

## • 药理与临床 •

## 两面针提取物抗肝癌谱-效关系研究

王宏虹<sup>1,2</sup>, 刘华钢<sup>2\*</sup>, 黄慧学<sup>2</sup>, 刘丽敏<sup>2</sup>, 申庆荣<sup>3</sup>, 曹利娟<sup>4</sup>

1. 柳州市妇幼保健院, 广西 柳州 545001

2. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

3. 广西壮族自治区人民医院, 广西 南宁 530021

4. 柳州市人民医院, 广西 柳州 545001

**摘要:** **目的** 研究两面针药材提取物 HPLC 指纹图谱与抗肝癌活性之间的关系。**方法** 以人肝癌细胞株 HepG2 为药效模型, 采用 MTT 法测定 33 批不同产地两面针药材提取物的抗肝癌活性, 采用逐步后退法将量化特征峰面积与 MTT 法测得两面针提取物抗肿瘤活性的结果结合, 构建两面针药材提取物抗肝癌的谱效关系方程。**结果** 建立的两面针药材提取物 HPLC 指纹图谱相似度达到 0.7 以上, 经相似度软件筛选出 24 个特征指纹峰, 用逐步后退法拟合两面针药材提取物抗肝癌谱效关系方程, 该方程具有统计学意义和实际意义, 可较准确地预测两面针药材提取物的抗肝癌活性。**结论** 两面针药材提取物抗肝癌活性是多种成分协同、互补、制约相互作用的结果, 根据方程可预测肿瘤细胞的敏感性。

**关键词:** 两面针药材; HepG2 细胞; 谱效关系; 抗肝癌; 指纹图谱

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)08-1102-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.012

Antihepatoma spectrum-effect relationship of extract from *Zanthoxyli Radix*WANG Hong-hong<sup>1</sup>, LIU Hua-gang<sup>2</sup>, HUANG Hui-xue<sup>2</sup>, LIU Li-min<sup>2</sup>, SHEN Qing-rong<sup>3</sup>, CAO Li-juan<sup>4</sup>

1. Liuzhou Maternal and Children Health Hospital, Liuzhou 545001, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. The People's Hospital of Guangxi Zhuangzu Autonomous Region, Nanning 530021, China

4. The People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545001, China

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between HPLC fingerprint and antihepatoma activity of the extract from *Zanthoxyli Radix*. **Methods** *Zanthoxyli Radix* fingerprint was established and human hepatic carcinoma cell line HepG2 was chosen as efficacy model. The antihepatoma activity of the extracts in *Zanthoxyli Radix* of 33 batches from different habitats was determined by MTT method. After integrated the area of characteristic peak with the antihepatoma activity of *Zanthoxyli Radix*, the hepatic carcinoma "spectrum-effect" relationship was established by step-back technique. **Results** The HPLC-fingerprint of *Zanthoxyli Radix* was established, and the similarity of fingerprint had reached above 0.7. All data were done with the chromatographic fingerprint similarity evaluation system software, chosen out 24 fingerprint peaks. The spectrum-effect relationship on HepG2 was established and this relationship was significantly different. The results indicated that the multiple linear regression could predict the antihepatoma activity to HepG2 with statistical and practical significance. **Conclusion** The spectrum-effect relationship on HepG2 has the good predictive and describing abilities to evaluate the quality and therapeutic activity of *Zanthoxyli Radix*. According to the spectrum-effect relationship equation, we can predict the sensibility of different tumor cells.

**Key words:** *Zanthoxyli Radix*; HepG2 cell; spectrum-effect relationship; antihepatoma; fingerprint

中药指纹图谱是国家食品药品监督管理总局 (SFDA) 进行中药材鉴定和中成药质量控制的推荐

技术之一, 美国食品和药品管理局 (FDA) 和欧洲议会也允许在递交植物药及其制剂申报材料时提供

收稿日期: 2013-08-25

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (30760302)

作者简介: 王宏虹 (1985—), 女, 主管药师, 主要研究方向为中药药理作用机制及临床药学。Tel: (0772)2837566 E-mail: 269365342@qq.com

\*通信作者 刘华钢 (1956—), 女, 教授, 主要从事中药新剂型、新制剂及中药药理作用机制研究。Tel: (0771)5700208 E-mail: hgliu@126.net

相应的指纹图谱资料来证明产品质量的稳定性和一致性<sup>[1]</sup>。中药与化学药不同，中药相当于一个大复方，其成分多而复杂，大部分中药的化学成分不完全明确，而中药发挥药效的物质基础是其所含的起协同作用的各种化学成分，因此，仅用活性成分或指标成分的质量控制模式难以控制和评价中药的总体质量和疗效。中药这种基于多成分的协调、互补或制约，起着“宏观调控”作用的特点，也需要用综合的、宏观的、非线性的分析观念和质量控制模式来适应。如何在中药化学指纹图谱的基础上，找到与中药疗效相关的规律，建立一种既能定性定量检测中药的化学成分，又能反映中药临床疗效的模式，是本研究需要探讨和解决的问题。本实验以芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) D. C. 为研究对象，以人肝癌细胞株 HepG2 为药效模型，构建两面针的指纹图谱。在获得抗肿瘤活性测定的结果和建立化学成分指纹图谱的基础上，采用多元线性回归法，寻找两面针化学谱与药效之间的对应关系。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

采集到的 43 份两面针药材样品 (33 份样品用

于建立方程，将其编号为 1~33；10 份样品用于验证方程，将其编号为 Y1~Y10)，均经广西中医药研究所赖茂祥研究员鉴定，为芸香科 (*Rutaceae*) 花椒属 *Zanthoxylum* L. 植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) D. C. 的根，来源见表 1。对照品氯化两面针碱 (批号为 110848-200502)、乙氧基白屈菜红碱 (批号为 111718-200501)、芝麻素 (批号为 SE060523) 两面针对照药材 1 (批号为 121014-200302) 及两面针对照药材 2 (批号为 121014-200511) 均购自中国食品药品检定研究院，鹅掌楸碱为广西师范大学提供。注射用硫酸长春新碱 (批号为 20070522)，上海市华联制药有限公司；顺铂注射液 (批号为 9070202DD)，江苏省豪森药业股份有限公司；注射用顺铂 (批号为 9070202DD)，齐鲁制药有限公司；注射用羟基喜树碱 (批号为 20090901)，湖北省黄石李时珍药业集团；5-氟尿嘧啶注射液 (5-Fu, 批号为 FA090518)，上海市旭东海普药业有限公司；紫杉醇注射液 (批号为 08111602)，江苏省扬子江药业集团。乙腈，色谱纯，美国 Fisher 公司；三氯甲烷、二甲基亚砜 (DMSO)，分析纯，国药集团化学试剂有限公司。RPMI DMEM 培养基，美国 Gibco 公司。

表 1 两面针样品来源

Table 1 Sources of *Z. nitidum*

| 编号 | 样品采集地   | 编号 | 样品采集地   | 编号 | 样品采集地       | 编号  | 样品采集地       |
|----|---------|----|---------|----|-------------|-----|-------------|
| 1  | 广西北明县   | 12 | 广西巴马县   | 23 | 广西崇左        | Y1  | 融水 7 年生两面针根 |
| 2  | 南宁药材市场  | 13 | 广西那坡县   | 24 | 大塘镇         | Y2  | 大塘两面针 4 号   |
| 3  | 玉林药市    | 14 | 广西钦州那丽镇 | 25 | 高峰林场 2      | Y3  | 大塘两面针 6 号   |
| 4  | 广西天等县 1 | 15 | 广西扶绥县 1 | 26 | 对照药材 1      | Y4  | 大塘两面针 17 号  |
| 5  | 广西马山县   | 16 | 广西邕宁    | 27 | 对照药材 2      | Y5  | 大塘两面针 10 号  |
| 6  | 广西灵山沙坪镇 | 17 | 广西扶绥县 2 | 28 | 广西大塘 (原)    | Y6  | 大塘两面针 5 号   |
| 7  | 广西武鸣县   | 18 | 广西大新硕龙  | 29 | 融水 1 年生两面针根 | Y7  | 老虎岭两面针      |
| 8  | 广西田东县   | 19 | 广西大新上古岭 | 30 | 融水 2 年生两面针根 | Y8  | 大塘两面针 8 号   |
| 9  | 高峰林场 1  | 20 | 广西天等县 2 | 31 | 融水 3 年生两面针根 | Y9  | 大塘两面针 7 号   |
| 10 | 灵山旧州镇   | 21 | 大新榄圩镇   | 32 | 融水 4 年生两面针根 | Y10 | 大塘两面针 9 号   |
| 11 | 广西百色    | 22 | 广西隆安县   | 33 | 融水 5 年生两面针根 |     |             |

### 1.2 细胞

人肝癌细胞株 HepG2，购于中国科学院上海细胞库，培养于 DMEM 培养液，内含 10% 胎牛血清、L-谷氨酰胺 2 nmol/L、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 U/mL，37 °C、5% CO<sub>2</sub> 常规培养。

### 1.3 仪器

LC210A TVP 高效液相色谱仪，SPD—20A 紫外

可见检测器，CTO—20A 柱温箱，CBM—20A 工作站，日本岛津；Ultimate TM×B-C<sub>8</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm，5 μm)；2004A 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统；CO<sub>2</sub> 培养箱，美国 Forma Scientific Inc 公司；酶联免疫检测仪，美国 Thermo Labsystems 公司；Zeiss Axiovert 200 倒置光学显微镜，德国；96 孔培养板、超净工作台，加拿大 JET 公司。

## 2 方法

### 2.1 两面针药材提取物的制备

精密称取两面针药材约 3 g, 加氯仿 180 mL, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 回收氯仿, 残渣用无水乙醇定容到 5 mL 量瓶中, 即为两面针药材提取物。

### 2.2 两面针药材提取物化学指纹图谱的构建<sup>[2]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Ultimate TM×B-C<sub>8</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2% 磷酸(三乙胺调 pH 值至 2.07) 缓冲液(B), 梯度洗脱: 0~9 min, 27%A; 9~15 min, 27%~46%A; 15~40 min, 46%~66%A; 40~45 min, 66%~100%A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 250 nm; 进样量 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取经 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 真空干燥过夜的氯化两面针碱对照品 2.41 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 0.241 mg/mL 的氯化两面针碱对照品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液制备** 精密量取两面针药材提取物 1 mL, 置 5 mL 棕色量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

**2.2.4 化学指纹图谱的建立** 采用国家药典委员会推荐的中药指纹图谱相似度计算软件(中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版)进行模式识别, 获得了两面针指纹图谱的共有模式。以中国食品药品检定研究院提供的两面针对照药材为参照图谱, 对照图谱的生成方法为平均数法。

### 2.3 不同产地两面针药材提取物抗肿瘤活性测定

选取人肝癌细胞株 HepG2 作为实验模型, 采用 MTT 法测定 43 个产地的两面针药材提取物的抗肿瘤活性。根据预试验测定细胞生长速率的结果, 接种一定数量的细胞于 96 孔培养板, 保证在整个实验中细胞处于对数生长期, 并在药物作用终止时对照组细胞的吸光度(A)值在 1.0 左右。以每孔 190 μL (约 5×10<sup>4</sup> 个/孔) 接种于 96 孔板, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 分别加入各产地两面针药材提取物

(生药 6 mg/mL, 提取物的饱和浓度) 10 μL, 每个样品设 5 个复孔, 其中乙醇终体积分数为 1%; 取氯化两面针碱、鹅掌楸碱、乙氧基白屈菜红碱、白屈菜红碱、芝麻素为对照品, 紫杉醇、顺铂注射液、注射用顺铂、硫酸长春新碱、羟基喜树碱、5-Fu 为阳性对照, 各药品加入孔板终质量浓度为 10、5、2.5、1.25、0.625 μg/mL, 每个样品设 5 个复孔; 另外设空白对照孔 4 个, 只加完全培养基 200 μL, 不加细胞; 设阴性对照孔 4 个, 只加细胞悬液 190 μL。孵育 48 h 每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后仔细吸去上清液, 加入 DMSO 150 μL/孔, 平板震荡器振荡 5 min, 充分溶解蓝紫色颗粒, 空白对照孔调零, 用酶标仪以 570、630 nm 波长测定 A 值, 计算细胞增殖抑制率。实验重复 3 次<sup>[3-4]</sup>。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{药品}}) / A_{\text{阴性对照}}$$

### 2.4 两面针药材提取物抗肝癌谱-效关系方程建立

**2.4.1 量化特征峰数据** 将 HPLC 法测定所得的 33 个产地的两面针提取物各峰面积均数化, 处理成量化特征峰数据。处理后的特征峰数据为各峰与各峰平均面积的比值 ( $X=i$  峰的面积值/ $i$  峰平均面积值), 以衡量样品中各成分量的变化情况。

**2.4.2 建立谱-效关系方程** 利用 SPSS 13.0 统计软件分析, 自变量(X)为量化特征峰面积, 因变量(Y)为 MTT 法测得两面针药材抗肿瘤活性结果(抑制率), 采用逐步后退法构建两面针抗肝癌谱-效关系方程<sup>[5]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 两面针药材提取物化学指纹图谱

**3.1.1 HPLC 特征峰筛选** 经中药指纹图谱相似度计算软件(中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版)进行模式识别, 分析出 33 个产地两面针药材具有 24 个特征峰(图 1、2)。保留时间依次为 3.122、4.040、5.078、7.716、8.286、10.538、13.108、14.914、16.484、18.129、18.659、19.210、19.690、20.166、20.626、21.595、22.357、23.479、24.817、25.727、26.592、31.139、36.044、41.608 min。将各峰依次编号为 1~24。其中 6 号峰为氯化两面针碱。

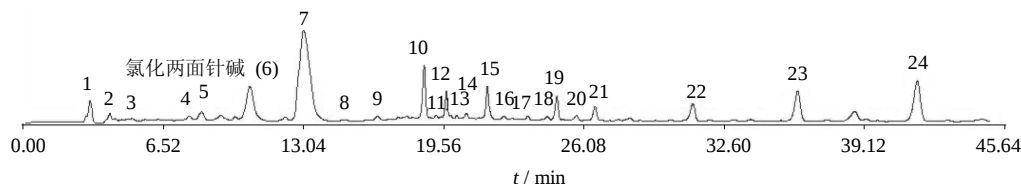


图 1 两面针药材提取物 HPLC 特征峰对照图谱

Fig. 1 HPLC characteristic peaks of extract from *Zanthoxyli Radix*

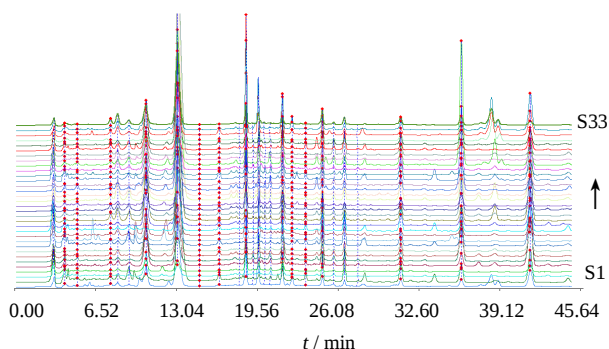


图 2 33 个两面针药材提取物的 HPLC 叠加图

Fig. 2 HPLC overlay graph of 33 *Zanthoxyli Radix* extracts

**3.1.2 各产地两面针药材提取物 HPLC 相似度** 指纹图谱相似度计算以对照图谱 (图 1) 为参照, 各样品指纹图谱与对照图谱进行比较, 计算得各产地两面针提取物指纹图谱的相似度 (表 2)。

### 3.2 两面针药材提取物抗肿瘤活性测定结果

#### 3.2.1 各产地两面针提取物抗肿瘤活性 各产地

表 2 各产地两面针药材提取物指纹图谱的相似度

Table 2 Semblance of 33 *Zanthoxyli Radix* extracts from different habitats

| 样品 | 相似度   | 样品 | 相似度   | 样品 | 相似度   |
|----|-------|----|-------|----|-------|
| 1  | 0.948 | 12 | 0.991 | 23 | 0.993 |
| 2  | 0.757 | 13 | 0.986 | 24 | 0.893 |
| 3  | 0.759 | 14 | 0.986 | 25 | 0.975 |
| 4  | 0.875 | 15 | 0.989 | 26 | 0.943 |
| 5  | 0.703 | 16 | 0.732 | 27 | 0.770 |
| 6  | 0.982 | 17 | 0.96  | 28 | 0.988 |
| 7  | 0.874 | 18 | 0.975 | 29 | 0.444 |
| 8  | 0.919 | 19 | 0.847 | 30 | 0.842 |
| 9  | 0.674 | 20 | 0.986 | 31 | 0.928 |
| 10 | 0.958 | 21 | 0.935 | 32 | 0.957 |
| 11 | 0.933 | 22 | 0.944 | 33 | 0.923 |

两面针提取物生药质量浓度为 6 mg/mL 时对肝癌细胞株 HepG2 的增殖抑制作用见表 3。

表 3 各产地两面针药材提取物对 HepG2 细胞株的体外生长抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Inhibitory effect of *Zanthoxyli Radix* from different habitats on HepG2 cell line ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 样品 | 抑制率 / %      | 样品 | 抑制率 / %      | 样品 | 抑制率 / %      | 样品  | 抑制率 / %      |
|----|--------------|----|--------------|----|--------------|-----|--------------|
| 1  | 54.08 ± 1.56 | 12 | 55.20 ± 2.28 | 23 | 52.78 ± 1.01 | Y1  | 57.75 ± 0.90 |
| 2  | 59.12 ± 2.11 | 13 | 69.13 ± 2.24 | 24 | 55.81 ± 2.41 | Y2  | 54.97 ± 1.46 |
| 3  | 52.11 ± 1.98 | 14 | 57.85 ± 2.30 | 25 | 46.34 ± 2.62 | Y3  | 37.76 ± 2.40 |
| 4  | 57.35 ± 2.06 | 15 | 58.92 ± 2.07 | 26 | 48.99 ± 1.05 | Y4  | 56.63 ± 1.79 |
| 5  | 61.22 ± 2.26 | 16 | 43.56 ± 2.86 | 27 | 56.11 ± 1.05 | Y5  | 64.97 ± 1.46 |
| 6  | 25.39 ± 2.62 | 17 | 55.02 ± 1.94 | 28 | 41.93 ± 1.26 | Y6  | 58.23 ± 1.40 |
| 7  | 54.09 ± 2.54 | 18 | 59.89 ± 1.36 | 29 | 36.79 ± 0.34 | Y7  | 62.12 ± 1.47 |
| 8  | 26.51 ± 1.59 | 19 | 45.36 ± 1.08 | 30 | 51.34 ± 2.34 | Y8  | 68.41 ± 1.14 |
| 9  | 40.19 ± 1.45 | 20 | 46.76 ± 1.76 | 31 | 55.41 ± 0.56 | Y9  | 72.95 ± 1.41 |
| 10 | 57.50 ± 2.63 | 21 | 36.71 ± 2.46 | 32 | 53.06 ± 1.16 | Y10 | 65.94 ± 0.96 |
| 11 | 58.60 ± 2.07 | 22 | 57.18 ± 1.98 | 33 | 53.77 ± 1.88 |     |              |

**3.2.2 对照品对肿瘤细胞的体外生长抑制作用** 5 种对照品中, 氯化两面针碱对肿瘤细胞 HepG2 的生长具有明显的抑制作用, 生长抑制作用曲线相似, 并呈现良好的剂量依赖性, 见图 3。

**3.2.3 阳性对照对肿瘤细胞的体外生长抑制作用** 6 种阳性对照药品中, 紫杉醇、顺铂对肿瘤细胞 HepG2 的生长具有明显的抑制作用, 生长抑制作用曲线相似, 并呈现良好的剂量依赖性, 见图 4。

### 3.3 量化特征峰数据

将处理后的特征峰 1~24 的量化特征峰数据依次设为  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、……、 $X_{24}$ , 见表 4, 10 个验证样品的量化特征峰数据见表 5。

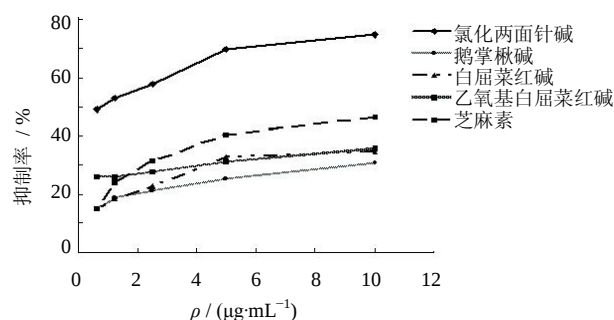


图 3 对照品对 HepG2 细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Inhibitory effect of reference substances on growth of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

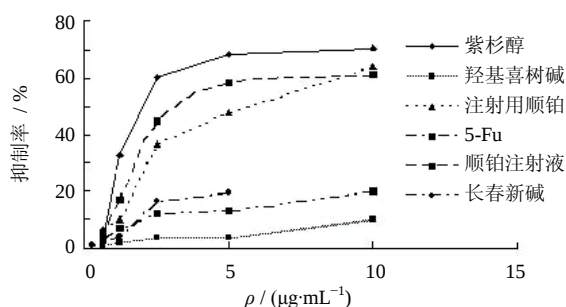


图4 阳性对照药对 HepG2 细胞生长的抑制作用  
( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 4 Inhibitory effect of positive control drugs  
on growth of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.4 两面针药材提取物抗肝癌谱-效关系

3.4.1 两面针药材提取物抗肝癌谱-效关系方程  
经 SPSS 13.0 统计软件分析, 采用逐步后退法, 构建两面针抗肝癌谱-效关系方程:  $Y=70.255-16.695 X_1-2.756 X_3+11.519 X_5+3.107 X_6-4.491 X_7-1.737 X_8-1.052 X_9+13.224 X_{10}-11.944 X_{11}-9.035 X_{12}-25.106 X_{15}+9.911 X_{16}+10.796 X_{17}+10.489 X_{18}+3.432 X_{20}-12.643 X_{21}+6.152 X_{23}$  ( $P<0.01, R^2=0.977$ )。对抗肝癌活性的贡献大小依次为  $X_{10}>X_5>X_{17}>X_{18}>X_{16}>X_{23}>X_{20}>X_6>X_9>X_8>X_3>X_7>X_{12}>X_{11}>X_{21}>X_{15}>X_1$ , 其中  $X_{10}$ 、 $X_5$ 、

表4 33批不同产地两面针药材提取物的 HPLC 量化特征峰均数化数据

Table 4 Data of HPLC characteristic peaks of extracts of *Zanthoxyli Radix* from 33 batches in different habitats

| 样品 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $X_5$ | $X_6$ | $X_7$ | $X_8$ | $X_9$ | $X_{10}$ | $X_{11}$ | $X_{12}$ |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|
| 1  | 2.83  | 2.71  | 2.05  | 1.58  | 1.80  | 0.59  | 2.13  | 0.12  | 1.35  | 1.21     | 0.09     | 0.48     |
| 2  | 0.99  | 1.42  | 1.38  | 0.87  | 0.72  | 0.98  | 0.19  | 2.41  | 1.82  | 1.94     | 0.69     | 1.30     |
| 3  | 0.90  | 1.15  | 1.10  | 0.65  | 0.66  | 0.61  | 0.18  | 2.05  | 1.66  | 1.42     | 0.93     | 0.95     |
| 4  | 1.13  | 1.26  | 0.77  | 1.07  | 0.98  | 1.53  | 0.67  | 1.68  | 0.73  | 1.58     | 0.62     | 1.55     |
| 5  | 1.05  | 1.26  | 2.27  | 0.88  | 0.79  | 1.70  | 0.30  | 1.86  | 0.71  | 1.67     | 0.35     | 1.85     |
| 6  | 0.83  | 0.96  | 0.87  | 1.03  | 0.99  | 0.24  | 0.05  | 1.85  | 2.13  | 1.59     | 0.55     | 1.43     |
| 7  | 0.58  | 0.71  | 0.79  | 0.62  | 0.57  | 1.42  | 0.37  | 1.77  | 1.89  | 1.82     | 0.51     | 0.98     |
| 8  | 2.18  | 2.97  | 0.69  | 1.53  | 1.01  | 0.39  | 1.02  | 3.04  | 2.95  | 2.31     | 0.22     | 1.85     |
| 9  | 0.99  | 1.01  | 1.08  | 0.45  | 0.80  | 0.71  | 0.31  | 1.72  | 1.12  | 1.18     | 2.39     | 0.19     |
| 10 | 0.83  | 0.79  | 0.88  | 0.66  | 0.99  | 0.96  | 0.95  | 1.71  | 1.74  | 1.65     | 2.01     | 0.22     |
| 11 | 1.81  | 2.14  | 0.46  | 0.80  | 0.82  | 0.24  | 0.75  | 0.14  | 1.49  | 1.76     | 0.13     | 1.19     |
| 12 | 0.51  | 0.58  | 0.88  | 0.61  | 0.72  | 1.26  | 0.94  | 0.41  | 0.67  | 0.81     | 0.36     | 1.18     |
| 13 | 0.68  | 0.55  | 0.50  | 1.65  | 1.57  | 2.10  | 2.05  | 0.58  | 0.31  | 0.35     | 0.92     | 1.18     |
| 14 | 0.94  | 0.99  | 1.13  | 0.93  | 1.16  | 1.45  | 1.74  | 0.21  | 0.63  | 0.26     | 0.70     | 1.22     |
| 15 | 0.57  | 0.55  | 0.73  | 1.57  | 0.98  | 1.20  | 1.50  | 0.56  | 0.56  | 0.51     | 1.47     | 1.24     |
| 16 | 0.82  | 0.96  | 1.33  | 0.58  | 0.82  | 0.55  | 0.20  | 1.64  | 1.03  | 1.41     | 0.85     | 1.17     |
| 17 | 0.90  | 0.85  | 0.95  | 1.48  | 2.38  | 1.47  | 3.45  | 0.70  | 0.29  | 0.42     | 0.87     | 1.02     |
| 18 | 0.75  | 0.66  | 0.95  | 1.49  | 1.46  | 1.79  | 2.52  | 0.59  | 0.30  | 0.47     | 2.94     | 0.08     |
| 19 | 1.11  | 1.04  | 2.78  | 1.14  | 1.17  | 0.88  | 0.82  | 2.64  | 1.55  | 1.72     | 1.41     | 0.07     |
| 20 | 0.55  | 0.51  | 0.48  | 0.47  | 0.59  | 0.89  | 0.79  | 0.19  | 0.51  | 0.33     | 0.54     | 1.43     |
| 21 | 1.87  | 2.25  | 0.95  | 0.80  | 0.68  | 0.34  | 0.86  | 2.48  | 3.03  | 1.95     | 0.22     | 2.15     |
| 22 | 0.93  | 0.96  | 1.05  | 0.67  | 0.82  | 0.80  | 0.59  | 0.37  | 0.43  | 1.57     | 1.34     | 0.19     |
| 23 | 0.78  | 0.83  | 0.70  | 1.08  | 1.43  | 1.12  | 1.09  | 0.25  | 0.14  | 0.19     | 1.06     | 1.45     |
| 24 | 0.97  | 0.78  | 1.47  | 1.33  | 0.81  | 1.04  | 1.55  | 0.13  | 0.38  | 0.03     | 1.30     | 0.17     |
| 25 | 0.83  | 0.75  | 0.75  | 1.14  | 1.36  | 1.12  | 0.84  | 0.14  | 0.19  | 0.16     | 1.16     | 1.19     |
| 26 | 0.70  | 0.58  | 0.37  | 0.80  | 0.61  | 1.51  | 2.53  | 0.04  | 0.39  | 0.18     | 0.11     | 0.55     |
| 27 | 1.70  | 1.29  | 2.50  | 1.56  | 0.97  | 0.76  | 0.22  | 1.47  | 0.95  | 1.87     | 0.70     | 1.86     |
| 28 | 0.57  | 0.46  | 0.51  | 0.95  | 0.73  | 1.25  | 1.01  | 0.21  | 0.51  | 0.43     | 0.89     | 1.41     |
| 29 | 0.65  | 0.34  | 0.44  | 0.37  | 0.23  | 0.38  | 0.08  | 1.72  | 0.97  | 1.02     | 0.45     | 0.46     |
| 30 | 0.78  | 0.42  | 0.51  | 1.27  | 1.15  | 0.92  | 0.63  | 0.07  | 2.09  | 1.05     | 2.72     | 0.77     |
| 31 | 0.95  | 0.54  | 0.63  | 0.84  | 1.21  | 1.05  | 0.92  | 0.18  | 0.22  | 0.03     | 2.10     | 0.72     |
| 32 | 0.62  | 0.31  | 0.45  | 1.51  | 1.39  | 0.97  | 0.92  | 0.02  | 0.06  | 0.05     | 0.63     | 0.80     |
| 33 | 0.71  | 0.40  | 0.58  | 0.63  | 0.63  | 0.78  | 0.83  | 0.04  | 0.20  | 0.05     | 1.77     | 0.70     |

续表 4

| 样品 | $X_{13}$ | $X_{14}$ | $X_{15}$ | $X_{16}$ | $X_{17}$ | $X_{18}$ | $X_{19}$ | $X_{20}$ | $X_{21}$ | $X_{22}$ | $X_{23}$ | $X_{24}$ |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1  | 0.23     | 0.44     | 0.29     | 0.87     | 1.45     | 2.53     | 1.62     | 0.72     | 2.87     | 1.58     | 1.00     | 1.19     |
| 2  | 0.41     | 0.97     | 1.32     | 0.99     | 0.99     | 0.96     | 0.81     | 1.23     | 0.42     | 0.77     | 0.50     | 0.62     |
| 3  | 0.49     | 0.85     | 0.96     | 0.72     | 0.82     | 0.87     | 0.34     | 0.88     | 0.28     | 0.66     | 0.20     | 0.24     |
| 4  | 0.40     | 0.89     | 1.18     | 1.44     | 0.67     | 0.86     | 2.08     | 0.67     | 0.46     | 0.52     | 0.58     | 2.78     |
| 5  | 1.26     | 0.89     | 1.73     | 2.24     | 0.18     | 1.08     | 1.26     | 1.17     | 0.68     | 0.95     | 2.61     | 1.52     |
| 6  | 0.74     | 1.29     | 1.46     | 1.50     | 0.87     | 0.59     | 1.08     | 1.32     | 1.25     | 0.98     | 1.59     | 1.28     |
| 7  | 0.62     | 0.91     | 1.33     | 0.80     | 0.65     | 0.55     | 0.86     | 0.70     | 0.44     | 0.86     | 0.48     | 0.92     |
| 8  | 0.57     | 1.14     | 1.36     | 1.04     | 1.40     | 2.56     | 2.74     | 0.27     | 3.35     | 1.32     | 0.91     | 2.10     |
| 9  | 2.67     | 0.10     | 1.45     | 0.71     | 1.59     | 1.03     | 0.64     | 0.55     | 0.38     | 0.29     | 0.27     | 0.35     |
| 10 | 0.84     | 1.13     | 1.02     | 0.78     | 1.03     | 1.19     | 0.85     | 0.74     | 0.98     | 0.39     | 0.60     | 0.65     |
| 11 | 0.29     | 1.00     | 0.59     | 0.56     | 0.95     | 1.68     | 1.10     | 0.54     | 1.73     | 2.00     | 0.54     | 0.93     |
| 12 | 0.38     | 1.10     | 1.12     | 1.09     | 0.85     | 0.63     | 1.02     | 0.97     | 0.73     | 0.93     | 0.66     | 0.99     |
| 13 | 0.24     | 1.28     | 0.82     | 1.11     | 0.69     | 1.23     | 0.71     | 1.15     | 0.96     | 1.15     | 0.76     | 2.19     |
| 14 | 0.83     | 1.39     | 1.16     | 1.10     | 0.99     | 0.63     | 0.94     | 1.33     | 1.15     | 0.99     | 1.75     | 1.71     |
| 15 | 0.48     | 1.30     | 0.87     | 1.19     | 1.03     | 1.32     | 1.00     | 0.96     | 0.71     | 0.97     | 0.84     | 1.28     |
| 16 | 1.62     | 1.10     | 1.16     | 1.35     | 0.66     | 1.11     | 0.35     | 0.87     | 0.32     | 0.66     | 0.68     | 0.22     |
| 17 | 1.32     | 1.64     | 1.24     | 0.89     | 0.75     | 1.09     | 1.02     | 1.24     | 1.12     | 2.12     | 1.19     | 2.16     |
| 18 | 0.99     | 1.44     | 1.25     | 0.68     | 1.55     | 0.85     | 0.64     | 0.86     | 0.87     | 1.01     | 1.85     | 1.73     |
| 19 | 0.55     | 1.76     | 1.98     | 0.31     | 0.80     | 1.08     | 0.66     | 1.00     | 0.84     | 1.20     | 3.96     | 0.59     |
| 20 | 0.67     | 0.90     | 1.06     | 0.98     | 0.89     | 0.62     | 0.98     | 1.27     | 0.67     | 0.79     | 0.56     | 0.35     |
| 21 | 0.79     | 0.91     | 0.60     | 1.13     | 1.21     | 1.96     | 1.26     | 0.57     | 2.35     | 2.19     | 0.82     | 1.36     |
| 22 | 1.96     | 1.61     | 1.34     | 0.92     | 1.03     | 0.77     | 0.90     | 0.89     | 0.57     | 0.88     | 0.53     | 0.52     |
| 23 | 1.41     | 1.00     | 1.05     | 1.27     | 0.76     | 0.99     | 1.53     | 1.43     | 0.65     | 1.04     | 0.56     | 1.52     |
| 24 | 0.84     | 0.63     | 1.70     | 1.77     | 0.88     | 0.78     | 0.55     | 1.95     | 1.26     | 1.65     | 5.73     | 0.95     |
| 25 | 1.11     | 1.11     | 0.65     | 0.75     | 0.84     | 0.80     | 0.75     | 1.08     | 0.81     | 0.85     | 0.38     | 0.30     |
| 26 | 1.40     | 0.60     | 0.53     | 0.70     | 0.68     | 0.43     | 0.70     | 2.65     | 1.77     | 1.62     | 0.52     | 0.34     |
| 27 | 0.31     | 1.08     | 0.92     | 0.85     | 0.95     | 1.47     | 0.96     | 0.78     | 1.69     | 0.49     | 0.41     | 0.68     |
| 28 | 0.61     | 0.89     | 1.43     | 1.06     | 1.06     | 0.62     | 1.49     | 1.08     | 0.79     | 0.78     | 0.79     | 0.56     |
| 29 | 0.42     | 0.76     | 0.29     | 0.22     | 0.52     | 0.68     | 0.35     | 0.69     | 0.25     | 0.66     | 0.09     | 0.00     |
| 30 | 2.37     | 0.88     | 0.37     | 1.54     | 1.34     | 0.53     | 0.95     | 0.60     | 0.63     | 0.69     | 0.46     | 0.86     |
| 31 | 2.17     | 1.01     | 0.44     | 1.32     | 2.42     | 0.51     | 1.03     | 0.69     | 0.70     | 0.84     | 0.39     | 1.33     |
| 32 | 0.82     | 0.93     | 0.31     | 0.38     | 0.68     | 0.50     | 1.11     | 0.86     | 0.75     | 0.63     | 0.46     | 0.15     |
| 33 | 3.20     | 0.07     | 0.03     | 0.75     | 1.81     | 0.52     | 0.73     | 1.27     | 0.57     | 0.55     | 0.36     | 0.58     |

$X_{17}$ 、 $X_{18}$ 、 $X_{16}$ 、 $X_{23}$ 、 $X_{20}$ 、 $X_6$  对抗肝癌活性呈正相关,  $X_9$ 、 $X_8$ 、 $X_3$ 、 $X_7$ 、 $X_{12}$ 、 $X_{11}$ 、 $X_{21}$ 、 $X_{15}$ 、 $X_1$  对抗肝癌活性呈负相关。已知成分  $X_6$  (氯化两面针碱) 呈正相关, 符合实际。

**3.4.2 残差图** 方程残差服从近似正态分布, 自变量和因变量之间符合线性关系, 所用模型适合用于建立两面针药材的抗肝癌谱-效关系方程, 见图 5、6。

**3.4.3 验证方程** 将 10 个验证样品的量化特征峰数据代入两面针抗肝癌谱效方程, 对上述建立的数学模型的准确性和实用性进行了验证, 结果见表 6。结果发现, 由所建立的数学模型计算得到的 10 批两面针验证样品的抑制率估计值与实验测得真实值的偏差率全部在 10% 以内, 说明方程拟合度良好。

表5 10个验证样品的HPLC量化特征峰均数化数据

Table 5 Data of HPLC characteristic peaks of 10 verifications in *Zanthoxyli Radix*

| 样品  | X <sub>1</sub>  | X <sub>2</sub>  | X <sub>3</sub>  | X <sub>4</sub>  | X <sub>5</sub>  | X <sub>6</sub>  | X <sub>7</sub>  | X <sub>8</sub>  | X <sub>9</sub>  | X <sub>10</sub> | X <sub>10</sub> | X <sub>12</sub> |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Y1  | 1.03            | 1.18            | 0.88            | 0.74            | 1.01            | 0.91            | 0.36            | 2.66            | 3.69            | 1.35            | 2.39            | 0.13            |
| Y2  | 1.51            | 0.87            | 1.47            | 1.74            | 1.80            | 1.49            | 0.92            | 0.05            | 0.48            | 0.14            | 1.38            | 1.15            |
| Y3  | 0.85            | 0.52            | 0.85            | 1.35            | 0.52            | 0.89            | 0.86            | 0.08            | 0.07            | 0.12            | 2.27            | 0.76            |
| Y4  | 0.59            | 0.40            | 0.93            | 0.45            | 0.45            | 0.54            | 0.54            | 0.12            | 0.10            | 0.08            | 2.14            | 0.04            |
| Y5  | 0.98            | 0.58            | 1.14            | 1.66            | 1.11            | 1.39            | 1.50            | 0.14            | 0.62            | 0.06            | 0.68            | 0.86            |
| Y6  | 0.66            | 0.34            | 0.56            | 1.66            | 1.72            | 2.34            | 2.56            | 0.08            | 0.13            | 0.08            | 1.56            | 1.37            |
| Y7  | 0.55            | 0.31            | 0.53            | 1.04            | 0.60            | 0.67            | 0.62            | 0.03            | 0.03            | 0.06            | 1.01            | 0.62            |
| Y8  | 0.82            | 0.45            | 0.94            | 1.47            | 1.24            | 1.40            | 1.60            | 0.03            | 0.06            | 0.06            | 1.09            | 0.93            |
| Y9  | 1.04            | 0.49            | 1.15            | 1.83            | 2.03            | 1.98            | 2.05            | 0.25            | 0.19            | 0.11            | 2.45            | 0.14            |
| Y10 | 0.70            | 0.37            | 1.55            | 0.54            | 0.54            | 0.57            | 0.14            | 1.49            | 1.48            | 1.05            | 1.23            | 0.06            |
| 样品  | X <sub>13</sub> | X <sub>14</sub> | X <sub>15</sub> | X <sub>16</sub> | X <sub>17</sub> | X <sub>18</sub> | X <sub>19</sub> | X <sub>20</sub> | X <sub>21</sub> | X <sub>22</sub> | X <sub>23</sub> | X <sub>24</sub> |
| Y1  | 18.89           | 0.14            | 0.51            | 0.46            | 3.66            | 0.35            | 0.77            | 0.86            | 0.79            | 0.71            | 0.25            | 0.42            |
| Y2  | 0.83            | 0.76            | 0.52            | 1.12            | 1.42            | 0.86            | 0.84            | 1.40            | 0.88            | 0.69            | 0.46            | 1.50            |
| Y3  | 0.80            | 0.58            | 0.29            | 0.39            | 0.63            | 0.75            | 0.80            | 0.80            | 0.57            | 0.72            | 0.38            | 0.15            |
| Y4  | 2.74            | 0.05            | 0.05            | 0.31            | 0.99            | 0.34            | 0.64            | 0.79            | 0.32            | 0.45            | 0.28            | 0.04            |
| Y5  | 1.08            | 0.62            | 0.21            | 0.92            | 1.22            | 0.55            | 0.46            | 1.00            | 0.52            | 0.98            | 0.89            | 1.09            |
| Y6  | 0.32            | 0.56            | 0.18            | 0.94            | 1.21            | 0.83            | 0.99            | 2.00            | 2.03            | 1.01            | 0.40            | 1.00            |
| Y7  | 0.28            | 0.47            | 0.20            | 0.27            | 0.73            | 0.43            | 0.29            | 0.60            | 0.35            | 0.55            | 0.19            | 0.28            |
| Y8  | 0.24            | 0.41            | 0.19            | 0.54            | 1.01            | 0.59            | 0.52            | 1.83            | 0.57            | 1.17            | 1.44            | 2.89            |
| Y9  | 0.18            | 0.25            | 0.12            | 0.98            | 1.19            | 1.02            | 0.93            | 1.03            | 0.86            | 1.38            | 1.86            | 2.88            |
| Y10 | 0.94            | 0.80            | 0.57            | 0.41            | 0.82            | 0.52            | 0.26            | 0.57            | 0.34            | 0.67            | 0.89            | 0.67            |

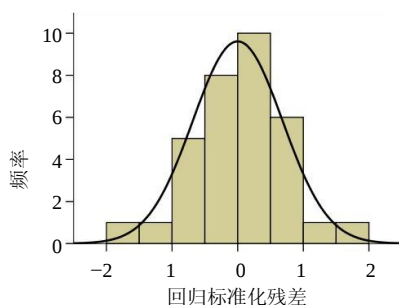


图5 因变量马氏距离分布直方图

Fig. 5 Mahalanobis distance histogram for dependent variable

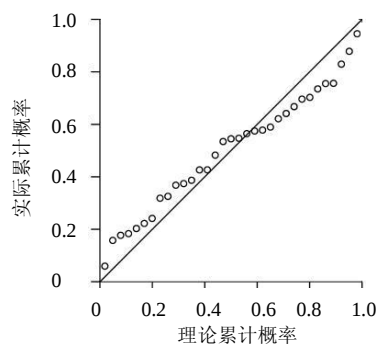


图6 因变量正态概率图

Fig. 6 Normal P-P plot of dependent variable

#### 4 讨论

药品的质量监控是决定药物在临床应用中安全性和有效性的重要手段,是新药研究和开发中面临的一项重要而又艰巨的难题。目前中药的疗效和作用很难用现代医学来解释,其疗效并非众多成分的简单加和,因此在质量检测时,测定单一或几个

化学成分的量,并不能真实反映中药材的内在质量。本实验进行两面针提取物抗肝癌谱-效关系的研究,通过揭示两面针药材抗肝癌活性的物质基础,完整地表征多种单体成分的药效物质组成特征,建立能反映两面针药材抗肿瘤药效的谱效关系方程。

表6 两面针抗肝癌谱效相关质量评价数学模型验证结果  
Table 6 Verification of *Zanthoxyli Radix* on spectrum-effect relationship of antihepatoma evaluated by mathematical model

| 样品  | HepG2 抑制率 / % |       | 偏差率 / % |
|-----|---------------|-------|---------|
|     | 真实值           | 估计值   |         |
| Y1  | 57.75         | 59.14 | 2.41    |
| Y2  | 54.97         | 55.39 | 0.77    |
| Y3  | 37.76         | 35.13 | 6.97    |
| Y4  | 56.63         | 53.44 | 5.64    |
| Y5  | 64.97         | 70.06 | 7.83    |
| Y6  | 58.23         | 53.09 | 8.83    |
| Y7  | 62.12         | 57.57 | 7.33    |
| Y8  | 68.41         | 70.24 | 2.67    |
| Y9  | 72.95         | 74.81 | 2.54    |
| Y10 | 65.94         | 63.55 | 3.62    |

建立谱效关系方程所用的逐步后退法,其原理是:首先拟合包含全部自变量的回归方程,对方程做  $F$  检验。把引入方程的每个自变量视为引入方程的最后一个自变量,计算其贡献,选贡献最小者做  $F$  检验,如显著则终止;如不显著,则把该变量从回归方程剔除。如此类推,直至回归方程内的各自变量不能剔除为止。逐步后退法可最大程度地保留有贡献的变量,优于逐步前进法<sup>[6]</sup>。

本研究结果发现,各产地两面针药材提取物对 HepG2 肿瘤细胞的抑制作用存在明显差异,产地为广西马山县、广西那坡县两面针药材以及大塘两面针 7~10 号、老虎岭两面针药材对 HepG2 细胞增殖的抑制作用较强。根据本课题组对两面针提取物抗肿瘤谱效关系研究,两面针提取物抗宫颈癌谱效关系方程为  $Y=28.071+18.451 X_1-13.693 X_2-4.670 X_4+9.028 X_6+6.292 X_7-1.817 X_8-3.428 X_{11}+10.852 X_{14}-5.395 X_{15}+6.936 X_{17}+9.263 X_{18}+8.904 X_{19}+4.567 X_{20}-9.226 X_{21}-8.954 X_{22}+3.619 X_{23}-5.357 X_{24}$  ( $P<0.01$ ,  $R^2=0.957$ ),两面针提取物抗胃癌谱效关系方程为  $Y=79.153-8.503 X_1+6.79 X_5+4.529 X_6-5.108 X_7+5.231 X_{10}-8.32 X_{11}-9.404 X_{12}-$

$23.646 X_{15}+9.853 X_{16}+5.008 X_{17}-6.819 X_{20}+3.987 X_{21}+3.935 X_{22}-3.006 X_{23}$  ( $P<0.01$ ,  $R^2=0.913$ ),经对比发现两面对 HeLa、HepG2、SGC-7901 3 种细胞株的谱效方程不一致<sup>[2,7]</sup>。肿瘤是一个异质性、多态性、分化不均的细胞群体,因此不同种类的肿瘤对抗癌药物的敏感性不同,根据方程可预测对不同肿瘤的敏感性,尽可能地开发药物的应用价值。观察谱-效方程发现,氯化两面针碱( $t_R$  为 10.5 min)的贡献并不是最大的,由此推断两面针药材提取物中可能含有比氯化两面针碱更有效的抗肿瘤活性成分,也可能是在其他成分的作用和影响下,氯化两面针碱的抗肿瘤活性有所下调。本研究建立两面针抗肝癌谱效关系方程,正体现了中药药效的产生是多成分相互协调、互补或制约的结果。本研究所建立的谱效方程,共有峰对药效的贡献均是统计学计算所得,将来可考虑对每个共有峰的药效指标,及各共有峰间的协同、制约、互补等相互作用进行深入研究。

#### 参考文献

- [1] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141-149.
- [2] 申庆荣, 黄慧学, 王宏虹, 等. 两面针提取物抗胃癌谱-效关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2693-2696.
- [3] Kawada K, Yonei T, Ueoka H, *et al.* comparison of the mosensitivity test: clonogenic assay versus MTT assay [J]. *Acta Medokayama*, 2002, 56(3): 129-134.
- [4] El-Khoury V, Gomez D, Liautaud-Roger F, *et al.* Effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on nuclear texture and c-jun gene expression in drug-sensitive and drugresistant human H69 lung carcinoma cells [J]. *Cytometry*, 2004, 62A: 109-117.
- [5] 黄正南. 医用多因素分析 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1995.
- [6] 陈 峰. 医用多元统计分析方法 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2006.
- [7] 王宏虹, 刘华钢, 黄慧学, 等. 两面针抗宫颈癌谱-效关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(5): 84-89.