 ~ 80 min, 45% ~ 60% A), 流速 0.9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL 。

2.2.2 方法学考察 分别取 2.1.2 项供试品溶液, 参照 2.2.1 项下条件进行方法学考察, 结果精密度 RSD 均 $< 1\%$, 重复性 RSD 均 $< 3\%$, 稳定性 RSD 均 $< 5\%$, 表明该方法符合分析要求。

2.2.3 重楼药材的指纹图谱与数据分析 按 2.2.1 项下色谱条件建立 3 种重楼药材特征图谱, 特征图谱中的化学成分均有不同, 见图 1。结果发现 3 种重楼药材提取物共有峰 11 个, 编号 1 ~ 11, 长柱重楼中独有的色谱峰标记为 C1 ~ C2, 滇重楼中独有的色谱峰标记为 D1, 南重楼中独有的色谱峰标记为 N1。通过与对照品比对指认了其中 4 个色谱峰, 7 号峰为重楼皂苷 VI, C2 号峰为重楼皂苷 VII(其余 2 种重楼中均未检测到重楼皂苷 VII), 10 号峰为重楼皂苷 II, 11 号峰为重楼皂苷 I。各共有峰峰面积见表 1。



A. 长柱重楼; B. 滇重楼; C. 南重楼; D. 混合对照品

图 1 3 种重楼提取物的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint chromatograms of three kinds of *Paris* extracts

2.3 不同重楼对肝癌细胞体外药效学研究

2.3.1 细胞毒性试验 用胰蛋白酶消化处于对数生长期的 HepG2 细胞, 离心(1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min), 用完全培养基(DMEM 高糖培养基, 10% FBS, 1% 青链霉素)调节细胞密度至 5 $\times 10^4$ 个/mL, 以 200 μL /孔接种于 96 孔板, 边缘孔用 DMEM 培养基 200 μL 填充, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。用 DMEM 培养基将 2.1.1 项下各重楼提取物母液稀释至不同药物质量浓度(10, 50, 100, 150, 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 分别设置成不同药物质量浓度的给药组, 同时设置空白组, 每组设 6 个复孔。待细胞贴壁后吸弃原培养基, 依次按 200 μL /孔加入含药培养基溶液, 分别培养 24, 48, 72 h, 通过倒置相差显微镜观察细胞形态, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL , 继续置于培养箱中培养 4 h, 弃去培养液, 每孔加入

表 1 3 种重楼提取物 HPLC 指纹图谱共有峰的峰面积及其 Z-score
Table 1 Peak area and Z-score of each common peak in HPLC fingerprint of three kinds of *Paris* extracts

峰号	峰面积			Z-score		
	滇重楼	长柱重楼	南重楼	滇重楼	长柱重楼	南重楼
1	152.465	224.425	54.109	-0.290	-0.695	-0.758
2	152.068	204.653	408.219	-0.292	-0.724	0.093
3	90.391	177.321	316.172	-0.554	-0.764	-0.129
4	96.604	456.501	172.605	-0.528	-0.352	-0.473
5	109.537	375.083	1617.091	-0.473	-0.473	2.995
6	274.436	130.917	312.397	0.229	-0.833	-0.138
7	161.353	193.047	293.378	-0.252	-0.741	-0.183
C1	-	2711.163	-	-	2.976	-
8	124.985	1042.661	215.290	-0.407	0.513	-0.371
C2	-	716.515	-	-	0.032	-
D1(N1)	487.024	-	395.901	1.134	-	0.063
9	252.783	1044.500	419.878	0.137	0.516	0.121
10	281.065	1088.884	167.880	0.257	0.581	-0.485
11	947.695	902.587	964.171	3.094	0.306	1.427

表 2 3 种重楼提取物对 HepG2 细胞的抑制率及半数抑制浓度

Table 2 Inhibition rates and half inhibitory concentrations of three kinds of *Paris* extracts on HepG2 cells

药材	t/h	抑制率/%						IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
		10 mg·L ⁻¹	50 mg·L ⁻¹	100 mg·L ⁻¹	150 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹	400 mg·L ⁻¹	
长柱重楼	24	2.19	9.16	22.20	33.47	55.32	72.64	207.93 ¹⁾
	48	5.27	8.69	23.76	45.29	61.90	91.14	158.68 ¹⁾
	72	6.67	10.35	24.36	48.03	62.35	93.85	148.33 ¹⁾
滇重楼	24	1.64	7.28	15.18	28.04	43.43	68.38	251.19
	48	5.41	9.06	17.94	31.28	46.11	75.10	233.10
	72	6.55	11.56	19.13	40.39	56.25	84.57	178.87
南重楼	24	3.52	8.68	15.74	31.15	43.75	64.47	263.41 ¹⁾
	48	4.17	8.96	15.92	33.91	46.18	74.09	230.88
	72	5.73	9.10	17.83	37.32	50.67	78.03	208.09 ¹⁾

注:相同作用时间下,与滇重楼组比较¹⁾ P < 0.01。

抗癌作用,与金炜东等^[19] 研究结果一致。

2.4 谱效关系灰色关联度分析^[20-24]

2.4.1 原始数据的无量纲化处理

确定的参考序列为 72 h 药效学指标肝癌 HepG2 细胞半数抑制浓度(IC₅₀),比较序列为各重楼提取物特征峰峰面积,由于量纲不一致导致比较结果可信度较低,难以得出正确结论。因此,在进行灰色关联度分析时需要进行无量纲化的数据处理。运用 SPSS 24.0 对数据

DMSO 120 μL,摇床振荡 3 min 后采用酶标仪于 490 nm 处检测各孔吸光度 A,重复实验 3 次。

2.3.2 抗肝癌活性考察

不同质量浓度滇重楼、长柱重楼、南重楼对 HepG2 细胞作用不同时间的毒性作用情况见表 2。结果表明 3 种重楼之间抗肿瘤作用存在一定差异,且以长柱重楼对肿瘤细胞的抑制作用为最优。此外,3 种重楼提取物均以浓度依赖和时间依赖的方式抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。

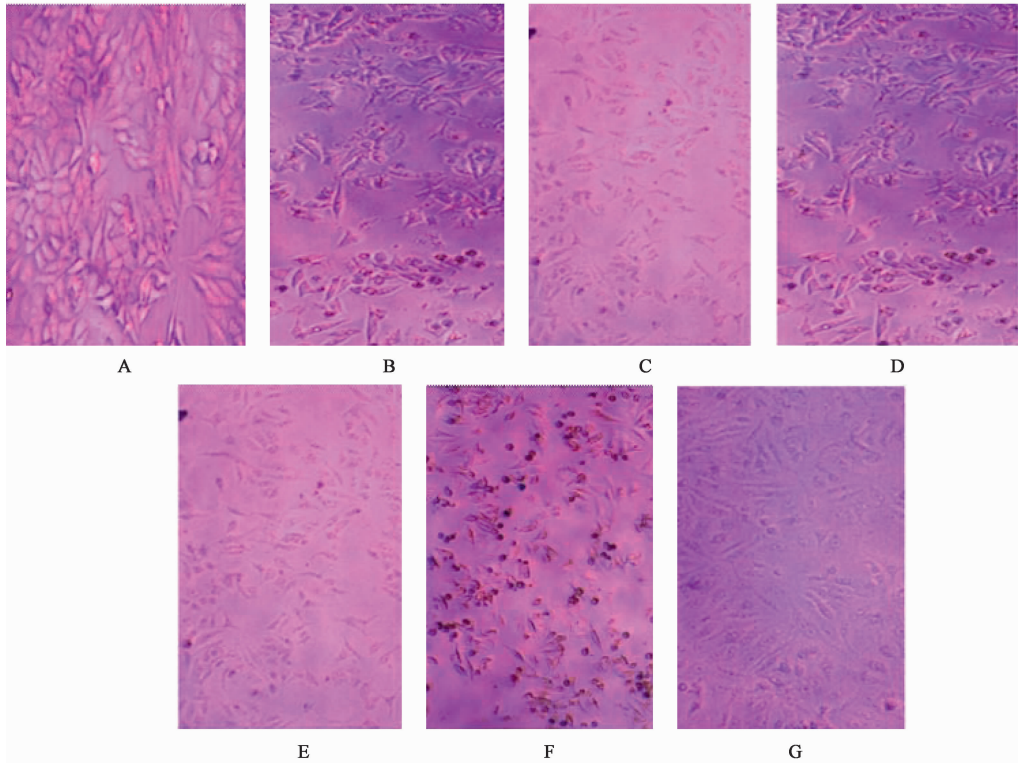
2.3.3 对细胞凋亡形态的影响

在倒置相差显微镜下观察 HepG2 细胞的形态,经 3 种重楼提取物处理之后,HepG2 细胞形态和数目均发生了一定的变化,见图 2。结果发现正常状态下 HepG2 细胞呈明显梭形,抱团生长,细胞间隙较小。200 mg·L⁻¹重楼提取物处理 72 h 后,细胞皱缩,贴壁性变差,细胞棱角消失,细胞间隙增大。400 mg·L⁻¹重楼提取物处理 72 h 后,细胞凋亡趋势更加显著,大部分细胞裂解、死亡,细胞形态完全消失,其中长柱重楼提取物对 HepG2 细胞形态影响最为显著,滇重楼次之,南重楼作用效果稍弱。说明重楼提取物对癌细胞的细胞毒作用是通过导致癌细胞的变性坏死而发挥其

进行 Z-score 标准化,结果见表 1。变换后的比较序列记为 {X₀(m)},参考序列记为 {X_i(m)}。

2.4.2 绝对差及灰色关联系数

对于一个参考序列 {X_i(m)} 有若干个比较序列 {X₀(m)},在 m = k 时,参考序列记为 {X_i(k)},比较序列记为 {X₀(k)}。比较序列与参考序列的绝对差 Δ_{oi}(k) = |X₀(k) - X_i(k)|,在 m = k 时,即曲线中的各点的关联系数 [β(k)] 可通过公式 β(k) = [Δ(min) +



A. 空白组; B. 200 mg·L⁻¹长柱重楼提取物; C. 400 mg·L⁻¹长柱重楼提取物; D. 200 mg·L⁻¹滇重楼提取物; E. 400 mg·L⁻¹滇重楼提取物; F. 200 mg·L⁻¹南重楼提取物; G. 400 mg·L⁻¹南重楼提取物

图 2 不同质量浓度重楼提取物对 HepG2 细胞凋亡形态的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 2 Effect of *Paris* extracts with different concentrations on apoptotic morphology of HepG2 cells (inverted microscope, ×100)

$\rho \times \Delta(\max)] / [\Delta_{0i}(k) + \rho \times \Delta(\max)]$ 算出。式中 k 为峰号, $\Delta_{0i}(k)$ 为 3 种重楼提取物抗肝癌活性药效指标(参考序列)与特征峰峰面积标准化数值(比较序列)的绝对差值, $\Delta(\min)$ 为两者绝对差值的最小值, $\Delta(\max)$ 为两者绝对差值的最大值; ρ 为分辨系数, 作用是减小 $\Delta(\max)$ 的失真, 通常取值 0.5。

2.4.3 求关联度(r) r 是比较序列与参考序列在各个时刻(即曲线中的各点)的关联程度值, 其值不止一个, 为了克服因信息过于分散而影响整体性比较, 取各个时刻关联系数的平均值作为比较数列与参考数列间关联程度的数量表示, 计算所得各特征峰的关联度, 见表 3。结果发现滇重楼各色谱峰对 HepG2 细胞抑制作用的贡献由小到大依次 11 < D1 < 10 < 6 < 3 < 4 < 5 < 8 < 9 < 2 < 1 < 7, 长柱重楼各色谱峰对 HepG2 细胞抑制作用的贡献由小到大依次 C1 < 10 < 9 < 8 < 11 < C2 < 4 < 5 < 1 < 2 < 7 < 3 < 6, 南重楼各色谱峰对 HepG2 细胞抑制作用的贡献由小到大依次 5 < 11 < 9 < 2 < N1 < 1 < 3 < 6 < 7 < 10 < 4 < 8。

$$r = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \beta(k) \quad (n \text{ 表示比较序列的数据个数})$$

表 3 各色谱峰与 3 种重楼提取物 IC₅₀ 的灰色关联度

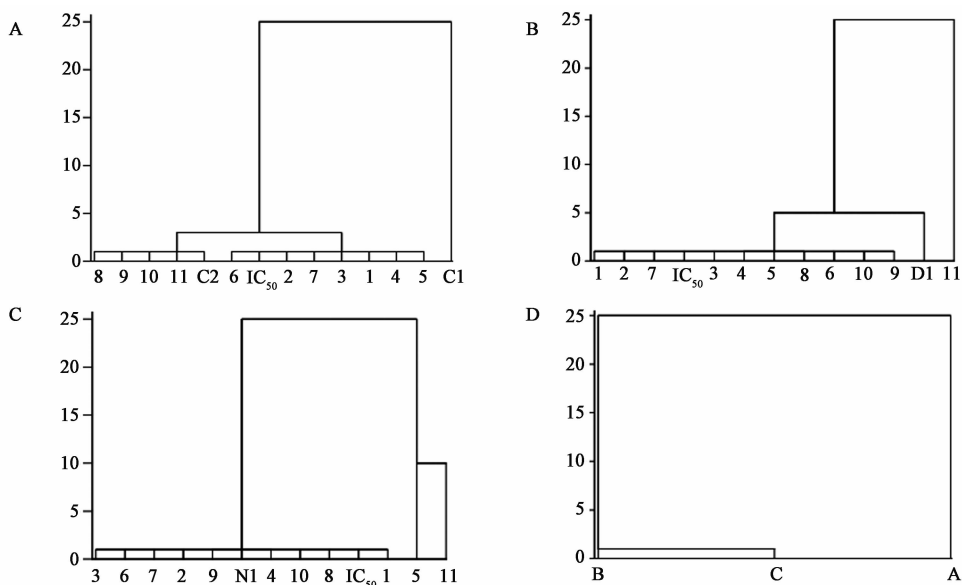
Table 3 Grey correlation degree between each common peak and IC₅₀ of three kinds of *Paris* extracts

峰号	成分	r		
		滇重楼	长柱重楼	南重楼
1	-	0.966	0.932	0.839
2	-	0.965	0.945	0.797
3	-	0.847	0.964	0.882
4	-	0.858	0.800	0.966
5	-	0.881	0.842	0.351
6	-	0.835	0.998	0.886
7	重楼皂苷 VI	0.986	0.953	0.907
C1	-	-	0.337	-
8	-	0.910	0.590	1.000
C2	重楼皂苷 VII	-	0.691	-
D1(N1)	-	0.590	-	0.807
9	-	0.954	0.589	0.787
10	重楼皂苷 II	0.825	0.578	0.960
11	重楼皂苷 I	0.361	0.629	0.503

2.5 色谱数据与药效数据相关性分析 分别选择

3 批样品的 HPLC 指纹图谱共有峰面积与其抗肝癌作用的 IC_{50} 的均值作为共同变量,利用 SPSS 24.0 进行聚类分析,见图 3。结果表明滇重楼与南重楼的药效活性和化学成分相似性较高,且均与长柱重楼

有较大差别。通过来自于同一样本变量的聚类分析结果并结合表 3 可知,在分类距离为 5 时,可将变量分为三类,其中抗肝癌药效指标 IC_{50} 与灰色关联度 $r > 0.700$ 的色谱峰聚为一类。



A. 长柱重楼; B. 滇重楼; C. 南重楼; D. 3 种重楼总变量

图 3 3 种重楼提取物指纹图谱和药效学所有变量的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of fingerprint of three *Paris* extracts and all variables of pharmacodynamics

3 讨论

本研究建立了 3 种重楼提取物的指纹图谱,共找出 11 个共有峰,指认了其中 4 个化合物。将 3 种重楼的指纹图谱与抗肝癌药效指标进行灰色关联度分析与聚类分析,结果表明 3 种重楼中与抗肝癌活性关联度较大 ($r > 0.700$) 的共有化学成分主要为 1~4, 6 号峰(未确定)以及 7 号峰(重楼皂苷 VI),说明各重楼提取物抗肝癌活性是化学成分群共同作用的结果,同时,也说明不同类型的重楼抗肝癌活性物质具有一定的相似性。滇重楼、南重楼中色谱峰 D1(N1)号峰(未确定),长柱重楼中色谱峰 C2(重楼皂苷 VII),均与抗肝癌药效有一定的关联度,可能为导致其药效活性存在差异的原因之一。

已有研究表明,重楼皂苷 I 和 VI 在体外均具有抗肝癌活性^[25-26]。在本研究中,3 种重楼中的重楼皂苷 VI 与抗肝癌活性关联度均 > 0.9 ,说明重楼皂苷 VI 可能为重楼抗肝癌作用的主要活性成分,重楼皂苷 I 与抗肝癌活性的关联度不高,可能是起到协同增效的作用。在南重楼、滇重楼中未检测出重楼皂苷 VII,这可能与重楼样品种类、采集年限、生长环境和采收期等因素有关。此外,本研究存在样品批次较少、指认色谱峰较少的问题,后续将针对重楼属药

材,扩大样品批次进行药效学研究,采用液质联用等技术进行有效成分的定性研究,进一步验证其谱效关系。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:260.
- [2] 舒童,龙倩倩,周斌. 重楼属植物的化学成分研究进展[J]. 山东化工,2019,48(4):48-49.
- [3] 丁立帅,赵猛,李燕敏,等. 七叶一枝花和滇重楼提取物的制备、表征及其体外溶血作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(21):7-12.
- [4] 杨远贵,张霁,张金渝,等. 重楼属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2016,47(18):3301-3323.
- [5] 蒋露,康利平,刘大会,等. 历代本草重楼基原考[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3469-3473.
- [6] 黄圆圆,刘大会,彭华胜,等. 15 种重楼属植物中 8 种甾体皂苷的含量测定[J]. 中国中药杂志,2017,42(18):3443-3451.
- [7] 王彩步,韩多,杨敏,等. 多茎滇重楼地上叶和茎中主要次生代谢产物的积累[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):34-38.
- [8] 黄圆圆,康利平,彭华胜,等. 长柱重楼中主要甾体皂

- 苷类成分的定性定量分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18):3452-3460.
- [9] 颜璐璐, 张艳军, 高文远, 等. 滇重楼皂苷对 10 种肿瘤细胞株的细胞毒谱及构效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):2057-2060.
- [10] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6):172-176.
- [11] 陈雪梅, 杨焕芝, 施敏, 等. 长柱重楼总皂苷的抗肿瘤活性及急性毒性作用研究[J]. 药物评价研究, 2017, 40(7):904-910.
- [12] 林云华, 钱晓萍. 中药重楼抗肿瘤作用的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(13):2358-2360.
- [13] 张秋萍, 毕慧欣, 谢琳. 重楼的药理作用及其临床应用研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(20):4113-4117.
- [14] 许玲, 刘嘉湘. 益肺抗瘤饮对肺癌转移及免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(7):401-403.
- [15] 张逸群, 曾继泽, 何年馨. 中药肝复乐配合介入治疗晚期肝癌疗效观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1998, 5(4):78-79.
- [16] 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(11):1581-1584.
- [17] 蔡靓, 张倩, 杨丰庆. 中药谱效学的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(23):5005-5011.
- [18] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18):2410-2413.
- [19] 金炜东, 陈孝平, 蔡红娇. 重楼提取物对 HepG2 细胞的毒性作用[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2006, 35(1):103-106.
- [20] 刘小花, 蔺兴遥, 梁瑾, 等. 黄芪药材利尿作用的谱效关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(5):491-495.
- [21] 梁健钦, 王剑, 熊万娜, 等. 基于灰色关联分析的芒果叶提取物抗炎作用的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1):121-125.
- [22] 王帅, 包永睿, 杨欣欣, 等. 基于谱效关系的朝鲜天南星和东北天南星相似性评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11):44-48.
- [23] 汪洋, 彭潇, 何燕玲, 等. 基于灰色关联分析探索艾纳香非挥发性部位的抗炎活性谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4):180-186.
- [24] 申鸽, 景大山, 杨飞, 等. 珍珠透骨草 HPLC 指纹图谱及抗炎活性的谱效关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12):174-180.
- [25] 倪博然, 董晓旭, 刘艺, 等. 重楼皂苷 VI 对肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4):1391-1395.
- [26] 阳丹丹, 齐琪, 陈正礼, 等. 内质网应激调控重楼皂苷 I 诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(11):1397-1406.

[责任编辑 刘德文]