

• 药理与临床 •

丹参提取物对糖基化终末产物/缺氧条件下视网膜 Müller 细胞低氧诱导因子-1 α 作用的谱效关系研究

李 杨¹, 徐 秒¹, 陈换飞¹, 王 曼¹, 张 梅^{1*}, 谢学军^{2*}

1. 成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137
2. 成都中医药大学临床医学院, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 探讨丹参提取物对糖基化终末产物 (AGEs) /缺氧条件下视网膜 Müller 细胞低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达的药理作用与化学成分之间的关系, 并以丹参酮 II_A 为对照, 初步探索丹参治疗糖尿病性视网膜病变 (DR) 的药效物质基础。**方法** 采用 HPLC 法建立 10 批丹参提取物的指纹图谱, 获得各特征峰的峰面积。在 AGEs/缺氧条件下培养视网膜 Müller 细胞, 并测定丹参提取物给药组及丹参酮 II_A 对照组 HIF-1 α 的表达量。结合灰色关联分析法与偏最小二乘法回归分析成分与药效之间的谱效相关性。**结果** 根据 10 批样品指纹图谱共标示出 17 个特征峰。与模型组相比, 10 批样品及丹参酮 II_A 对照组均能降低视网膜 Müller 细胞 HIF-1 α 的表达量。谱效相关性研究显示峰 1、5、6、9、10、11、12、14、15、16 代表的化学成分对抑制 HIF-1 α 表达具有较大的贡献。**结论** 初步确定 15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 及 6 个尚未确定结构的成分 (峰 1、5、6、9、14、15) 为丹参治疗 DR 的可能药效物质。

关键词: 丹参提取物; 谱效关系; 指纹图谱; 视网膜 Müller 细胞; 低氧诱导因子-1 α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)11-2231-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.013

Spectrum-effect relationship of *Salvia miltiorrhiza* extract on HIF-1 α of retinal Müller cells in AGEs or hypoxia conditions

LI Yang¹, XU Miao¹, CHEN Huan-fei¹, WANG Man¹, ZHANG Mei¹, XIE Xue-jun²

1. State key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To investigate spectrum-effect relationship of the extract from *Salvia miltiorrhiza* on HIF-1 α of retinal Müller cells in the advanced glycationend products (AGEs) or hypoxia conditions, regarding tanshinone II_A as reference to explore the relationship between pharmacological effects and chemical substances, and to reveal the material basis of *S. miltiorrhiza* treating diabetic retinopathy (DR). **Methods** Fingerprints of different *S. miltiorrhiza* extract were established by HPLC and characteristic peak's area was recorded. After that, the expression quantity of HIF-1 α of retinal Müller cells were tested in the AGEs or hypoxia conditions under the two different conductions: *S. miltiorrhiza* extract or only tanshinone II_A. Gray relational analysis and partial least squares regression analysis (PLSR) were combined to build spectrum-effect relationship. **Results** Seventeen characteristic peaks were marked out. Compared with the model set, 10 batches of extracts and tanshinone II_A could lower the expression quantity of HIF-1 α . The statistical results showed that the peaks 1, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, and 16 would inhibit HIF-1 α expression, which

收稿日期: 2016-11-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072845, 81473735), 国家基础科学人才培养基金项目 (J1310034-15)

作者简介: 李 杨 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药及其复方物质基础及质量标准化研究工作。

Tel: 18215529216 E-mail: 1016053702@qq.com

*通信作者 张 梅 (1963—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药及其复方物质基础及质量标准化研究。

Tel: (028)61800231 E-mail: zhangmei63@126.com

谢学军 (1963—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治眼底病的基础及临床研究。

Tel: (028)87783541 E-mail: xxj8848@163.com

made great contribution. **Conclusion** The 15,16-dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone I, tanshinone II_A, and other six components might be the main effective components in the ethanol extract from *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* extract; spectrum-effect; fingerprints; Müller cells; HIF-1 α

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症,是成年人最主要的致盲疾病之一。中医药在改善视力,延缓 DR 的发生、发展,促使发生病理变化的眼底改善以及改善患者全身整体状况,提高患者生活质量方面有其独特的优势,显示出治疗 DR 的广阔前景。本课题组前期研究表明,由课题组研制的补肾活血方(地黄、丹参、葛根、人参等组成)具有防治 DR 作用^[1-4]。相关资料亦提示,丹参及其制剂(复方丹参滴丸)对 DR 具有一定的治疗作用^[5-6]。为进一步探讨补肾活血方中各单味药防治 DR 的药效物质基础,本实验在前期研究基础上,以丹参提取物为研究对象,采用化学指纹图谱与药效相结合的方法,通过谱效关系研究筛选确定丹参防治 DR 的可能药效成分。

视网膜 Müller 细胞是视网膜内最主要的神经胶质细胞,近年研究发现 Müller 细胞在 DR 的发生发展中起着至关重要的作用^[7-8]。糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是机体在长期慢性高血糖状态下形成的一种不可逆的终末产物。AGEs 可通过细胞外调节激酶通路活化低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α),从而刺激血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的增加,促使 DR 的形成^[9]。已有研究表明,缺氧条件下视网膜 Müller 细胞能产生大量的 VEGF,而 VEGF 在缺氧条件下表达的升高是通过 HIF-1 α 介导的^[10]。因此,通过考察丹参提取物及其活性成分丹参酮 II_A 在缺氧/AGEs 条件下对视网膜 Müller 细胞 HIF-1 α 表达的影响,评价其防治 DR 的药理作用。

1 材料

1.1 药材与试剂

10 批不同产地丹参药材均购自成都市荷花池药材市场,经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。丹参药材来源见表 1。

对照品丹参酮 II_A (成都曼思特生物科技有限公司,批号 must-13100802,质量分数 $\geq 98\%$)、丹酚酸 B (成都曼思特生物科技有限公司,批号 must-16040702,质量分数 99.41%)、15,16-二氢丹

表 1 样品来源

Table 1 Origins of samples

批次	产地	批次	产地
S1	中江特级	S6	河北本色
S2	安徽 1 号	S7	山东 1 号
S3	安徽 2 号	S8	山东 2 号
S4	安徽 3 号	S9	山东 3 级
S5	河北 1 号	S10	中江 3 号

参酮 I (四川省维克奇生物科技有限公司,批号 151120,质量分数 $\geq 98\%$)、隐丹参酮 (四川省维克奇生物科技有限公司,批号 150724,质量分数 $\geq 98\%$)、丹参酮 I (四川省维克奇生物科技有限公司,批号 151217,质量分数 $\geq 98\%$)。95%分析乙醇(成都科龙化工试剂厂),甲醇(美国 Fisher 公司,色谱纯);HIF-1 α 检测试剂盒 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 仪器

1260 系列高效液相色谱仪 (安捷伦公司,美国); MillQ 型超纯水系统 (Millipore 公司,美国); BP121S 万分之一电子分析天平 (Sartorius 公司,德国); KQ3200E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DZQ-6050 型真空干燥箱 (上海森信实验仪器有限公司); 超净工作台 (苏州医疗器械厂); 5% CO₂ 恒温培养箱 (Sanyo 公司,日本)。

1.3 动物

取新生 5~7 d 大鼠,以改良酶消化法体外培养视网膜 Müller 细胞,取 P₂ 代细胞用于实验。具体方法同前期研究^[11]。

2 方法与结果

2.1 丹参提取物制备

丹参提取物制备方法参照课题组前期研究^[12]。以丹参酮 II_A 作为指标,测得丹参提取物中丹参酮 II_A 量为 4.09%。同法制得 10 批丹参提取物。

2.2 丹参提取物对视网膜 Müller 细胞 HIF-1 α 表达的影响

将 P₂ 代 Müller 细胞接种于 96 孔板中,细胞密度保持在 1×10^5 个/mL,每孔加入培养液 200 μ L,共 2 板;待 96 孔板内细胞基本融合后,弃去有血清培养液,按分组情况换含有不同培养条件的培养液,进行干预,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱继续培养。

实验分为对照组、模型组、丹参酮 II_A 组和丹参提取物给药组（药物组），具体处理如下：药物组加入 5 μg/mL 丹参提取物的 150 mg/L AGEs+1 mmol/L 连二亚硫酸钠造成缺氧的 DMEM 培养基^[13]；丹参酮 II_A 组加入 5 μg/mL 丹参酮 II_A 的 150 mg/L AGEs+1 mmol/L 缺氧的 DMEM 培养基；模型组加入 150 mg/L AGEs+1 mmol/L 连二亚硫酸钠造成缺氧的 DMEM 培养基；对照组加入空白 DMEM 培养基。

收集培养板每孔的上清液各 20 μL，按顺序放入空白 96 孔板中，并参照 HIF-1α 试剂盒说明书按顺序迅速加入相关 HIF-1α 检测试剂，封板后在 37℃ 条件下，水浴 60 min，取出后洗板 5 次，在暗室中，加入显色液 A、B，避光显色 10 min 后，加入终止液，在 10 min 内用 490 型酶标仪，在 490 nm 波长处测吸光度(A)值。将纯化培养的视网膜 Müller 细胞置于缺氧+高 AGEs 条件下进行培养，分别用 10 批丹参提取物干预视网膜 Müller 细胞，48 h 后用 HIF-1α 酶联免疫试剂盒测定各组 HIF-1α（表 2）。结果显示，10 批丹参提取物、丹参酮 II_A 对照组的 HIF-1α 值与模型组相比均有明显差异（ $P<0.05$ ）。HIF-1α 的值越小，丹参提取物的活性越强。由表 2 的结果可知，丹参酮 II_A 能有效抑制 HIF-1α 的表达，10 批丹参提取物对 HIF-1α 的表达也具有不同程度抑制作用。

表 2 各组细胞中 HIF-1α 表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 HIF-1α release in Müller cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HIF-1α	组别	HIF-1α
对照	0.796±0.033	S5	0.739±0.056*
模型	0.859±0.055 ^Δ	S6	0.611±0.073*
丹参酮 II _A	0.526±0.042*	S7	0.417±0.065*
S1	0.565±0.067*	S8	0.538±0.062*
S2	0.315±0.025*	S9	0.683±0.060*
S3	0.651±0.050*	S10	0.536±0.045*
S4	0.408±0.092*		

与对照组比较：^Δ $P<0.05$ ；与模型组比较：* $P<0.05$

^Δ $P<0.05$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group

2.3 10 批丹参提取物 HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；体积流量 1 mL/min；进样量 10 μL；检测波长 280 nm。流动相乙腈（A）-0.05%磷酸水溶液（B），洗脱梯度：0~10 min，15%~

25% A；10~25 min，25%~30% A；25~30 min，30%~45% A；30~45 min，45% A；45~50 min，45%~58%；50~65 min，58%~68% A；65~70 min，68%~70% A。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取经五氧化二磷干燥的对照品丹参酮 II_A、丹酚酸 B、15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 适量，加色谱甲醇溶解，合并至同一量瓶中，甲醇定容即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 称取“2.1”项下制备的提取物粉末 0.1 g，溶解后用色谱甲醇定容至 5 mL，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜备用。同法处理 10 批丹参提取物。

2.3.4 方法学考察 对实验进行精密度、重复性、稳定性考察，结果显示各色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 3%，符合实验要求。

2.3.5 HPLC 指纹图谱峰的归属 分别吸取 10 批丹参提取物供试品溶液及混合对照品溶液 10 μL，按“2.3.1”项下的色谱条件进行分析，得到 HPLC 指纹图谱（图 1）。根据国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统》（2004 A 版）软件，生成特征共有峰图谱（图 2-a），确定 17 个共有峰（表 3），并指出 4、10、11、12、16 号峰分别为丹酚酸 B、15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A（图 2-b）。将 10 批丹参提取物进行相似度评价，得到相似度均大于 0.9，表明各批丹参提取物相似度较高（表 4）。

2.4 谱效关系分析

计算模型组与 10 批丹参提取物给药组 HIF-1α 表达量的差值，以差值为药效学指标（Y）。以标准化后的样品指纹图谱特征峰峰面积为 X，进行谱效

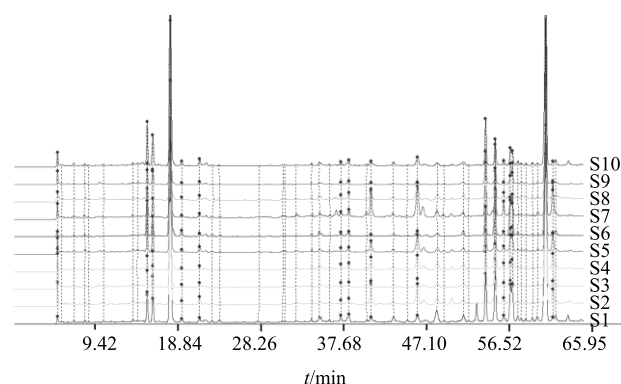


图 1 10 批丹参提取物 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of extract from 10 batches of *S. miltiorrhiza*

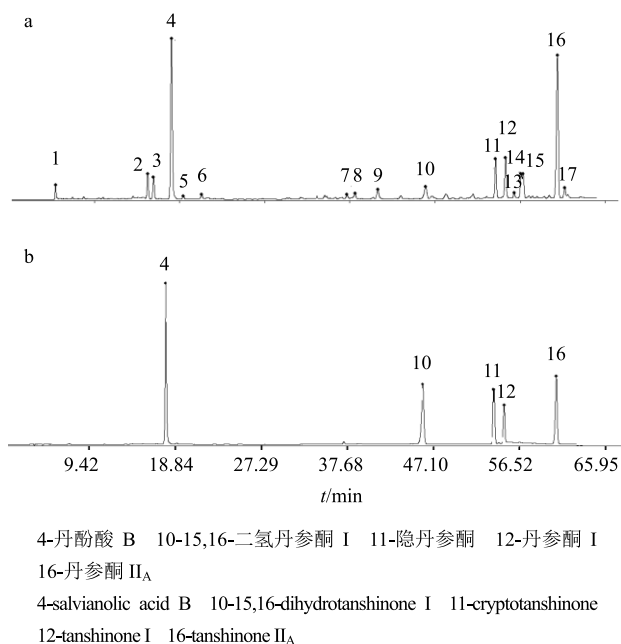


图 2 10 批丹参提取物的特征共有峰 (a) 和混合对照品 (b)
Fig. 2 Common characteristic peaks of extract from 10 batches of *S. miltiorrhiza* (a) and mixed reference substances (b)

关系分析。

2.4.1 灰色关联法分析 将原始数据进行标准化转换后, 根据灰色关联度的分析方法计算关联度^[14]。以标准化后的样品指纹图谱特征峰峰面积 (X) 为子序列, 样品药效学指标 (Y) 为母序列, 利用 Matlab (R2015b) 软件, 运用灰色关联分析法对 HIF-1 α 表达量进行谱效关系分析。依据母序列与子序列关联度大小, 可确定指纹图谱特征峰对药效贡献的大小 (表 5)。结果显示指纹图谱中各色谱峰与 HIF-1 α 的表达具有一定的关联性 (关联度 > 0.6), 表明丹参提取物抑制 HIF-1 α 表达作用是化学群共同作用的结果。根据关联度大小, 确定各色谱峰对该药效值的贡献大小顺序为 $X_{17} > X_9 > X_{10} > X_{15} > X_{16} > X_5 > X_2 > X_{13} > X_{14} > X_4 > X_6 > X_{12} > X_7 > X_3 > X_8 > X_1 > X_{11}$, 其中 4 号峰为丹酚酸 B, 10 号峰为 15,16-二氢丹参酮 I, 11 号峰为隐丹参酮, 12 号峰为丹参酮 I, 16 号峰为丹参酮 II_A。

2.4.2 偏最小二乘法分析 将 HPLC 指纹图谱中各特征峰的峰面积作为谱效关系分析中的自变量 X ,

表 3 10 批丹参提取物的共有峰峰面积及药效值

Table 3 Common peaks, and efficacy Y of extract from 10 batches of *S. miltiorrhiza*

批次	共有峰面积								
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
S1	107.0	1 754.1	1 698.6	16 324.3	293.7	381.7	453.2	811.2	383.1
S2	117.4	756.3	2 002.9	8 584.5	288.3	744.6	270.5	493.1	2 028.5
S3	103.5	1 015.8	1 482.4	10 766.3	184.8	386.6	275.8	478.4	642.9
S4	135.8	865.4	1 301.5	9 006.1	145.4	318.3	405.2	552.3	1 234.8
S5	92.3	1 992.7	1 748.9	13 312.9	212.9	526.6	353.6	594.4	1 183.1
S6	100.9	2 273.2	1 445.4	23 935.5	513.3	311.1	316.3	486.7	255.1
S7	114.7	1 737.3	1 295.3	12 032.3	171.5	345.7	342.3	569.1	2 529.3
S8	104.1	2 234.0	2 105.9	14 640.6	205.4	425.8	324.2	555.9	1 080.8
S9	53.7	862.7	924.5	8 293.2	136.4	232.9	138.9	288.9	232.6
S10	153.8	2 855.8	2 255.3	19 977.4	381.5	626.1	318.7	667.3	585.5

批次	共有峰面积								
	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17	Y
S1	805.4	3 431.5	3 792.2	511.6	3 003.4	2 598.3	30 033.2	296.3	0.294
S2	2 667.8	4 213.9	3 507.3	464.2	1 898.4	1 362.1	11 080.4	1 179.5	0.544
S3	1 083.9	2 519.5	3 339.8	271.5	1 854.6	2 036.3	11 968.8	484.2	0.208
S4	1 822.7	2 733.1	4 554.4	463.2	3 125.3	3 026.1	11 673.6	1 220.8	0.451
S5	2 167.7	2 773.7	3 079.5	406.5	1 281.0	1 157.1	8 421.2	1 641.9	0.120
S6	616.1	2 091.4	3 627.5	262.6	3 090.3	3 033.2	11 291.2	179.2	0.248
S7	3 868.0	3 959.6	3 467.2	1 036.2	1 337.1	805.1	7 897.4	3 030.1	0.442
S8	2 194.6	2 627.9	4 280.8	397.7	2 808.4	2 556.3	10 535.7	702.7	0.321
S9	294.9	2 367.0	1 216.9	135.7	572.7	865.8	9 451.3	257.5	0.176
S10	1 008.7	3 296.7	1 981.7	399.0	1 413.9	1 001.3	22 088.3	297.3	0.323

表 4 10 批丹参提取物指纹图谱相似度

Table 4 Fingerprint similarity of extract from 10 batches of *S. miltiorrhiza*

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.941	S6	0.941
S2	0.972	S7	0.950
S3	0.992	S8	0.987
S4	0.974	S9	0.984
S5	0.979	S10	0.980

表 5 丹参提取物与 HIF-1 α 表达量的关联度

Table 5 Grey relational orders associated with fingerprint patterns of *S. miltiorrhiza* and HIF-1 α release

峰号	HIF-1 α	峰号	HIF-1 α
1	0.678 8	10	0.720 3
2	0.700 3	11	0.677 3
3	0.683 1	12	0.685 3
4	0.699 2	13	0.699 7
5	0.702 7	14	0.699 8
6	0.689 0	15	0.709 9
7	0.683 7	16	0.705 7
8	0.682 6	17	0.754 6
9	0.731 2		

将 HIF-1 α 表达量的药效数据作为谱效关系分析中的因变量 Y (表 3), 运用 Matlab (R2015b) 软件, 采用 PLSR 法建模对数据进行偏最小二乘法相关性分析, 得到 X 与 Y 的回归系数。

以此系数建模, 得到 X 关于 Y 的回归方程: $Y=0.300\ 3\ X_1-0.248\ 1\ X_2+0.030\ 1\ X_3-0.120\ 1\ X_4+0.101\ 7\ X_5+0.110\ 0\ X_6-0.076\ 4\ X_7-0.128\ 9\ X_8+0.200\ 7\ X_9+0.090\ 3\ X_{10}+0.284\ 5\ X_{11}+0.151\ 3\ X_{12}+0.082\ 3\ X_{13}+0.239\ 9\ X_{14}+0.158\ 4\ X_{15}+0.034\ 2\ X_{16}-0.050\ 4\ X_{17}$ 。每个自变量 X 与因变量 Y 存在正相关和负相关。对降低 HIF-1 α 表达量的贡献大小顺序为: $X_1>X_{11}>X_{14}>X_9>X_{15}>X_{12}>X_6>X_5>X_{10}>X_{13}>X_{16}>X_3>X_{17}>X_7>X_4>X_8>X_2$, 其中 X_1 、 X_3 、 X_5 、 X_6 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 的回归系数为正, 该 12 个自变量所组成的“药效成分组”对降低 HIF-1 α 表达量有贡献, 而 X_2 、 X_4 、 X_7 、 X_8 、 X_{17} 对该药效呈负相关, 其中 4 号峰为丹酚酸 B。

由灰色关联分析可知, X_{17} 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_5 、 X_2 (关联度 >0.7) 所代表的化学成分是与 HIF-1 α 表达有较大关联的活性物质, 其中 10、16 号色谱峰

分别为 15,16-二氢丹参酮 I、丹参酮 II_A, 该分析结果与丹参酮 II_A 的药理结果一致。结合偏最小二乘法, 结果表明 X_1 、 X_{11} 、 X_{14} 、 X_9 、 X_{15} 、 X_{12} 、 X_6 、 X_5 与该药效作用呈正相关且贡献较大 (回归系数 >0.1)。11、12 号色谱峰分别为隐丹参酮、丹参酮 I, 其他色谱峰代表的化合物结构有待确定。其中 X_{17} 、 X_2 与抑制 HIF-1 α 表达不呈正相关, 与灰色关联分析结果不一致, 其余各峰代表的化学成分对抑制 HIF-1 α 表达具有较大的贡献。综上所述, 初步确定 15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 及 6 个尚未确定结构的成分 (峰 1、5、6、9、14、15) 为丹参治疗 DR 的可能药效物质。

3 讨论

长期慢性高血糖是 DR 发生发展的重要原因。体外培养细胞时, 25 mmol/L 葡萄糖水平可近乎等同于糖尿病时体内的高糖状态, 在单纯高糖条件下, 视网膜 Müller 细胞对短时间高糖有一定耐受性^[11], 但持续的高糖最终会导致 Müller 细胞损伤。AGEs 是机体在长期慢性高血糖状态下形成的一种不可逆的终末产物, 是蛋白质的氨基与还原糖的醛基之间发生非酶性糖基化反应后所形成的具有高度活性终产物的总称。在高血糖患者的血清、血管壁上可检测到高表达的 AGEs, 因此 AGEs 数量大小与 DR 的发生发展密切相关, 并起着至关重要的作用。高浓度的 AGEs 在视网膜沉积可导致视网膜缺血缺氧、并能升高 HIF-1 α 蛋白表达量^[15]。已有研究表明, 补肾活血方含药血清能提高在高浓度的 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞稳定性、降低细胞膜通透性、增加细胞活力, 其可能是防治 DR 的药物干预途径之一^[16]。丹参为补肾活血方的组方药物之一, 对 DR 具有一定防治作用。本实验选取 10 批丹参提取物及其活性成分丹参酮 II_A 为研究对象, 探究其对 DR 的防治作用。结果表明 10 批丹参提取物及丹参酮 II_A 对高浓度的 AGEs 条件下的视网膜 Müller 细胞具有不同程度的保护作用。

VEGF 是目前已知最关键的血管生成促进因子, 是 DR 发生发展过程中的 1 个重要因子。糖尿病患者视网膜中高糖和 AGEs 的积累, 增加 VEGF 基因转录, 导致眼内 VEGF 蛋白的积累, 激活血管化过程, VEGF 水平和 DR 严重程度有直接显著的关系^[17-19]。机体在缺氧条件下, 会自发对缺氧条件产生适应性, 以维持氧稳态。HIF-1 是 1 种氧气敏感性的转录调节因子, 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成

的异二聚体,其中 HIF-1 α 主要决定 HIF-1 的生理活性。HIF-1 α 能够直接感受氧分压,在缺氧条件的适应性方面,以及传递缺氧信号过程中起到主导作用。VEGF 是 HIF-1 α 介导的转录活化的 1 个靶点, HIF-1 α 通过增加 VEGF 的转录、提高 VEGF mRNA 的稳定性而上调 VEGF。HIF-1 α 与 VEGF 在 DR 患者的玻璃体里表达均增加,且两者密切相关^[15]。本实验选择 HIF-1 α 为检测指标,研究不同产地丹参提取物对高浓度 AGES/缺氧条件下的视网膜 Müller 细胞作用,比较不同产地丹参提取物对 DR 的防治作用,结果表明不同产地的丹参在防治 DR 病变方面存在着差异,但均具有一定的防治作用。由中药指纹图谱反映出不同产地的丹参化学成分量有一定的差异,其可能与药效之间存在着一定的相关性。

本实验在获得丹参提取物指纹图谱与药效学数据的基础上,根据实验数据特征筛选后,采用灰色关联度分析,找出指纹图谱特征峰的代表化学成分对药效的贡献大小,再结合偏最小二乘法筛选出贡献值较大的成分,初步判断 15,16-二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 及 6 个尚未确定结构的成分(峰 1、5、6、9、14、15)为丹参治疗 DR 的可能药效物质。后续还将通过整体动物实验进一步验证各成分药效作用及进行未知化合物的结构鉴定,确定丹参防治 DR 的药效成分,为最终阐明补肾活血方防治 DR 药效物质奠定基础。

参考文献

- [1] 马殿伟,谢学军,李晓微,等. 补肾活血中药对 TGF- β 2 及高糖状态下体外培养的视网膜 Müller 细胞活力的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2010, 20(4): 193-197.
- [2] 马荣,谢学军,万李,等. 补肾活血中药血清对高糖条件下纯化培养的视网膜神经节细胞 Glu 释放量的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(8): 875-879.
- [3] 谢学军,杨红,何宇,等. 补肾活血中药对糖尿病大鼠视路胶质纤维酸性蛋白和髓鞘碱性蛋白表达的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2007, 17(5): 265-268.
- [4] 秦伟,谢学军,何宇,等. 补肾活血中药对糖尿病大鼠视路 Syn-I 和 Nissl 小体的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2012, 22(1): 1-4.
- [5] 杨明明,王君. 丹参对糖尿病视网膜病变的防治作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011, 45(6): 553-555.
- [6] 马洁. 复方丹参滴丸治疗糖尿病视网膜病变的机理探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(3): 81-82.
- [7] Reichenbach A, Robinson S R. *Neuroglia* [M]. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- [8] 杨雄里. 视觉的神经机制 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1996.
- [9] 徐国兴,许建斌,胡建章. 糖尿病大鼠视网膜中缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(3): 487-490.
- [10] Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: Role of hypoxia-inducible factors [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 473-483.
- [11] 谢学军,李芳梅,张梅,等. 补肾活血法对 Müller 细胞谷氨酸摄取功能的影响 [J]. 中国中医眼科杂志, 2008, 18(1): 19-22.
- [12] 徐秒,张梅,姚红娥,等. 丹参脂溶性成分对大鼠视网膜 Müller 细胞的毒性作用研究 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(5): 453-455.
- [13] 马殿伟,谢学军,李晓微,等. TGF- β 2 干预的缺氧状态下补肾活血剂对 Müller 细胞及谷氨酰胺合成酶活性的影响 [J]. 眼科研究, 2010, 28(5): 407-411.
- [14] 吴忠. 质量计量学——中药色谱指纹图谱的解析与特征表达 [J]. 中药材, 2003, 26(8): 598-600.
- [15] 宋明霞,谢学军,万李,等. 高糖及糖基化终末产物对视网膜 Müller 细胞缺氧诱导因子-1 α 介导缺氧信号通路的影响 [J]. 眼科新进展, 2013, 33(12): 1101-1105.
- [16] 谢学军,宋明霞,张梅,等. 补肾活血中药复方对高血糖及糖基化终末产物条件下视网膜 Müller 细胞的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(6): 735-740.
- [17] Szaflik J P, Wysocki T, Kowalski M, et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(1): 39-43.
- [18] 谢秀雯,周建强,崔红平. VEGF 在糖尿病视网膜病变发病机制中作用的研究新进展 [J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(2): 282-285.
- [19] Gupta N, Mansoor S, Sharma A, et al. Diabetic retinopathy and VEGF [J]. *Open Ophthalmol J*, 2013, 7(1): 4-10.