

理因素与 CFb 共孵育 6 h, 即可见到 NO 及 iNOS 的变化, 说明在 Ang Ⅱ 诱导 CFb 增殖的过程中, 有 NO 系统的参与, 并且是作为一种早期反应的信号。与模型组比较, 原花青素 (25~100 mg/L) 可剂量依赖性升高细胞培养液中 NO 的量、增加 iNOS 活性。表明原花青素对 CFb 的 iNOS-NO 系统的活性具有促进作用。

细胞周期可在正、负调控因素共同作用下协调地进行, 正调控因素作用的增强和负调控因素作用的减弱是细胞增殖的机制。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 是细胞周期进程的负性调节因子。CKI 中的 p27 蛋白亚型目前被认为是细胞内调节增殖及细胞周期的重要影响因素^[7]。有研究表明, 在高血压左心室肥厚的形成过程中, p27 蛋白水平下降, 证明 p27 在心室肥厚中发挥重要作用^[8]; 血小板源性生长 (PDGF) 和血管升压素能通过下调 p27 蛋白表达, 使静止期血管平滑肌细胞 (VSMC) 通过 G₁ 期进入 S 期开始增殖^[9]。Diep 等^[10] 也发现, 给动物注射一定量的 Ang Ⅱ 后, 血管壁 DNA 合成增加, p21, p27 的表达降低。

以往的研究表明, 牛磺酸、苦参碱等抗氧化剂在发挥抑制 CFb 增殖作用时, 主要是影响 p27 的表达, 对于细胞周期正性调节因子未发现作用^[7]。本实验通过免疫细胞化学染色证明, CFb 中存在 p27 的表达, 在 Ang Ⅱ 的作用下, p27 的表达降低,

细胞增生活跃; 给予原花青素后, CFb 的 p27 蛋白的表达明显增加, 细胞增殖受阻。表明原花青素可通过促进 p27 蛋白表达而发挥对 CFb 细胞周期的调控, 使 CFb 停滞于 G₀/G₁ 期, 从而抑制 CFb 的增殖及胶原的合成, 降低 ECM 的沉积, 抑制心肌纤维化。

参考文献:

- [1] Subarnas A, Waqner H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleagueain A from *Polypodium feei* METT [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(5): 401-405
- [2] 梅寒芳, 谢朝阳, 杨红, 等. 原花青素对 β-淀粉样肽 25-35 诱导 PC-12 细胞 Pae-4 和 bcl 基因表达的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 405-408
- [3] Chen K, Mehta J L, Li D, et al. Transforming growth factor [beta] receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin Ⅱ [J]. *Circul Res*, 2004, 95(12): 1167-1173
- [4] 张伟, 杨涛, 苏彦欣, 等. 双苯氟嗪对血管紧张素 Ⅱ 诱导新生大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2): 207-212
- [5] 汪晨净, 高明堂, 时小燕, 等. 原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(2): 173-175
- [6] Farivar R S, Brecher P. Salicylate is a transcriptional inhibitor of the inducible nitric oxide synthase in cultured cardiac fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31585-31592
- [7] 王艳春, 李红, 杨世杰. 牛磺酸对心肌成纤维细胞细胞周期的影响及其机制的研究 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(11): 1471-1475
- [8] Li J M, Brooks G. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressorload hypertrophy [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2): 1358-1367
- [9] Rao G N. Differential regulation of p27kip1 levels and CDK activities by hypertrophic and hyperplastic agents in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1448(3): 525-532
- [10] Diep Q N, Mabrouk E I M, Touyz R M, et al. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin Ⅱ-infused rats: role of AT (1) receptors [J]. *Hypertension*, 2001, 37(2): 604-608

神经网络分析香丹注射液抗心肌缺血有效成分的谱效相关性研究

尹永芹, 朱俊访, 沈志滨^{1*}, 唐春萍, 杨超燕, 孙悦

(广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 寻找香丹注射液中抗垂体后叶素致大鼠心肌缺血的主要有效成分。方法 采取大鼠舌下 iv 垂体后叶素 (0.5 U/kg) 复制大鼠急性性心肌缺血模型, 观察香丹注射液的不同萃取部位及萃取部位的组合对大鼠注射垂体后叶素后不同时间点 Ⅱ 导联心电图 T 波变化情况, 结合香丹注射液不同极性萃取部位及萃取部位组合的指纹图谱, 运用神经网络分析抗垂体后叶素致大鼠心肌缺血的香丹注射液中主要有效成分。结果 香丹注射液中主要成分对垂体后叶素引起的心肌缺血模型 T 波抬高存在影响, 丹酚酸 D 和丹酚酸 A 在 0.5、10 s 对 T 波抬高的抑制作用随质量分数的提高而增强, 其余成分在 5 s、10 s、3 min 对 T 波抬高主要为促进作用。结论 香丹注射液抗垂体后叶素致大鼠心肌缺血的主要有效成分为丹酚酸 A 和丹酚酸 D。

关键词: 香丹注射液; 抗心肌缺血; 谱效相关性; 神经网络

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1284-04

* 收稿日期: 2008-12-18

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAI03-06); 广东省科技计划资助项目 (2008B030301035); 广东省自然科学基金资助项目 (8451022401001607); 广东药学院科研启动项目 (2007ZYX07)

作者简介: 尹永芹 (1977—), 女, 黑龙江七台河人, 博士, 讲师, 主要从事中药及天然药物有效成分及谱效相关性研究。

Tel: (020) 39352612 E-mail: yongqinyin@126.com

* 通讯作者 沈志滨 Tel: (020) 39352179 E-mail: szb8113@yahoo.com.cn

香丹注射液由丹参和降香两味中药组成,具有祛瘀止痛、活血通经、除烦安神的功效,可用于治疗中风、脑供血不足、冠心病等疾病^[1],另外香丹注射液对脑出血急性期也有较好的临床疗效^[2,3]。香丹注射液依次用石油醚(A)、氯仿(B)、醋酸乙酯(C)和正丁醇(D)萃取,共得到 A、B、C、D 和水层(E) 5 个极性部位及组合,并采用 HPLC 法分别测定各萃取部位和萃取部位组合的指纹图谱。本实验采用大鼠舌下 iv 垂体后叶素 (0.5 U/kg) 复制大鼠急性心肌缺血模型,观察香丹注射液的不同萃取部位及萃取部位组合对模型大鼠 iv 垂体后叶素后不同时间点 ①导联心电图 T 波的影响,结合香丹注射液萃取部位及部位组合的指纹图谱,运用神经网络分析抗垂体后叶素致心肌缺血的主要有效成分,为香丹注射液深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂: Waters 高效液相色谱仪, PDA 检测器, Empower 色谱工作站, 色谱柱 Alltima C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 大连依兰特分析仪器有限公司, Sartorius 天平, MedLab-6.2 生物信号采集处理系统 (南京美易科技有限公司)。香丹注射液,正大青春宝药业提供 (批号 0702071), 垂体后叶素,南京新百药业有限公司 (批号 030307), 水合氯醛,上海润捷化学试剂有限公司,硝酸甘油,广州白云山明兴制药有限公司 (批号 20060725), 原儿茶醛、丹酚酸 B、丹参素对照品均购于中国药品生物制品检定所,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,双蒸水 (自制)。

1.2 实验动物: SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 200~250 g,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号: 2007A004。

1.3 萃取部位及组合的制备: 香丹注射液依次用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取,每次 500 mL,萃取 3 次,得到 5 个不同极性部分,分别为石油醚部分(A)、氯仿部分(B)、醋酸乙酯部分(C)、正丁醇部分(D)和水部分(E)。萃取部位分别浓缩至 500 mL,根据实验要求组合不同萃取部位配伍组 (AB、AE、BD、CD、CE、DE、ABC、ACD、BCE、BDE 和 ADE),按体积 1:1 进行配伍,浓缩至干,加入聚山梨酯 80 与注射用水溶解,滤过即得供试品溶液。

1.4 动物筛选、分组与给药^[4]: SPF 级 SD 大鼠 200 只,33 g/L 水合氯醛 ip 麻醉,背位固定,接生物信号系统,筛选 ①导联心电图曲线正常动物 160 只,筛选指标为: J 点 (QRS 波群与 ST 段交界处)

明显者,心率较齐等。随机分为 20 组,每组 8 只: 对照组,模型组,硝酸甘油组 (阳性对照组,0.25 mg/kg), 香丹注射液组,香丹注射液萃取部位 A、B、C、D 和 E 组,极性部位组合 (AB、AE、BD、CD、CE、DE、ABC、ACD、BCE、BDE 和 ADE) 组。香丹注射液及萃取部位和萃取部位组合给药剂量为生药 16 g/kg,连续给药 2 d,第 1 天 ip 给药 (0.5 mL/100 g),第 2 天用 33 g/L 水合氯醛 ip 麻醉,背位固定,接 Medlab 生物信号系统,然后舌下 iv 相应的药物 (保持匀速),给药 1 min 后除对照组外各组舌下 iv 垂体后叶素 0.5 U/kg (1 mL/kg, 5 s 内匀速注射完毕) 进行造模,对照组给予等容量的 0.9% 氯化钠注射液,分别记录注射垂体后叶素后 0 s、5 s、10 s、3 min、5 min、10 min 的心电图,比较各组间心电图 T 波值变化情况 (ΔT = 造模后各时间点 T 波值 - 造模前 T 波值)。

1.5 数据统计方法: 数据统计学处理采用 SPSS 10.0 统计软件包,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 香丹注射液及各萃取部位和部位组合对垂体后叶素致心肌缺血大鼠心电图 T 波改变的影响: 萃取部位组合 ADE 和 BDE 组在 0、5、10 s 时间点 T 波变化值明显低于模型组 ($P < 0.01$),各给药组结果见表 1。

2.2 谱效相关性分析

2.2.1 采用 HPLC 法对各萃取部位色谱峰的表征: 按 1.3 项下制备供试液,取供试液即 A、B、C、D、E、AB、AE、BD、CD、CE、DE、ABC、ACD、BCE、BDE、ADE、ABCDE 部位各 10 μL,注入高效液相色谱仪,以乙腈-0.026% 磷酸水系统进行梯度洗脱,于 288 nm 波长下检测,体积流量 1 mL/min,记录 65 min。共分离出来 8 个色谱峰 (图 1),其保留时间 (t_R) 和质量浓度分别为: 丹参素 (4.76 min, 1.766 mg/mL, 1 号峰)、原儿茶醛 (10.80 min, 0.447 mg/mL, 2 号峰)、丹酚酸 D (38.84 min, 3 号峰)、迷迭香酸 (44.18 min, 0.317 mg/mL, 4 号峰)、未知 (45.40 min, 5 号峰)、丹酚酸 B (51.09 min, 0.566 mg/mL, 6 号峰)、丹酚酸 A (55.04 min, 0.236 mg/mL, 7 号峰)、丹酚酸 C (59.06 min, 8 号峰)。

2.2.2 采用 BP 神经网络进行抗心肌缺血实验的谱效相关性分析: 选取 A、B、C、D、E、AB、AE、BD、CD、CE、DE、ABC、ACD、BCE、BD、ADE 共 16 个部

表 1 香丹注射液各萃取部位及部位组合对垂体后叶素致大鼠心肌缺血 T 波抬高的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of extracting fractions and their combination in Xiangdan Injection on T wave raise induced by pituitrin ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	$\Delta T / mV$					
	0 s	5 s	10 s	3 min	5 min	10 min
对照	0.022 ± 0.016	0.019 ± 0.019	0.012 ± 0.015	0.001 ± 0.013	0.001 ± 0.020	-0.023 ± 0.021
模型	0.098 ± 0.040 ^{△△}	0.072 ± 0.053 [△]	0.075 ± 0.059 [△]	-0.045 ± 0.054 [△]	-0.054 ± 0.036 ^{△△}	-0.055 ± 0.042
香丹注射液	0.024 ± 0.018 ^{* *}	0.041 ± 0.046 [*]	0.029 ± 0.051 [*]	-0.039 ± 0.033	-0.040 ± 0.036	-0.003 ± 0.053
硝酸甘油	0.039 ± 0.019 ^{* *}	0.022 ± 0.028 [*]	0.018 ± 0.033 [*]	-0.055 ± 0.035	-0.053 ± 0.029	-0.056 ± 0.053
A	0.066 ± 0.031	0.039 ± 0.024	0.019 ± 0.038	-0.057 ± 0.066	-0.051 ± 0.059	-0.050 ± 0.064
B	0.055 ± 0.030 [*]	0.049 ± 0.028	0.026 ± 0.036	-0.048 ± 0.026	-0.057 ± 0.041	-0.032 ± 0.038
C	0.024 ± 0.025 ^{* *}	0.015 ± 0.025 [*]	0.017 ± 0.023 [*]	-0.064 ± 0.057	-0.075 ± 0.043	-0.068 ± 0.044
D	0.012 ± 0.049 ^{* *}	0.032 ± 0.046	0.029 ± 0.029	-0.028 ± 0.051	-0.040 ± 0.047	-0.056 ± 0.035
E	0.083 ± 0.081	0.080 ± 0.075	0.063 ± 0.065	-0.015 ± 0.045	-0.021 ± 0.041	-0.011 ± 0.034
AB	0.083 ± 0.039	0.068 ± 0.024	0.064 ± 0.068	-0.074 ± 0.049	-0.056 ± 0.042	-0.075 ± 0.045
AE	0.037 ± 0.031 ^{* *}	0.049 ± 0.054	0.021 ± 0.051 [*]	0.022 ± 0.062	0.025 ± 0.028	0.033 ± 0.026
DE	0.021 ± 0.040 ^{* *}	0.031 ± 0.044	0.022 ± 0.079	-0.049 ± 0.046	-0.049 ± 0.062	-0.053 ± 0.074
CD	0.068 ± 0.027	0.053 ± 0.033	0.111 ± 0.137	-0.095 ± 0.057 [*]	-0.084 ± 0.071	-0.107 ± 0.061
CE	0.024 ± 0.029 [*]	0.018 ± 0.046 [*]	0.002 ± 0.035 [*]	-0.053 ± 0.039	-0.055 ± 0.038	-0.065 ± 0.032
BD	0.047 ± 0.039 [*]	0.027 ± 0.034	0.037 ± 0.038	-0.036 ± 0.077	-0.047 ± 0.083	-0.048 ± 0.034
ADE	0.003 ± 0.054 ^{* *}	-0.005 ± 0.041 [*]	-0.016 ± 0.051 ^{* *}	-0.016 ± 0.046	0.002 ± 0.030 [*]	0.007 ± 0.054
BCE	0.014 ± 0.023 ^{* *}	0.004 ± 0.019 ^{* *}	0.001 ± 0.042 [*]	-0.047 ± 0.058	-0.021 ± 0.047	-0.040 ± 0.030
ACD	0.037 ± 0.037 [*]	0.028 ± 0.028 [*]	0.016 ± 0.048	-0.001 ± 0.045	-0.001 ± 0.042 [*]	-0.020 ± 0.058
ABC	0.062 ± 0.048	0.054 ± 0.052	0.046 ± 0.046	-0.060 ± 0.042	-0.077 ± 0.042	-0.073 ± 0.035
BDE	0.016 ± 0.020 ^{* *}	0.013 ± 0.017 [*]	0.005 ± 0.042 ^{* *}	-0.002 ± 0.031	-0.007 ± 0.038 [*]	-0.016 ± 0.034

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

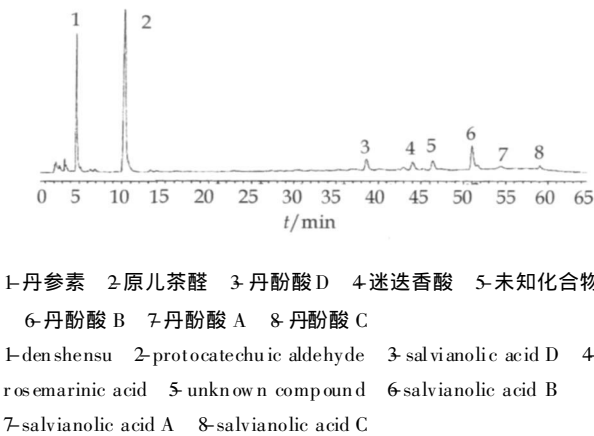


图 1 CE 部位的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of CE fraction

位的各色谱峰数据作为输入层神经元, 选取心肌缺血实验 0、5、10 s 药效学指标作为输出神经元。中间层选择 1 层神经元, 建立 BP 神经网络^[5]。所有实验数据在输入前应用规格化函数 $A(i) = A(i) / \text{MAX}(A)$ 进行处理, 使所有输入、输出样本规范到 $[0, 1]$ 的范围内。建立 BP 神经网络, 经过反复试验, 将隐含层神经元数目确定为 8, 输入层和隐含层间以及隐含层和输出层间的转换函数都采用对数 Sigmoid 函数 - logsig, 训练函数为 Levenberg-Marquardt 优化法-trainlm。采用默认的初始化参

数对网络连接权重和阈值进行初始化, 设置最大的循环迭代为 1 000; 设定学习速率为 0.01。

由于各部位用 HPLC 表征共 8 个色谱峰, CE 部位包含此 8 个色谱峰, 因此以 CE 部位为背景, 通过应用各部位 8 个色谱峰的 HPLC 数据与药效学指标的非线性映射模型, 利用仿真函数 sim 加以模拟, 可以得出各个色谱峰在 CE 部位为背景下的量效关系^[6]。经过 200 次的学习和训练, 网络误差从 1.684 4 下降到 1.328⁻³⁰。通过仿真函数 sim 模拟, 结果显示, 丹酚酸 D 和丹酚酸 A 在 0、5、10 s 对 T 波抬高的抑制作用随质量分数的提高而增加。其余成分在 5 s、10 s、3 min 对 T 波抬高主要为促进作用。BP 神经网络分析结果见图 2。

3 讨论

近年来随着医疗水平的提高和知识普及, 心肌缺血发病率和病死率有下降趋势, 但仍然是导致死亡的重要原因之一。实验中采用垂体后叶素复制心肌缺血模型, 以 T 波抬高为观察指标。本实验中各萃取部位含生药量为 16 g/kg, 其中萃取部位组合 ADE 和 BDE 能明显抑制注射垂体后叶素引起的 T 波抬高, 通过神经网络分析丹酚酸 A 和丹酚酸 D 能够在 0、5、10 s 对 T 波抬高的抑制作用随质量分数的提高而增强。丹酚酸 A 和丹酚酸 D 为酚酸类

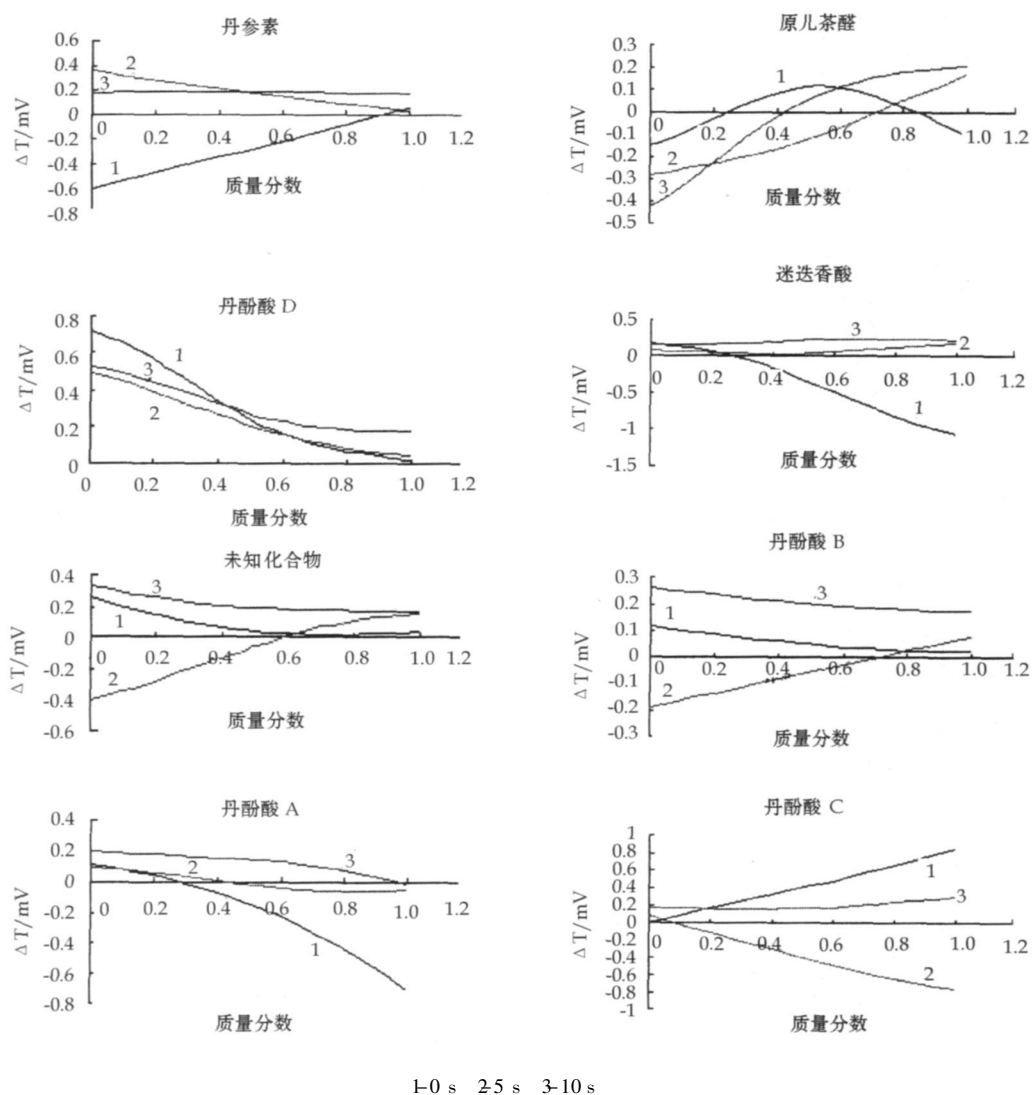


图 2 BP 神经网络分析共有峰抗心肌缺血作用

Fig. 2 BP neural networks analysis on antinyocardial ischemia of common peaks

成分, 极性较大主要存在 D 和 E 部位与实验结果一致, 表明人工神经网络在复方成分的药效学研究, 具有一定的实用价值。

参考文献:

- [1] 李津明, 王双侠, 李 鑫. 香丹缓释滴丸质量控制方法研究 [J]. 黑龙江中医药, 2008, (2): 48-50
- [2] 王来群, 于纯文, 梁中奎, 等. 复方丹参注射液治疗急性高血压性脑出血的临床观察 [J]. 中原医刊, 2002, 29(8): 43-

- 44
- [3] 许永良. 复方丹参注射液治疗高血压脑出血的临床观察 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(3): 141-142
- [4] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006
- [5] 宋小莉, 牛 欣, 司银楚, 等. 人工神经网络在半夏泻心汤配伍建模中的应用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(1): 104-107
- [6] 宋小莉, 牛 欣. 半夏泻心汤君药的药效学研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1584-1585