

基于主成分分析和多指标综合指数法丹参不同有效部位的活血化瘀作用比较

庞汉青, 唐于平*, 史旭芹, 曾慧婷, 许会芹, 瞿 城, 朱振华, 宿树兰, 段金廛

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 江苏省方剂高新技术研究重点实验室 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 基于主成分分析(PCA)和多指标综合指数法,评价丹参不同有效部位丹参提取物(DT)、丹参总酚酸提取物(DF)、丹参总酮提取物(DST)、丹参总酚酸合用总酮提取物(DF+DST)对急性血瘀大鼠血液流变学和凝血功能的影响。**方法** 采用sc盐酸肾上腺素和冰水浴共同刺激复制大鼠急性血瘀模型,通过测定全血黏度(WBV)、血浆黏度(PV)、血沉(ESR)和红细胞压积(HCT),观察丹参不同有效部位不同剂量对血瘀大鼠血液流变学的影响;通过测定凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、血浆纤维蛋白原(FIB)量及血小板最大聚集率(ADP),观察丹参不同有效部位对血瘀大鼠凝血功能及血小板聚集的影响。采用PCA法和多指标综合指数法综合评价丹参不同有效部位的总活血化瘀效应。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠血液流变学和凝血功能指标均有显著性差异;与模型组比较,丹参不同部位低、中、高3个剂量给药组均能较好地改善血瘀大鼠的血液流变学和凝血功能指标,并呈一定的量效关系。PCA和多指标综合指数法综合评价得出,丹参不同有效部位不同剂量组中DF+DST高剂量组的活血化瘀作用最好;相同剂量下,各剂量下的DF+DST给药组活血化瘀效应较好。**结论** 丹参不同有效部位能明显改善血瘀大鼠的血液流变学及凝血功能异常,丹参总酚酸和丹参总酮2个有效部位配伍活血化瘀效果优于各有效部位单用的效果。

关键词: 丹参;有效部位;配伍;活血化瘀;主成分分析;多指标综合指数法;急性血瘀

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)18-3239-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.017

Comparison on promoting blood effects of different effective parts of *Salvia miltiorrhiza* by principal component analysis and multi-attribute comprehensive index methods

PANG Han-qing, TANG Yu-ping, SHI Xu-qin, ZENG Hui-ting, XU Hui-qin, QU Cheng, ZHU Zhen-hua, SU Shu-lan, DUAN Jin-ao

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To evaluate the activating blood circulation and dissipating blood stasis effects of the compatibility between two effective parts (DT, DF, DST, and DF + DST) of *Salvia miltiorrhiza* with different doses on rats with acute blood stasis. **Methods** Acute blood stasis rat model was induced by sc injection of adrenaline and ice water bath. The blood stasis mice were ig administered with different effective parts of *S. miltiorrhiza*. The whole blood viscosity (WBV), plasma viscosity (PV), erythrocyte sedimentation rate (ESR), and haematocrit (HCT) were determined to observe the effects of two effective parts of Danshen on hemorheology of blood stasis rats. And the thrombin time (TT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and plasma fibrinogen (FIB) were tested to observe the effects of different effective parts of *S. miltiorrhiza* on blood coagulation function of blood stasis rats. In addition, the maximum aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) was tested to observe the effect of different active parts of *S. miltiorrhiza* on platelet aggregation index of blood stasis rats. Then principal component analysis (PCA) and multi-attribute

收稿日期: 2016-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274058, 81573714); 江苏高校优势学科中药学学科建设工程资助

作者简介: 庞汉青(1991—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药化学与分析。E-mail: Hanqingpang@126.com

*通信作者 唐于平, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: yupingtang@njucm.edu.cn

comprehensive index methods were both used to comprehensively evaluate the total activating blood circulation and dissipating blood stasis effects of different effective parts of *S. miltiorrhiza*. **Results** The hemorheological indexes and coagulation parameters of model group had the significant differences with normal group. Compared with model group, the effective parts of *S. miltiorrhiza* with different doses could improve the blood hemorheological indexes and coagulation parameters in acute blood stasis rats with dose-effect relation. Based on the PCA and multi-attribute comprehensive index methods, the group of high-dose DF + DST had the best effect of activating blood circulation and dissipating blood stasis effect in all medication administration teams. Under the condition of same dose of the effective parts of *S. miltiorrhiza*, the DF + DST could obviously improve the hemorheology and blood coagulation function in acute blood stasis rats. **Conclusion** The combination of DF and DST has the better effects of activating blood circulation and dissipating blood stasis in comparison with those of single part. It could provide the scientific basis for more effective application of the compatibility between salvianolic acids and tanshinones in modern clinic medicine.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; effective parts; compatibility; activating blood circulation and dissipating blood stasis; principal component analysis; multi-attribute comprehensive index method; acute blood stasis

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 主要产于山东、陕西、河南等地, 其主要用于脑卒中、冠心病等心脑血管疾病的治疗^[1]。丹参有效成分有 2 类, 以丹酚酸 B 为代表的丹参总酚酸类成分以及以丹参酮 II_A 为代表的丹参酮类成分^[2-3]。现代研究表明, 2 类成分均是丹参活血化瘀、通脉疏络、安神宁心功效的物质基础, 尤其是在丹参活血化瘀效应方面 2 类成分均发挥了重要作用^[4]。因此, 丹参在临床上已经被开发为 50 多种制剂。然而, 由于 2 类成分化学性质的差异, 大部分丹参制剂仅仅用了其中一个有效部位, 而只有很少的制剂同时用了丹参的水溶性和脂溶性有效部位^[5]。此外, 丹参酮类成分很难溶于水, 但是丹参的临床用法以水煎剂为主, 造成了丹参酮类成分的利用率低和丹参药材浪费严重等问题^[6]。这 2 类主要有效部位在丹参中是否具有协同作用, 以及其协同程度如何却不得而知。

本实验在课题组前期研究基础上, 选择丹参提取物 (DT)、丹参总酚酸提取物 (DF)、丹参总酮提取物 (DST)、丹参总酚酸合用丹参总酮提取物 (DF+DST) 为研究对象, 观察丹参不同部位配伍不同剂量对急性血瘀模型大鼠的血液流变学、凝血功能及血小板聚集的影响。采用主成分分析 (PCA) 联合多指标综合指数法对丹参不同部位配伍总的活血化瘀效应进行综合比较分析, 以期通过动物体内实验, 探讨丹参总酚酸和丹参总酮合用在活血化瘀功效方面是否会产生协同增效作用, 为更好地利用丹参资源提供依据。对丹参有效部位的合理利用决策提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康 SD 大鼠, 体质量 230~250 g, 雌性, 购于上海杰思捷实验动物有限公司, 合格证号为 SCKY (沪) 2013-0002。大鼠购入后检疫与驯化 1 周, 使其适应环境并剔除体质差异较大的动物, 实验期间动物自由进食、饮水, 昼夜节律正常。

1.2 药品与试剂

复方丹参滴丸 (天士力制药集团股份有限公司, 批号 141227); 阿司匹林肠溶片 (拜耳医药保健有限公司, 批号 BJ24257); 盐酸肾上腺素注射液 (上海禾丰制药有限公司, 批号 150609); 一次性使用人体静脉血样采集容器 (3.2%枸橼酸钠抗凝, 江苏康洁医疗器械有限公司, 批号 20151105); 水合氯醛 (国药集团试剂有限公司, 批号 20151021)。对照品丹参素 (批号 110875-201309)、丹酚酸 A (批号 110438-201406)、丹酚酸 B (批号 110562-201404), 购自中国食品药品检定研究院; 对照品原儿茶醛 (批号 150623)、迷迭香酸 (批号 141012)、紫草酸 (批号 140609)、隐丹参酮 (批号 131104)、二氢丹参酮 I (批号 150114)、丹参酮 I (批号 140812)、丹参酮 II_A (批号 131226), 购自成都克洛玛生物科技有限公司, 以上对照品质量分数均大于 98%。活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、血浆纤维蛋白原 (FIB) 试剂盒, 均购自北京世帝科学仪器公司。

1.3 仪器

LG-R-80-B 电脑血液黏度测试仪、LG-PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪 (北京世帝科学仪器公司); Anke LXJ-IIIB 离心机、Anke TDL-40B 离心

机(上海安亭科学仪器厂); BT125D 电子分析天平(Sartorius, 德国)。

1.4 药材

丹参(产地陕西商洛, 批号 150625)药材、DST(浸膏得率 0.018 g/g, 批号 150718)均购自西安连辰进出口有限公司, 经南京中医药大学中药鉴定学教研室副教授严辉鉴定, 符合《中国药典》2015 年版项下标准。

2 方法

2.1 丹参有效部位的制备

称取丹参药材 4 kg, 均分成 2 份, 每份 2 kg。2 份药材分别用 8 倍量水、50%乙醇热回流提取 1.5 h, 自然冷却后, 倾出药液, 再分别加入 6 倍量水、50%乙醇进行 2 次热回流提取各 1 h, 分别合并 3 次滤液, 得到相应的丹参总酚酸的粗提取液和丹参提取液。将丹参总酚酸的粗提取液于 60 °C 减压浓缩至相对密度为 1.18~1.22 的清膏, 放冷, 加乙醇使含醇量为 70%, 静置 12 h, 取上清液, 减压回收乙醇, 干燥, 即得丹参总酚酸提取液^[7]。分别将总酚酸提取液和丹参提取液于 60 °C 减压浓缩至稠浸膏, 将稠浸膏干燥至粉末, 得到丹参总酚酸提取物(DF)和丹参提取物(DT)的粉末状样品。其中, DT、DF 的得率(浸膏/生药)依次为 0.42、0.26 g/g。

2.2 丹参有效部位的 UPLC 分析^[8-9]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo Scientific Hypersil GOLD (100 mm×3 mm, 1.9 μm); 流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~1 min, 8% B; 1~3 min, 8%~16% B; 3~4 min, 16%~19% B; 4~9 min, 19% B; 9~10 min, 19%~22% B; 10~12.5 min, 22%~25% B; 12.5~16.5 min, 25%~70% B; 16.5~18 min, 70%~80% B; 18~20 min, 80% B; 体积流量为 0.4 mL/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为 35 °C; 进样量为 5 μL。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加 90%甲醇制成含丹参素 40.18 μg/mL、原儿茶醛 23.16 μg/mL、迷迭香酸 46.54 μg/mL、紫草酸 33.28 μg/mL、丹酚酸 B 324.82 μg/mL、丹酚酸 A 52.28 μg/mL、二氢丹参酮 I 20.66 μg/mL、隐丹参酮 24.21 μg/mL、丹参酮 I 38.53 μg/mL、丹参酮 II_A 48.75 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取 DT、DF、DST 的细粉约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用 90%甲醇稀释至刻度, 超声 5 min 后, 充分摇匀,

即得。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.2.4 样品分析 DT、DF、DST 的 UPLC 图谱见图 1。由图 1 可知, DT 同时含有丹酚酸和丹参酮类成分; DF 仅含有丹酚酸类成分; DST 仅含有丹参酮类成分。DT 中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的质量分数依次为 1.02、0.023、2.23、3.48、56.08、1.49、0.39、1.22、0.26、1.69 mg/g; DF 中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A 的质量分数依次为 0.96、0.012、2.57、3.02、43.86、1.28 mg/g; DST 中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的质量分数依次为 0.46、1.62、0.19、1.37 mg/g。

2.3 丹参有效部位活血化瘀作用研究

2.3.1 动物分组及给药 大鼠适应性喂养 1 周后,

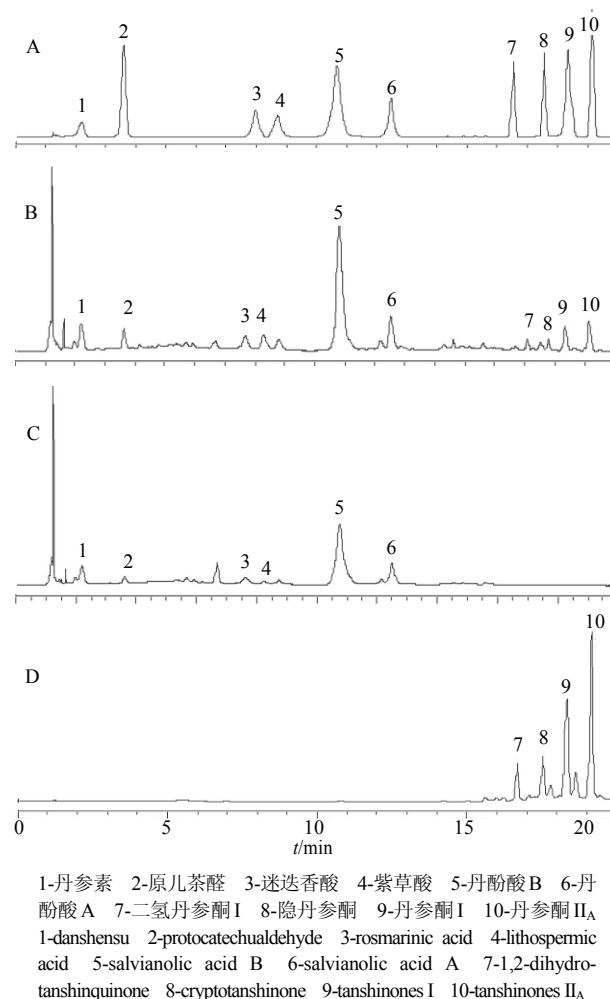


图 1 混合对照品 (A)、DT (B)、DF (C) 和 DST (D) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC of reference substances (A), DT (B), DF (C), and DST (D)

按体质量将 128 只大鼠随机分为 16 组, 每组 8 只, 分别为对照组、模型组、阳性对照复方丹参滴丸 (DSDW) 组, 阳性对照阿司匹林 (ASPL) 组和丹参不同有效部位不同剂量给药组 (分别为 DT、DF、DST、DF+DST 组, 各设低、中、高 3 个剂量)。阳性药组大鼠分别 ig 给予复方丹参滴丸和阿司匹林, 每次剂量为 0.10 g/kg; 对照组、模型组大鼠 ig 给予等体积生理盐水; 丹参不同有效部位低、中、高剂量分别按照丹参临床用量 (丹参的人临床常用量为 15 g) 1、2、5 倍量设定, 即分别为生药量 1.35、2.70、6.75 g/kg。丹参不同有效部位提取物皆用 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬, 其中, DF 和 DST 的配伍比例为两者的得膏率之比, DF 和 DST 提取物的得膏率的比值为 14.01。丹参不同有效部位的低、中、高剂量分别为 0.57、1.14、1.71 g/kg (提取物剂量)。所有给药组大鼠统一 ig 给药每次 10 mL/kg, 每日早晚各 1 次, 共 7 次, 于第 5 次给药后除对照组外, 其余各组大鼠均按照相应的造模方法复制急性血瘀模型, 于第 7 次给药后 30 min 腹主动脉取血, 测定血液流变学和凝血功能相关指标。

2.3.2 急性血瘀大鼠模型的制备 除对照组外, 其余各组大鼠 sc 盐酸肾上腺素注射液 0.8 mg/kg, 共 2 次, 间隔时间为 4 h。第 1 次 sc 给予盐酸肾上腺素后 2 h, 将大鼠置于 0~2 °C 的冰水中游泳 4 min, 造成大鼠急性血瘀模型。第 2 次 sc 盐酸肾上腺素后大鼠禁食不禁水饲养, 12 h 后腹主动脉采血测血液流变学和凝血功能相关指标^[10]。

2.3.3 血液流变学和凝血功能指标检测 各组大鼠均于末次给药 30 min 后, 在 10% 水合氯醛麻醉下, 腹主动脉插管取血, 吸取 1 mL 全血置于压积管中静置 1 h 读数记录血沉 (ESR), 然后 3 000 r/min 离心 30 min, 读数记录红细胞压积 (HCT)。使用 LG-R-80 B 电脑血液黏度测定仪测定全血黏度 (WBV), 测好 WBV 的全血, 800 r/min 离心 10 min 吸取富血小板血浆 (PRP), 采用 LG-PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪测定血小板聚集率 (ADP)。然后 3 000 r/min 离心 10 min 吸取贫血小板血浆 (PPP), 使用 LG-R-80 B 电脑血液黏度测定仪测定血浆黏度 (PV), LG-PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪测定凝血功能相关指标 (APTT、PT、TT、FIB), 血浆 TT、PT、APTT 和 FIB 的测定按照相应试剂盒说明书进行。

2.4 数据统计分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件中的 Descriptives 进行统计, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 与模型组比较采用 ANOVA 中的 Dunnett 法进行组间两两比较。

2.5 效应整合

依据多指标综合指数法, 对 WBV、PV、ESR、FIB、HCT、TT、PT、APTT、ADP 多个指标进行单一化处理, 计算各给药组的总活血效应值。首先对各指标数据进行标化, 当模型组的相应指标数值 (value, V) 与对照组相比升高时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{给药}}) / V_{\text{模型}}$; 当模型组的相应指标 V 与对照组相比降低时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{给药}} - V_{\text{模型}}) / V_{\text{模型}}$ 。标化指标的权重首先依据这些指标在临床中的重要性, 查阅 5 年来急性血瘀相关文献 150 余篇, 其中 126 篇检测了 WBV, 123 篇检测了 PV, 118 篇检测了 HCT, 108 篇检测了 FIB, 61 篇检测了 APTT, 59 篇检测了 PT, 48 篇检测了 ADP, 44 篇检测了 TT。结合同行专家对各指标在活血化瘀效应整体评价中的相对程度打分, 最后再结合直观的变量重要性投影值 (variable importance in the projection, VIP) 处理结果综合给出各指标的权重系数, 总活血效应值即为各指标标化值乘以权重的加和值^[11-13]。各个指标 VIP 值的计算是将各组大鼠的所有指标导入 MassLynx v4.1 (Waters 公司) 软件的 EZ info 中, 采用 PCA 中的 Pareto 进行规格化处理得到各组活血化瘀效应的得分图。然后采用软件中的偏最小二乘 (PLS) 法分析得到各个指标的 VIP 值, 依据 VIP 值的大小判断各个指标对分类的重要程度, 一般 $VIP > 1$ 的指标认为其对分类的贡献比较大^[14]。最终本研究取权重系数分别为 WBV、PV 和 HCT 取权重系数为 3, FIB 取权重系数为 2, APTT、PT、TT、ADP、ESR 取权重系数为 1。综合 PCA 法的得分图和多指标综合指数法中的总活血化瘀效应值综合评价丹参不同有效部位的活血化瘀功效。

3 结果

3.1 丹参不同有效部位对急性血瘀大鼠血液黏度的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的 WBV 和 PV 均显著升高, 差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组的 WBV 和 PV 均有一定程度的降低。对于 WBV, 丹参不同有效部位的低剂量组中, 除了 DT、DST 组在切变率为 5 s^{-1} 和 30 s^{-1} 时的 WBV 没

有显著性差异, 以及 DST、DF+DST 组在切变率为 1 s^{-1} 黏度时没有显著性差异外, 其他各低剂量组均有显著性差异 ($P<0.01$); 丹参不同有效部位的中、高剂量组中, 除了 DST 中剂量组在切变率为 5 s^{-1} 时的 WBV 没有显著性差异外, 其他部位的中、高剂量组的 WBV 差异均显著 ($P<0.01$)。对于 PV, 除了 DT、DST 低剂量组外, 其他给药组差异均有统计学差异 ($P<0.01$)。结果见表 1。

3.2 丹参不同有效部位对急性血瘀大鼠 ESR 和 HCT 的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 ESR、HCT 均显著升高, 差异显著 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠的 ESR 和 HCT 均有一定程度的降低。对于 ESR, 除了 DT、DF、DF+DST 的低剂量组外, 其他各给药组的 ESR 均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。对于 HCT, DST 低剂量组的 HCT 明显降低 ($P<0.01$); DST、DF+DST 中剂量组的 HCT 明显降低 ($P<0.01$); 各给药高剂量组的 HCT 均明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

3.3 丹参不同有效部位对急性血瘀大鼠凝血功能的影响

与对照组比较, 模型组的凝血 4 项 (TT、PT、APTT、FIB) 和血小板聚集率 (ADP) 均有显著性差异 ($P<0.01$), 其中 TT、PT、APTT 均明显降低, FIB 和 ADP 量显著升高。与模型组比较, 各丹参不同有效部位低剂量组 TT 较模型组均无明显变化; DST、DF+DST 低剂量组的 PT 和 APTT 较模型组均显著升高 ($P<0.01$); FIB 的量仅在 DF+DST 低剂量组明显降低 ($P<0.01$); DF、DF+DST 低剂量组的 ADP 较模型组明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。在各丹参不同有效部位中剂量组中, PT 和 APTT 均显著升高, FIB 的量明显降低 ($P<0.01$); 另外, DF、DF+DST 中剂量组的 TT 与模型组差异显著 ($P<0.05$); 除了 DT 中剂量组外, 其他各丹参不同有效部位中剂量组的 ADP 较模型组均显著下降 ($P<0.01$)。丹参不同有效部位高剂量组的凝血 4 项和 ADP 均有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

表 1 丹参不同有效部位对急性血瘀大鼠 WBV 和 PV 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of different effective parts of *S. miltiorrhiza* on whole blood viscosity and plasma viscosity of acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	WBV/(mPa·s)				PV(200 s ⁻¹)/ (mPa·s)
		200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹	
对照	—	3.97±0.35	5.01±0.29	7.18±0.49	13.42±0.86	1.32±0.11
模型	—	5.35±0.34**	6.57±0.32**	10.27±0.44**	21.99±1.09**	2.46±0.21**
DSDW	0.10	4.14±0.27 ^{##}	5.04±0.27 ^{##}	7.74±0.40 ^{##}	15.86±0.77 ^{##}	1.57±0.05 ^{##}
ASPL	0.10	4.25±0.11 ^{##}	5.25±0.10 ^{##}	8.12±0.20 ^{##}	16.06±0.56 ^{##}	1.46±0.13 ^{##}
DT 低	0.57	4.81±0.26 ^{##}	6.56±0.39	9.99±0.56	20.52±1.32 ^{##}	2.33±0.24
DT 中	1.14	4.49±0.20 ^{##}	5.60±0.24 ^{##}	8.93±0.60 ^{##}	19.40±1.46 ^{##}	1.67±0.11 ^{##}
DT 高	1.71	4.51±0.30 ^{##}	5.43±0.38 ^{##}	7.97±0.50 ^{##}	15.12±0.93 ^{##}	1.53±0.33 ^{##}
DF 低	0.57	4.61±0.10 ^{###}	6.13±0.33 ^{##}	9.62±0.34 ^{##}	20.36±0.62 ^{##}	1.91±0.23 ^{##}
DF 中	1.14	4.39±0.23 ^{##}	5.65±0.43 ^{##}	8.56±0.73 ^{##}	18.23±0.96 ^{##}	1.64±0.10 ^{##}
DF 高	1.71	4.23±0.12 ^{##}	5.15±0.18 ^{##}	7.68±0.41 ^{##}	14.58±1.11 ^{##}	1.49±0.25 ^{##}
DST 低	0.57	4.86±0.24 ^{##}	6.54±0.36	10.09±0.34	21.88±0.69	2.32±0.15
DST 中	1.14	4.31±0.19 ^{##}	5.83±0.21 ^{##}	9.93±0.23	17.97±0.60 ^{##}	1.72±0.12 ^{##}
DST 高	1.71	4.17±0.18 ^{##}	5.20±0.14 ^{##}	7.69±0.28 ^{##}	14.94±0.50 ^{##}	1.55±0.19 ^{##}
DF+DST 低	0.57	4.72±0.21 ^{##}	6.03±0.20 ^{##}	9.78±0.28 ^{##}	21.52±0.76	1.92±0.17 ^{##}
DF+DST 中	1.14	4.46±0.51 ^{##}	5.35±0.32 ^{##}	8.84±0.60 ^{##}	17.71±0.96 ^{##}	1.60±0.14 ^{##}
DF+DST 高	1.71	4.01±0.18 ^{##}	4.90±0.21 ^{##}	7.47±0.36 ^{##}	14.41±0.81 ^{##}	1.52±0.14 ^{##}

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$, 下同

^{**} $P<0.01$ vs control group, [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 2 丹参不同有效部位对急性血瘀大鼠 ESR、HCT 和凝血功能相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effect of different effective parts of *S. miltiorrhiza* on ESR, HCT, coagulation, and platelet aggregation index changes of acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ESR/(mm·h ⁻¹)	HCT/%	TT/s	PT/s	APTT/s	FIB/(g·L ⁻¹)	ADP/%
对照	—	0.21±0.14	57.28±2.37	31.77±1.07	14.53±1.24	37.88±2.02	3.13±0.17	14.62±1.86
模型	—	0.83±0.26**	60.33±2.46**	25.98±1.12**	11.73±0.42**	29.04±1.19**	4.11±0.16**	26.11±1.62**
DSDW	0.10	0.34±0.14 ^{##}	57.32±0.65 ^{##}	28.53±1.51 ^{##}	13.90±0.85 ^{##}	36.43±1.70 ^{##}	3.58±0.19 ^{##}	18.48±2.01 ^{##}
ASPL	0.10	0.29±0.07 ^{##}	56.88±0.97 ^{##}	29.44±0.70 ^{##}	15.05±0.17 ^{##}	36.18±2.13 ^{##}	3.66±0.80 ^{##}	16.40±2.45 ^{##}
DT _低	0.57	0.76±0.09	60.16±1.57	26.02±0.43	11.97±0.48	30.47±1.97	3.94±0.11	28.38±2.91
DT _中	1.14	0.53±0.16 ^{##}	59.28±1.37	26.57±0.39	13.41±0.70 ^{##}	33.10±1.25 ^{##}	3.41±0.43 ^{##}	26.06±1.46
DT _高	1.71	0.37±0.19 ^{##}	58.65±1.69 [#]	27.64±0.84 [#]	14.68±0.81 ^{##}	32.98±2.79 ^{##}	3.33±0.12 ^{##}	20.25±1.74 ^{##}
DF _低	0.57	0.75±0.11	59.82±1.14	26.63±0.66	12.15±0.66	30.23±1.21	4.04±0.13	25.83±1.19 [#]
DF _中	1.14	0.50±0.17 ^{##}	59.84±0.83	27.18±0.72 [#]	16.76±0.61 ^{##}	34.93±4.89 ^{##}	3.64±0.13 ^{##}	21.55±0.55 ^{##}
DF _高	1.71	0.42±0.18 ^{##}	58.01±0.97 ^{##}	29.41±1.68 ^{##}	16.53±1.19 ^{##}	37.07±1.41 ^{##}	3.42±0.20 ^{##}	18.60±1.92 ^{##}
DST _低	0.57	0.66±0.18 [#]	58.23±0.85 ^{##}	26.46±0.79	13.43±0.98 ^{##}	33.12±3.17 ^{##}	3.89±0.76	25.12±1.28
DST _中	1.14	0.42±0.08 ^{##}	58.25±1.35 ^{##}	26.91±0.85	14.05±0.35 ^{##}	35.25±1.56 ^{##}	3.29±0.48 ^{##}	24.24±1.25 ^{##}
DST _高	1.71	0.30±0.07 ^{##}	58.25±1.04 ^{##}	28.36±1.26 ^{##}	17.25±1.17 ^{##}	37.01±1.68 ^{##}	3.07±0.23 ^{##}	14.93±1.44 ^{##}
DF+DST _低	0.57	0.72±0.15	59.69±1.94	26.64±0.69	13.82±1.67 ^{##}	32.68±2.73 ^{##}	3.81±0.40 ^{##}	24.96±1.85 ^{##}
DF+DST _中	1.14	0.51±0.18 ^{##}	58.35±1.42 ^{##}	27.35±1.01 [#]	16.14±1.53 ^{##}	35.02±2.55 ^{##}	3.26±0.13 ^{##}	23.89±0.85 ^{##}
DF+DST _高	1.71	0.43±0.21 ^{##}	56.54±1.41 ^{##}	29.30±1.12 ^{##}	17.36±0.91 ^{##}	36.86±1.33 ^{##}	3.01±0.21 ^{##}	15.56±2.60 ^{##}

3.4 基于 PCA 法的丹参不同有效部位配比的活血化瘀效应评价

将所有指标的源数据导入 MassLynx v4.1 (Waters 公司) 软件的 EZ info 中进行 PCA, 通过降维建立包含第 1 个主成分 (t[1]) 与第 2 个主成分 (t[2]) 二维空间的 PCA 分类模型 (图 2)。第 1 个主成分轴是原始数据矩阵方差最大方向, 第 2 个主成分轴式方差次大方向, 降维时最大限度保留有用信息, 寻找能够使不同种类样品得到最大分离的方向。从图 2 中可以看出, 对照组中心大约是 (4.5, -2.5), 模型组中心大约是 (-5.5, -1.0), DSDW 组中心大约是 (1.5, -1.5), ASPL 组中心大约是 (2.0, -1.8), DT、DF、DST、DF+DST 低剂量组中心依次大约是 (-4.5, -0.25)、(-3.5, -0.75)、(-3.6, -0.5)、(-2.5, 0.5); DT、DF、DST、DF+DST 中剂量组中心依次大约是 (-1.0, 0.25)、(0.5, 0.2)、(-0.25, 1.0)、(1.0, 2.0); DT、DF、DST、DF+DST 高剂量组中心依次大约是 (1.2, 0.2)、(2.5, 0.3)、(3.3, 1.5)、(4.0, 0.8)。丹参不同有效部位高剂量组的中心离对照组最近, 说明高剂量组的活血化瘀效应较好, 其中, DT 高剂量组的中心离对照组最近, 表示该组对急性血瘀大鼠的改善作用最

好; 丹参不同有效部位的中剂量组介于对照组和模型组的中心, 表明它们对急性血瘀大鼠的改善作用弱于高剂量组; 丹参不同有效部位低剂量组的中心离模型组最近, 表示它们对急性血瘀大鼠的改善作用较弱。整体而言, 在实验的剂量范围内, 丹参不同有效部位随着剂量的增加, 其活血化瘀疗效也相应的增强, 呈现一定的量效关系。

3.5 基于多指标综合指数法的丹参不同部位配伍的活血化瘀效应整合

首先将各组大鼠所有指标的源数据导入 MassLynx v4.1 (Waters 公司) 软件的 EZ info 中, 采用 PLS 法分析得到各个指标的 VIP 值 (图 3), VIP 值越大, 说明在本实验中该指标对分类的贡献越大^[11]。如图 3 显示, PT、WBV (1 s⁻¹)、HCT、ADP、FIB、TT、WBV (200 s⁻¹)、WBV (5 s⁻¹) 和 PV 的 VIP 值均大于 1, APTT、ESR 和 WBV (30 s⁻¹) 的 VIP 值较小。采用本课题组前期的多指标综合指数法对各指标进行归一化处理, 得到各组的总活血化瘀效应值 (表 3), 进而得到丹参不同有效部位的总活血效应值, 大小顺序依次为 DF+DST_高>DST_高>DF_高>DT_高>DF+DST_中>DF_中>DST_中>DT_中>DF+DST_低>DF_低>DST_低>DT_低, 说明

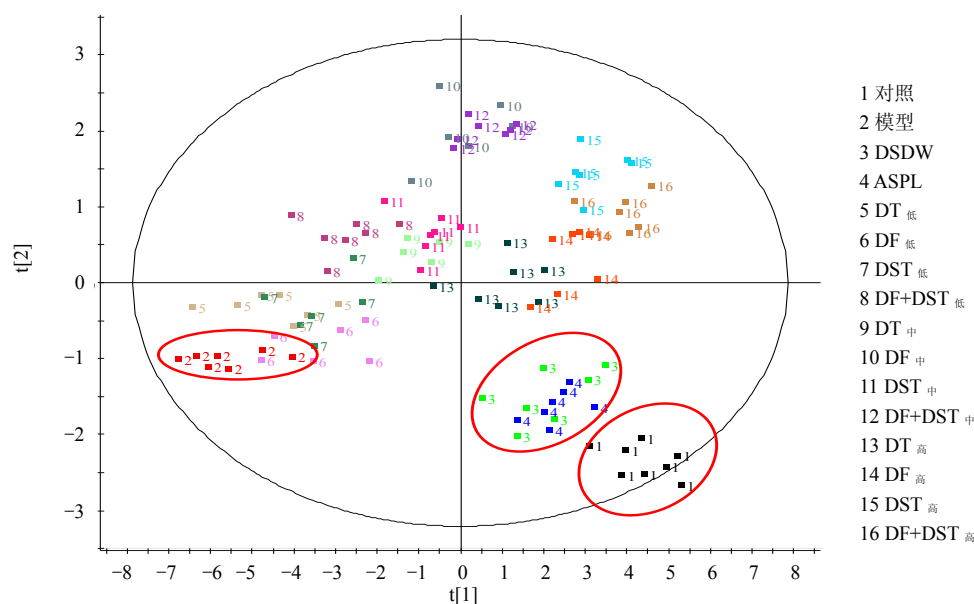


图 2 丹参不同有效部位对血瘀指标的 PCA 图

Fig. 2 PCA score plot of blood-stasis indexes after administration of compatibility of effective parts of *Salvia miltiorrhiza*

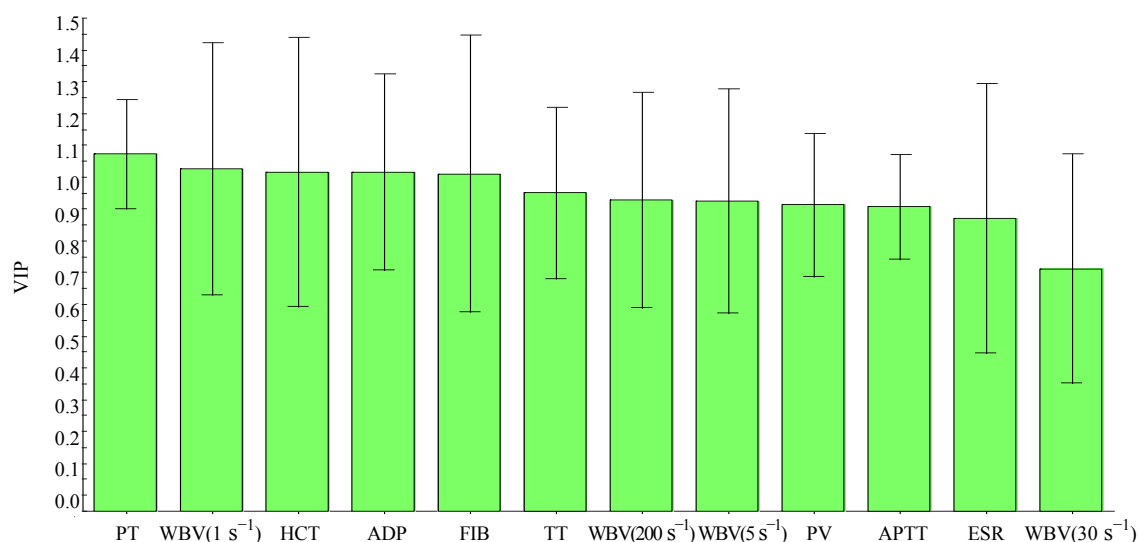


图 3 血瘀指标的 VIP 图

Fig. 3 VIP plot of blood-stasis indexes

DF+DST_高给药组的总活血效应值最好。这些研究表明,丹参不同有效部位在相同剂量下,DF+DST_高给药组的总活血效应皆优于其他组,而DT_高给药组的总活血效应最差;相同的丹参提取物在实验剂量范围内,随着剂量的增加,各组的活血作用均有所加强,呈现一定的量效关系。这体现了丹参总酚酸与丹参总酮配伍后有协同增强活血效应的功效,并呈相应的量效关系。

3.6 结合 PCA 法和多指标综合指数法综合评价丹参不同有效部位活血效应

综合 PCA 法和多指标综合指数法中的总活血化瘀效应结果可知,DF+DST_高高剂量组的总活血化瘀效应最好,2 种分析方法所得结果相一致。这可能与两者合用,共同增加丹参总酚酸的抗氧化和丹参总酮的抗血小板聚集而产生协同增效作用有关。

表 3 丹参不同有效部位对血瘀大鼠的总活血化瘀效应值

Table 3 Total effect of different effective parts of *S. miltiorchiza* on activating blood circulation and dissipating stasis

组别	V _{标化-WBV} ^a				V _{标化-PV} ^b	V _{标化-HCT} ^c	V _{标化-FIB} ^c	V _{标化-ESR} ^c	V _{标化-TT} ^c	V _{标化-PT} ^c	V _{标化-APTT} ^c	V _{标化-ADP} ^c	总活血化瘀效应值
	200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹									
对照	0.26	0.24	0.30	0.39	0.46	0.05	0.24	0.75	0.22	0.24	0.30	0.44	7.54
DSDW	0.23	0.23	0.25	0.28	0.36	0.05	0.13	0.59	0.10	0.18	0.25	0.29	5.87
ASPL	0.21	0.20	0.21	0.27	0.41	0.06	0.11	0.65	0.13	0.28	0.25	0.37	5.92
DT _低	0.10	0.00	0.03	0.07	0.05	0.00	0.04	0.08	0.00	0.02	0.05	-0.09	1.04
DF _低	0.14	0.07	0.06	0.07	0.22	0.01	0.02	0.10	0.03	0.04	0.04	0.01	1.94
DST _低	0.09	0.00	0.02	0.01	0.06	0.03	0.05	0.20	0.02	0.14	0.14	0.04	1.30
DF+DST _低	0.12	0.08	0.05	0.02	0.22	0.01	0.07	0.13	0.03	0.18	0.13	0.04	2.15
DT _中	0.16	0.15	0.13	0.12	0.30	0.03	0.17	0.36	0.02	0.14	0.14	0.00	3.68
DF _中	0.18	0.14	0.17	0.17	0.33	0.01	0.11	0.40	0.05	0.43	0.20	0.17	4.45
DST _中	0.17	0.11	0.03	0.18	0.32	0.02	0.20	0.49	0.04	0.20	0.21	0.07	3.93
DF+DST _中	0.19	0.17	0.14	0.19	0.35	0.03	0.21	0.39	0.05	0.38	0.21	0.09	4.76
DT _高	0.16	0.17	0.22	0.31	0.38	0.03	0.19	0.55	0.06	0.25	0.14	0.22	5.40
DF _高	0.21	0.22	0.25	0.34	0.39	0.04	0.17	0.49	0.13	0.41	0.28	0.29	6.21
DST _高	0.22	0.21	0.25	0.32	0.37	0.03	0.25	0.64	0.09	0.47	0.27	0.35	6.58
DF+DST _高	0.25	0.25	0.27	0.34	0.38	0.06	0.27	0.48	0.13	0.48	0.27	0.33	6.93

a-权重系数为 3 b-权重系数为 2 c-权重系数为 1, 总活血化瘀效应值=3 V_{标化}^a+2 V_{标化}^b+V_{标化}^ca-weight coefficient is 3 b-weight coefficient is 2 c-weight coefficient is 1, total effect of promoting blood= 3 V_{标化}^a+ 2 V_{标化}^b+ V_{标化}^c

4 讨论

根据中医的论述,血瘀证主要由七情中的“忧怒”和六淫中的“寒邪”为病因导致血液的流动性和黏度变化而引发的,故血瘀模型与“忧怒”和“寒邪”等病因紧密相连。通过给大鼠 sc 大量的肾上腺素模拟暴怒时机体状态,以冰水浸泡模拟寒邪侵入,两者综合以建立寒凝气滞血瘀模型,并以复方丹参滴丸和阿司匹林作为活血药物的阳性对照,对模型进行了有效性验证。为了综合反映丹参不同有效部位的活血化瘀药效,本实验选择了血液流变学(WBV 和 PV)、凝血功能(TT、PT、APTT 和 FIB)、HCT、ESR、与 ADP 多个效应指标来综合评价其药效。然而由于药物对各指标的反应灵敏度往往不一致,需要将各指标统一计量单位,进行标化,形成整合效应以对药物的终末药效有一个整体的、直观的认识。

多指标综合指数法是将多个不同类别、不同性质、不同计量单位的指标标准化,最后转化成无量纲的相对评价价值,能反映事物相对水平和整体变动的一种综合评价方法^[15]。PCA 是把多指标转化为少数几个综合指标(即主成分),其中每个主成分都能够反映原始变量的大部分信息,且所含信息

互不重复。这种方法在引进多方面变量的同时将复杂因素归结为几个主成分,使问题简单化,同时得到的结果更加科学有效的数据信息,有助于保证客观地反映样本间的现实关系^[12,16]。对于权重系数的选择,本实验将专家评分法结合相关效应指标在文献中出现的频次来综合确定,在一定程度上弥补了专家评分法的不足,使权重系数的确定趋于科学、合理。此外,由于 PLS 可以有效解决中药物质效应具有高维变量和变量之间关系复杂的问题,本实验采用了 PLS-DA 中的 VIP 对血液流变学和凝血功能指标进行了评分,从而全面地验证上述权重系数的科学性与合理性^[17-18]。

通过结合多指标综合指数法和 PCA 对急性血瘀大鼠的血液流变学和凝血功能指标进行整合。结果显示,复方丹参滴丸与对照组的 PCA 聚类图最为接近,预示三七与丹参配伍更有利于模型趋向正常。有研究表明,丹参抗凝血成分的物质基础主要是丹参酚酸类成分,而三七皂苷类成分是三七抗血小板聚集作用的物质基础^[19]。丹参与三七配伍给药后,三七皂苷类成分能够使丹酚酸类成分保持更高的血药浓度;同时丹参中的丹参酮类成分也可提高三七皂苷的膜渗透性和脂溶性,增强口服吸收率^[20]。复

方丹参滴丸具有较好的活血化瘀药效可能与两者配伍后在抗血小板聚集、抗心肌缺血和血管内皮细胞的保护作用等方面产生协同增效的作用有关^[21-22]。

此外,丹参不同有效部位皆能改善血瘀大鼠的血液流变学和凝血功能异常,其中,DF+DST 高剂量组对血瘀大鼠的总活血化瘀效应最好。剂量相同的情况下,DF+DST 的活血化瘀作用优于 DT、DF、DST 或有优于两者单用的趋势,这可能与两者配伍使用,同时发挥了丹参总酚酸抗氧化能力强与丹参总酮的抗血小板聚集作用显著的药效相关,其有效部位配伍使用的潜在机制有待进一步研究。给药相同的情况下,在实验的剂量范围内,随着实验剂量的增加,各给药组的活血化瘀疗效明显增强,呈现一定的量效关系。本研究采用多指标综合指数法和 PCA 用于丹参有效部位配伍后活血化瘀效应相互作用研究,为丹参有效部位在临床上的合理运用提供了理论支撑,为丹参相关新药的开发利用提供了基础,也为中药有效部位配伍相互作用研究提供思路与方法。

参考文献

- [1] Su C Y, Ming Q L, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163-182.
- [2] 陈磊,陆茵,郑仕中,等.丹参药理活性成分的整合效应[J].*中草药*, 2009, 40(3): 476-479.
- [3] 朱海林,张大伟,孙隆儒,等.白花丹参总酚酸提取物对大鼠血栓闭塞性脉管炎的影响[J].*中草药*, 2012, 43(8): 1565-1569.
- [4] 王冰瑶,吴晓燕,樊官伟.丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展[J].*中草药*, 2014, 45(17): 2571-2575.
- [5] 陈峰,李泽友,刘明生.丹参制剂的研究进展[J].*中国药房*, 2006, 17(21): 1675-1677.
- [6] Pang H Q, Wu L, Tang Y P, et al. Chemical analysis of the herbal medicine *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (Danshen) [J]. *Molecules*, 2016, doi: 10.3390/molecules21010051.
- [7] 中国药典[S].一部.2015.
- [8] 赵洪芝,王静,姜民,等.丹参总酚酸提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究[J].*药物分析杂志*, 2012, 32(4): 620-622.
- [9] 李耿,孟繁蕴,杨洪军,等. UPLC 法同时测定丹参中 11 种成分的含量[J].*中国药房*, 2014, 25(19): 1766-1768.
- [10] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等.大鼠急性血瘀模型造模方法的研究与评价[J].*中国药理学通报*, 2011, 27(12): 1761-1765.
- [11] 李伟霞,唐于平,郭建民,等.比较评价当归川芎配伍对急性血瘀大鼠血液流变学及凝血功能的影响[J].*中国中西医结合杂志*, 2012, 32(6): 806-811.
- [12] 李淑娇,李伟霞,唐于平,等.基于主成分分析和多指标综合指数法的当归-红花不同配比活血化瘀作用比较[J].*药学报*, 2014, 49(9): 1304-1309.
- [13] 李伟霞,唐于平,尚尔鑫,等.基于人工神经网络的当归-川芎药对整体功效与化学物质关联性分析[J].*中国中药杂志*, 2012, 33(19): 2935-2942.
- [14] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等.基于代谢组学研究佛手散对血虚小鼠的养血补血作用机制[J].*药学报*, 2013, 48(8): 1301-1306.
- [15] 马瑞娟,苗明三.一种中药药效的多指标评价新方法—综合权重法[J].*中药新药与临床药理*, 2011, 22(5): 569-572.
- [16] 杜焰,冯怡,徐德生,等.基于主成分分析的中药粉体流动性表征研究[J].*中成药*, 2012, 34(7): 1258-1263.
- [17] 徐培平,张奉学,符林春,等.基于均匀设计-偏最小二乘回归建模的中药复方配伍规律研究方法[J].*中草药*, 2011, 42(4): 819-824.
- [18] 蒋海强,聂磊,周洪雷,等.基于偏最小二乘回归分析的钩藤总碱和莱菔子总碱组分配伍优化研究[J].*中草药*, 2013, 44(18): 2351-2536.
- [19] 郑琴,彭常春,沈美兰,等.丹参和三七的配伍研究概况[J].*中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(2): 83-86.
- [20] 牧磊,陈钢,张晓.丹参三七有效组分及其复方的药代动力学研究进展[J].*中成药*, 2011, 33(7): 1209-1213.
- [21] 商洪才,张伯礼,高秀梅,等.丹参三七药对不同配比药效学比较研究[J].*辽宁中医杂志*, 2002, 29(5): 297-299.
- [22] 龚婉,肖扬,张萌,等.丹参总酚酸及三七总皂苷配伍对缺氧复氧损伤心肌细胞的保护作用研究[J].*中国中药杂志*, 2013, 38(7): 1046-1051.