

丹参水溶性成分促斑马鱼血管生成及心脏保护活性的谱-效关系研究

杨龙飞¹, 赵渤年¹, 丁晓彦², 孙启慧¹, 吕 婧¹, 高 燕^{1*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省中医药研究院, 山东省中药质量标准研究重点实验室, 山东 济南 250014

摘要: 目的 研究丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用的谱-效关系, 揭示其药效物质基础。方法 采用 HPLC 法建立丹参水溶性成分指纹图谱, 以斑马鱼建立不同药效学模型, 对丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用进行评价, 利用灰色关联度分析方法, 建立丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用的谱-效关系。结果 在丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱中, 9 种水溶性成分与各药效作用均呈正相关, 且各共有峰与药效关联度趋势基本一致, 其中 5 号峰(紫草酸)对各药效作用贡献最大。结论 通过谱-效关系研究, 阐明了丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用的物质基础, 可为其深入研究奠定基础。

关键词: 丹参水溶性成分; 谱-效关系; 促血管生成; 心脏保护; 斑马鱼; 灰色关联度分析; 紫草酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)12-2899-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.023

Spectrum-effect relationship of angiogenesis activity and cardioprotection of water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* in zebrafish

YANG Long-fei¹, ZHAO Bo-nian¹, DING Xiao-yan², SUN Qi-hui¹, LV Jing¹, GAO Yan¹

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Key Laboratory of Chinese Medicine Quality Standard Research, Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To study the spectrum-effect relationship of angiogenesis activity and protective effect of heart injury of water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza* to reveal the pharmacodynamics material basis. **Methods** The HPLC fingerprints of water-soluble components of *S. miltiorrhiza* were established to evaluate the angiogenesis activity and protective effect of heart injury of water-soluble components of *S. miltiorrhiza* by establishing different models of zebrafish. The spectrum-effect relationship of angiogenesis activity and protective effect of heart injury of water-soluble components of *S. miltiorrhiza* was established by grey correlation degree analysis. **Results** Nine water-soluble components in the fingerprints were positively correlated with efficacy of medicine, the association trend of common peaks and efficacy was consistent, and peak 5 (alkannic acid) played the most significant role among nine components. **Conclusion** Elucidation of the material basis of angiogenesis activity and protective effect of heart injury of water-soluble components of *S. miltiorrhiza* by researching on the spectrum-effect relationship will provide the basis for the deep research of *S. miltiorrhiza*.

Key words: water-soluble components of *Salvia miltiorrhiza*; spectrum-effect relationship; angiogenesis activity; heart protection; zebrafish; grey correlation degree analysis; alkannic acid

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 具有活血化瘀、通经止痛、凉血消痈、清心除烦之功效^[1]。现代研究表明, 丹参水溶性成分具有显著促血管生成及心脏保护作用^[2-5], 但

对其发挥作用物质基础的报道并不统一。中药谱-效相关评价模式是将中药指纹图谱与中药药效结合考察中药内在质量及其成分与其活性间关系的新方法, 现已广泛应用于中药研究领域^[6-10], 而对丹参

收稿日期: 2019-01-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1701501); 国家重点研发计划项目(2017YFC1702700); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1306)

作者简介: 杨龙飞(1988—), 男, 回族, 山东济南人, 博士, 研究方向为中药质量综合评价及新药研究。

Tel: 18764062928 E-mail: chongcao1988@163.com

*通信作者 高 燕, 女, 山东济南人, 副研究员, 研究方向为中药质量综合评价及新药研究。Tel: 18615212592 E-mail: gaoyanningyes@163.com

中成分的谱-效关系研究较少,且多集中于抗炎、抗氧化的谱-效关系研究^[11-13],本实验通过建立丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱,利用斑马鱼模型对丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用进行评价,利用灰色关联度分析方法确定了丹参水溶性成分对不同药效指标的影响程度,得出各共有峰与药效的关联度,为丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用物质基础的阐明提供科学依据和数据支持。

1 材料

1.1 实验动物

FLK 系血管荧光转基因斑马鱼及 AB 系斑马鱼均由山东省科学院生物研究所提供。

1.2 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2998 紫外检测器(美国 Waters 公司);Agilent 1200 series HPLC/6320 ion trap MS 液-质联用仪(Agilent 公司);Inert Sustain AQ-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 岛津公司);AGBP210S 电子天平(Sartorius 公司);SZ X16 体视荧光显微镜、X51 体视荧光显微镜(Olympus 公司);光照培养箱(上海医用仪器设备公司)。

1.3 药材与试剂

丹参样品(不同产地的 63 批丹参药材饮片),购自亳州康美中药城中药材交易中心,经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定,均为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,来源见表 1。

丹参素钠(批号 MUST-17030706,质量分数≥99.87%)、紫草酸(批号 MUST-17053003,质量分数≥99.58%)、丹酚酸 B(批号 MUST-1704053,质量分数≥96.20%)购自成都曼思特生物科技有限公司;原儿茶醛(批号 0810-200004,质量分数≥98%)购自中国食品药品检定研究院;迷迭香酸(批号 14052812,质量分数≥99.40%)、丹酚酸 A(批号 14050708,质量分数≥98%)购自成都普瑞法科技开发有限公司;新绿原酸(批号 CDAA-280307,质量分数≥99.67%)购自上海安普实验科技股份有限公司。

乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯),上海星可高纯度溶剂有限公司;其他试剂均为分析纯,水为超纯水;二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司);Vatalanib(PTK787,山东省科学院生物研究所);麻醉剂 3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(批号 MKBQ3381V)、苯硫脲(PTU,批号 037K1077),

表 1 63 批丹参样品来源

Table 1 Source of 63 batches of *S. miltiorrhiza* samples

编号	产地	编号	产地
S1	山东	S33	河南
S2	山东	S34	山东
S3	安徽	S35	安徽
S4	山东	S36	四川
S5	山东	S37	山西
S6	四川	S38	山东
S7	山东	S39	陕西
S8	山东	S40	河南
S9	山东	S41	安徽
S10	山东	S42	安徽
S11	四川	S43	山东
S12	山东	S44	山东
S13	山东	S45	山西
S14	山东	S46	山东
S15	山东	S47	河南
S16	山东	S48	山东
S17	山东	S49	山西
S18	安徽	S50	山西
S19	河北	S51	山西
S20	山东	S52	河南
S21	山东	S53	山东
S22	河南	S54	安徽
S23	山东	S55	四川
S24	山东	S56	四川
S25	河北	S57	山西
S26	安徽	S58	河南
S27	四川	S59	河南
S28	山西	S60	河南
S29	河南	S61	山东
S30	四川	S62	山东
S31	山西	S63	安徽
S32	河南		

美国 Sigma 公司;脱膜剂链酶蛋白酶(Pronase E, Streptomyces griseus Lot. 公司,批号 119E0417);特非那定(批号 100292-201302,中国食品药品检定研究院);白藜芦醇(批号 PS000122,质量分数≥98.50%,成都普思生物科技股份有限公司);血塞通胶囊(批号 1607103,云南维和药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 丹参水溶性成分指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 及丹酚酸 A 对照品适量,以水溶解,混匀,即得质量浓度分别为 0.052、0.030、0.442、0.720、0.460、0.050 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 内标物溶液的制备 精密称取新绿原酸适量,加水溶解,即得质量浓度为 68.9 μg/mL 的内标溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取丹参粉末（过 40 目筛）1 g，精密称定，置于 100 mL 圆底烧瓶中，加水 20 mL，称质量，回流提取 30 min，放至室温，补足减失质量，摇匀，滤过，取续滤液，作为丹参水溶性成分样品溶液。精密量取等体积的样品溶液和 68.9 $\mu\text{g/mL}$ 的新绿原酸溶液，混匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，作为高效液相色谱指纹图谱测定用供试品溶液。

2.1.4 色谱条件 采用 Inert Sustain AQ-C₁₈ 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm ）以 0.4% 甲酸水溶液（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱，洗脱程序为 0~10 min，99% A；10~70 min，99%~93% A；70~160 min，93%~84% A；160~220 min，84%~79% A；220~300 min，79%~75% A。检测波长 280 nm，柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 10 μL ，体积流量 0.8 mL/min，检测时间 300 min，进行 HPLC 分析，所得色谱峰形较好，基线平稳，分离效果最佳，能较好地对丹参水溶性成分中的色谱信息进行表征。

2.1.5 精密度试验 取同一丹参水溶性成分供试品（S9）供溶液 10 μL ，注入液相色谱仪，按照“2.1.4”项下色谱条件连续测定 6 次，记录指纹图谱，考察相对峰面积及相对保留时间的 RSD。结果表明，指纹图谱中共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明本实验仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一丹参样品 6 份（S9），分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，注入液相色谱仪，按照“2.1.4”项下色谱条件进行测定，记录指纹图谱，考察相对峰面积及相对保留时间的 RSD。结果表明，指纹图谱中共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明该实验方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一丹参水溶性成分供试品溶液（S9），分别在 0、6、12、18、24、30 h 进行测定，记录指纹图谱，考察各共有峰与其保留时间及峰面积比值的 RSD。结果，各共有峰与内标峰相对保留时间和峰面积比值的 RSD 小于 3.0%，表明样品供试液室温放置 30 h 内稳定性良好。

2.1.8 质谱条件 采用电喷雾离子源，正负离子交替扫描模式，扫描级数 5 级，扫描范围 m/z 50~2 200，扫描速度 m/z 26 000/s，喷雾气压力 241.325 kPa（35 psi），干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气体积流量 9 L/min，毛细管电压 4 000 V，分流比 4：1，碰撞气为氦气。

2.1.9 共有峰的标定及鉴别 分别测定丹参水溶性

成分供试品指纹图谱，对其中分离度及峰型较好的色谱峰进行标定，选择 90% 以上批次样品均有的色谱峰为共有峰，并使共有峰面积占总峰面积 90% 以上。最终确定其中 9 个色谱峰为丹参水溶性成分指纹图谱共有峰。结果见图 1、2。根据各共有峰裂解情况，并参照对照品及文献信息，共鉴定出 9 种成分，结果见表 2。

2.1.10 样品测定 按照上述色谱条件，对收集到的 63 批不同产地的丹参样品分别进行测定，采集各批次样品指纹图谱并记录各共有峰峰面积及保留时间，计算单位质量样品各共有峰峰面积与内标峰峰面积的比值（相对峰面积），结果见表 3。

2.2 丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护活性的测定

2.2.1 模型制备 以新型模式生物斑马鱼为实验载体，根据前期研究结果^[14]，建立斑马鱼节间血管损伤模型及心损伤模型。

2.2.2 斑马鱼节间血管长度（ISV）的测量 取正常发育 24 hpf（hour post fertilization）FLK 系斑马鱼受精卵，脱膜后置于 24 孔板中，设对照组、模型组（PTK787 0.3 $\mu\text{g/mL}$ ）、空白给药组（每孔加入 25 μL S12 样品溶液）、阳性对照血塞通 100 $\mu\text{g/mL}$ 组、丹参水溶性成分样品溶液给药组（S1~S63，每孔同时加入 PTK787 及不同批次样品溶液 25 μL ），每组均设置 2 复孔，加入相应的试药，保证每孔终体积

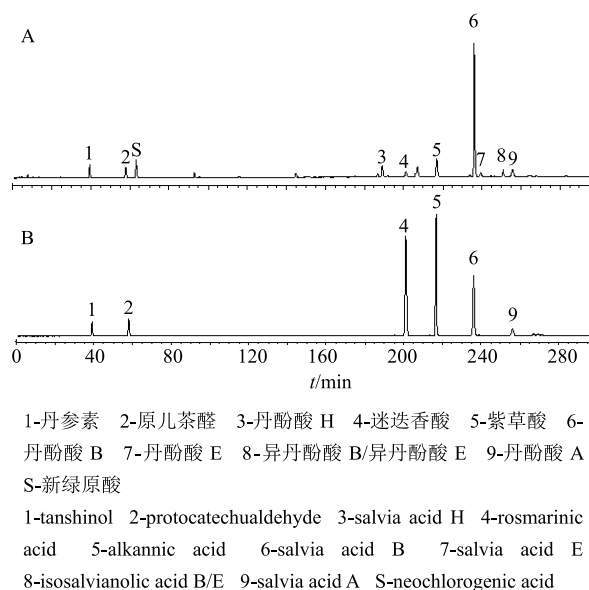


图 1 丹参水溶性成分样品（S9, A）与混合对照品（B）色谱图
Fig. 1 Chromatogram of *S. miltiorrhiza* water-soluble components (S9, A) and mixed reference (B)

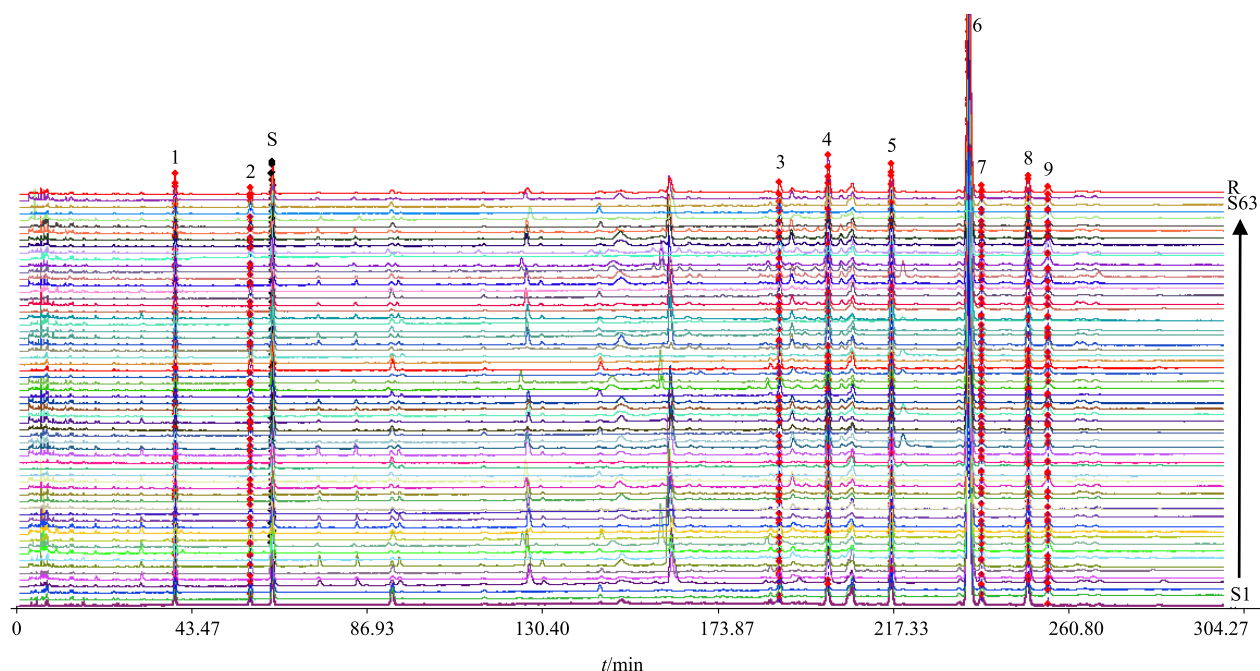


图 2 丹参水溶性成分样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of *S. miltiorrhiza* water-soluble components

表 2 丹参水溶性成分指纹图谱共有峰鉴定结果

Table 2 Identification result of common peaks of water-soluble component fingerprint of *S. miltiorrhiza*

峰号	t_R/min	MS (m/z)	二级碎片离子	分子式	化合物
1	39.42	197	179, 135	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	丹参素
2	58.18	137	109	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	原儿茶醛
3	189.22	537	493, 339	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	丹酚酸 H
4	201.52	359	179, 161	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	迷迭香酸
5	217.21	538	493, 295	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	紫草酸
6	236.30	717	321, 519	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	丹酚酸 B
7	239.55	717	321, 519	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	丹酚酸 E
8	251.15	717	321, 519	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	异丹酚酸 B/异丹酚酸 E
9	256.68	493	295	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	丹酚酸 A

为 1 mL, 置 28 °C 光照培养箱控光培养 24 h。采用体式荧光显微镜观察实验结果。拍照储存图像, 采用 Image Pro Plus 5.0 测量计算 ISV, 记录数据, 计算血管增长率及相对增长率。

$$\text{血管增长率} = (\text{ISV}_{\text{给药}} - \text{ISV}_{\text{模型}}) / (\text{ISV}_{\text{对照}} - \text{ISV}_{\text{模型}})$$

血管相对增长率 = 丹参样品血管增长率 / 血塞通血管增长率

2.2.3 斑马鱼静脉窦-动脉球 (SV-BA) 间距的测量 选取正常发育 24 hpf AB 系斑马鱼胚胎, 置于 24 孔板中 (8 枚/孔), 设对照组、空白给药组 (每孔加入 4 μL 样品溶液)、阳性对照白藜芦醇 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、模型组 (特非那定 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及丹参水溶性成分给药组 (S1~S63, 每孔同时加入特非那定及不同批次

样品液 4 μL), 每组均设 2 复孔, 加入相应的试药, 同时每孔加入 40 μL PTU, 保证终体积为 2 mL, 置 28 °C 光照培养箱控光培养, 在给药 48 h 后在 IX51 倒置显微镜下对斑马鱼心脏进行观察、拍照, 通过 Imagepro-plus5.0 软件测定 SV-BA 间距, 记录数据, 计算心脏修复率及相对修复率。

$$\text{心脏修复率} = (\text{SV-BA 间距}_{\text{给药}} - \text{SV-BA 间距}_{\text{模型}}) / (\text{SV-BA 间距}_{\text{对照}} - \text{SV-BA 间距}_{\text{模型}})$$

$$\text{相对修复率} = \text{丹参样品心脏修复率} / \text{白藜芦醇心脏修复率}$$

2.2.4 统计学分析 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并利用 SPSS Statistics 19 进行单因素方差分析。

2.2.5 结果 共测定了 63 批样品的血管增长率及心脏修复率。结果见表 4、5。

表 3 63 批丹参样品的相对峰面积

Table 3 Relative peak area data of 63 batches of *S. miltiorrhiza* samples

批号	相对峰面积								
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
S1	0.623	0.378	0.275	1.024	1.416	24.367	0.505	1.270	0.097
S2	0.672	0.426	0.552	0.549	1.317	17.545	0.454	0.923	0.370
S3	0.461	0.389	0.630	0.284	0.815	8.367	0.215	0.436	0.319
S4	0.980	0.199	0.326	2.188	2.210	29.865	0.395	1.486	0.400
S5	0.601	0.103	0.348	1.048	1.266	15.326	0.134	0.693	0.381
S6	0.795	0.548	0.482	0.785	1.469	21.051	0.509	1.078	0.473
S7	0.609	0.075	0.157	1.098	1.128	18.169	0.214	0.792	0.448
S8	0.464	0.137	0.258	1.040	1.131	19.219	0.365	0.980	0.104
S9	0.971	0.301	0.306	0.732	1.185	11.164	0.272	0.524	0.607
S10	0.510	0.098	0.244	0.774	0.971	15.862	0.253	0.812	0.528
S11	0.653	0.482	0.913	0.287	1.177	12.527	0.294	0.639	0.508
S12	0.954	0.259	0.306	0.663	1.069	10.156	0.295	0.476	0.465
S13	0.687	0.094	0.227	1.365	1.480	20.724	0.234	0.917	0.297
S14	0.565	0.073	0.171	0.785	0.981	15.415	0.165	0.708	0.143
S15	0.403	0.291	0.440	0.709	0.923	12.434	0.228	0.616	0.110
S16	0.440	0.108	0.263	0.885	1.033	14.058	0.205	0.719	0.123
S17	0.477	0.061	0.142	0.989	0.961	16.772	0.183	0.739	0.080
S18	0.478	0.070	0.193	1.031	0.989	16.363	0.218	0.700	0.128
S19	0.491	0.090	0.263	1.583	1.409	20.216	0.277	0.987	0.637
S20	0.593	0.080	0.215	1.638	1.294	21.558	0.323	0.964	0.450
S21	0.422	0.277	0.457	0.532	0.848	10.069	0.206	0.527	0.076
S22	0.597	0.232	0.173	1.845	1.458	13.425	0.348	0.591	0.219
S23	0.465	0.205	0.300	0.658	0.957	15.318	0.257	0.791	0.070
S24	0.760	0.120	0.282	1.968	1.407	20.468	0.174	0.916	0.520
S25	0.528	0.107	0.257	1.035	1.195	17.224	0.231	0.835	0.364
S26	0.367	0.074	0.174	1.387	1.030	17.428	0.258	0.868	0.199
S27	0.525	0.360	1.001	0.528	1.002	9.193	0.211	0.480	0.583
S28	0.450	0.075	0.335	0.998	1.036	10.283	0.235	0.572	0.241
S29	0.407	0.077	0.253	1.219	0.912	16.406	0.208	0.729	0.268
S30	0.342	0.072	0.158	1.285	1.095	15.813	0.256	0.783	0.589
S31	0.436	0.075	0.291	1.172	1.210	16.143	0.242	0.804	0.806
S32	0.589	0.087	0.230	1.588	1.274	20.967	0.259	1.026	0.478
S33	0.412	0.441	0.608	0.328	0.654	6.396	0.172	0.308	0.019
S34	0.354	0.162	0.563	0.804	0.896	12.483	0.239	0.622	0.413
S35	0.381	0.067	0.275	1.439	0.954	18.835	0.253	0.889	0.320
S36	0.275	0.124	0.253	0.646	0.765	8.284	0.158	0.373	0.391
S37	0.583	0.611	0.814	0.478	1.313	11.114	0.348	0.567	0.669
S38	0.388	0.427	0.497	0.261	0.712	8.080	0.253	0.427	0.215
S39	0.523	0.441	0.388	0.482	0.790	7.848	0.233	0.317	0.194
S40	0.424	0.203	0.232	1.107	1.075	13.301	0.319	0.703	0.663
S41	0.561	0.076	0.189	2.003	1.386	26.940	0.389	1.284	0.478
S42	0.557	0.138	0.227	1.241	1.094	16.642	0.244	0.850	0.162
S43	0.420	0.258	0.439	0.607	0.828	10.037	0.229	0.503	0.097
S44	0.466	0.407	0.502	0.456	0.817	5.885	0.157	0.259	0.182
S45	0.625	0.081	0.265	1.044	1.384	17.137	0.179	0.791	0.279
S46	0.397	0.158	0.238	0.776	0.851	10.662	0.134	0.475	0.241
S47	0.544	0.118	0.295	1.192	1.231	18.527	0.213	0.933	0.339
S48	0.437	0.359	0.549	0.600	1.223	12.042	0.326	0.600	0.382
S49	0.613	0.240	0.382	1.338	1.410	18.828	0.345	0.947	0.374
S50	0.484	0.101	0.277	1.615	1.522	20.711	0.304	1.035	0.802
S51	0.581	0.128	0.355	1.650	1.437	19.361	0.403	1.012	0.361
S52	0.330	0.099	0.718	1.222	1.014	16.458	0.233	0.830	0.106

续表 3

批号	相对峰面积								
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
S53	0.386	0.085	0.282	2.173	1.546	17.290	0.365	0.858	0.785
S54	0.531	0.286	0.717	0.522	1.055	10.477	0.189	0.541	0.095
S55	0.443	0.197	0.736	1.359	1.278	16.173	0.333	0.829	0.839
S56	0.438	0.123	0.272	1.616	1.412	19.668	0.338	0.987	0.624
S57	0.429	0.076	0.216	1.317	1.093	21.710	0.242	1.044	0.481
S58	0.488	0.137	0.366	1.638	1.152	17.815	0.216	0.898	0.243
S59	0.485	0.209	0.687	0.588	1.148	11.112	0.187	0.566	0.207
S60	0.489	0.093	0.242	1.689	1.335	20.029	0.197	0.914	0.534
S61	0.268	0.449	0.416	0.138	0.395	2.959	0.104	0.156	0.086
S62	0.506	0.382	0.431	0.944	1.151	12.684	0.357	0.637	0.306
S63	0.390	0.068	0.167	1.828	1.005	18.785	0.268	0.879	0.208

表 4 63 批丹参水溶性成分样品促进斑马鱼 ISV 增长结果 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)Table 4 Angiogenesis activity of 63 batches of *S. miltiorrhiza* water-soluble components ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	ISV/ μm	血管增长率/%	血管相对增长率	组别	ISV/ μm	血管增长率/%	血管相对增长率
对照	2 959.75 $\pm$ 294.90	—	—	S31	2 074.96 $\pm$ 420.73*	51.98	0.61
模型	1 117.18 $\pm$ 248.36	—	—	S32	2 267.82 $\pm$ 348.82*	62.45	0.73
空白给药	2 931.19 $\pm$ 267.30	—	—	S33	2 235.70 $\pm$ 365.73*	60.70	0.71
血塞通	2 686.64 $\pm$ 238.26	85.18	1.00	S34	2 265.77 $\pm$ 297.16*	62.33	0.73
S1	1 829.87 $\pm$ 567.97*	38.68	0.45	S35	2 088.64 $\pm$ 424.35*	52.72	0.62
S2	1 876.11 $\pm$ 628.17*	41.12	0.48	S36	2 231.02 $\pm$ 396.27*	60.45	0.71
S3	1 526.30 $\pm$ 384.69*	22.20	0.26	S37	2 351.68 $\pm$ 482.78*	66.99	0.79
S4	2 154.19 $\pm$ 290.02*	56.28	0.66	S38	2 203.35 $\pm$ 487.57*	58.95	0.69
S5	2 235.47 $\pm$ 453.58*	60.69	0.71	S39	2 400.93 $\pm$ 442.71*	69.67	0.82
S6	2 134.01 $\pm$ 453.52*	55.12	0.65	S40	2 409.82 $\pm$ 404.59*	70.15	0.82
S7	1 769.53 $\pm$ 135.04*	35.40	0.42	S41	2 289.09 $\pm$ 517.54*	63.60	0.75
S8	1 810.83 $\pm$ 327.48*	37.65	0.44	S42	2 273.13 $\pm$ 452.79*	62.74	0.74
S9	2 114.13 $\pm$ 349.44*	54.11	0.64	S43	2 186.58 $\pm$ 418.18*	58.04	0.68
S10	1 978.66 $\pm$ 370.07*	46.75	0.55	S44	2 002.14 $\pm$ 510.93*	48.03	0.56
S11	2 144.67 $\pm$ 485.85*	55.76	0.65	S45	1 931.40 $\pm$ 469.79*	44.19	0.52
S12	2 123.73 $\pm$ 710.65*	54.63	0.64	S46	2 149.83 $\pm$ 593.64*	56.04	0.66
S13	2 030.24 $\pm$ 620.86*	49.55	0.58	S47	2 228.25 $\pm$ 419.70*	60.30	0.71
S14	1 983.91 $\pm$ 638.15*	47.04	0.55	S48	2 158.41 $\pm$ 309.67*	56.51	0.66
S15	1 848.33 $\pm$ 479.19*	39.68	0.47	S49	1 813.50 $\pm$ 210.41*	37.79	0.44
S16	1 979.36 $\pm$ 625.95*	46.79	0.55	S50	2 396.51 $\pm$ 458.21*	69.43	0.82
S17	2 044.04 $\pm$ 434.50*	50.30	0.59	S51	2 193.41 $\pm$ 539.02*	58.41	0.69
S18	1 849.25 $\pm$ 304.96*	39.73	0.47	S52	2 425.83 $\pm$ 530.36*	71.02	0.83
S19	2 346.63 $\pm$ 421.58*	66.72	0.78	S53	2 092.57 $\pm$ 598.94*	52.94	0.62
S20	2 672.89 $\pm$ 237.80*	84.43	0.99	S54	2 168.40 $\pm$ 417.09*	57.05	0.67
S21	1 722.70 $\pm$ 338.55*	32.86	0.39	S55	2 094.05 $\pm$ 335.11*	53.02	0.62
S22	2 094.60 $\pm$ 250.32*	53.05	0.62	S56	2 306.69 $\pm$ 153.47*	64.56	0.76
S23	1 807.83 $\pm$ 726.50*	37.48	0.44	S57	2 457.89 $\pm$ 396.63*	72.76	0.85
S24	2 130.77 $\pm$ 579.27*	55.01	0.65	S58	2 434.15 $\pm$ 350.23*	71.47	0.84
S25	2 049.47 $\pm$ 544.59*	50.60	0.59	S59	2 402.96 $\pm$ 572.94*	69.78	0.82
S26	1 890.22 $\pm$ 363.06*	41.95	0.49	S60	2 414.42 $\pm$ 355.68*	70.40	0.83
S27	2 071.84 $\pm$ 433.65*	51.81	0.61	S61	2 448.04 $\pm$ 503.86*	72.23	0.85
S28	2 127.99 $\pm$ 483.21*	54.86	0.64	S62	2 270.27 $\pm$ 435.07*	62.58	0.73
S29	2 093.52 $\pm$ 434.44*	52.99	0.62	S63	1 970.94 $\pm$ 370.17*	46.34	0.54
S30	1 997.12 $\pm$ 431.20*	47.76	0.56				

与模型组比较: * $P < 0.05$, 表 5 同* $P < 0.05$ vs model group, same as table 5

表 5 63 批丹参水溶性成分样品心脏保护作用结果 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Table 5 Cardioprotective effect of 63 batches of *S. miltiorrhiza* water-soluble components ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	SV-BA 间距/ μm	心脏修复率/%	心脏相对修复率	组别	SV-BA 间距/ μm	心脏修复率/%	心脏相对修复率
对照	136.94 $\pm$ 11.34	—	—	S31	157.20 $\pm$ 17.89*	42.20	0.50
模型	171.99 $\pm$ 10.70	—	—	S32	147.26 $\pm$ 8.24*	70.56	0.83
空白给药	139.58 $\pm$ 8.90	—	—	S33	156.89 $\pm$ 11.23*	43.09	0.51
白藜芦醇	142.30 $\pm$ 5.61*	84.71	1.00	S34	148.47 $\pm$ 7.67*	67.10	0.79
S1	145.17 $\pm$ 10.05*	76.52	0.90	S35	150.36 $\pm$ 11.59*	61.72	0.73
S2	151.95 $\pm$ 8.09*	57.17	0.67	S36	149.10 $\pm$ 19.11*	65.30	0.77
S3	155.21 $\pm$ 7.11*	47.86	0.56	S37	151.54 $\pm$ 7.27*	58.33	0.69
S4	148.28 $\pm$ 14.87*	67.63	0.80	S38	154.10 $\pm$ 10.36*	51.04	0.60
S5	147.14 $\pm$ 7.07*	70.89	0.84	S39	152.51 $\pm$ 11.70*	55.57	0.66
S6	154.53 $\pm$ 7.69*	49.82	0.59	S40	152.85 $\pm$ 7.75*	54.61	0.64
S7	149.26 $\pm$ 9.21*	64.84	0.77	S41	156.13 $\pm$ 7.30*	45.25	0.53
S8	143.21 $\pm$ 9.64*	82.10	0.97	S42	154.04 $\pm$ 8.28*	51.20	0.60
S9	156.64 $\pm$ 9.70*	43.78	0.52	S43	152.21 $\pm$ 5.90*	56.44	0.67
S10	146.97 $\pm$ 7.00*	71.38	0.84	S44	150.78 $\pm$ 9.25*	60.52	0.71
S11	150.53 $\pm$ 4.01*	61.24	0.72	S45	152.24 $\pm$ 6.84*	56.34	0.67
S12	150.70 $\pm$ 10.04*	60.74	0.72	S46	147.69 $\pm$ 7.95*	69.33	0.82
S13	143.10 $\pm$ 12.26*	82.42	0.97	S47	144.15 $\pm$ 7.54*	79.42	0.94
S14	146.16 $\pm$ 7.91*	73.70	0.87	S48	142.66 $\pm$ 6.74*	83.68	0.99
S15	151.36 $\pm$ 6.70*	58.86	0.69	S49	146.38 $\pm$ 4.28*	73.07	0.86
S16	146.29 $\pm$ 10.69*	73.33	0.87	S50	152.03 $\pm$ 4.47*	56.96	0.67
S17	153.45 $\pm$ 6.81*	52.88	0.62	S51	147.32 $\pm$ 6.60*	70.37	0.83
S18	149.73 $\pm$ 7.97*	63.52	0.75	S52	145.36 $\pm$ 3.13*	75.97	0.90
S19	153.09 $\pm$ 9.09*	53.92	0.64	S53	146.63 $\pm$ 3.79*	72.36	0.85
S20	147.91 $\pm$ 8.20*	68.69	0.81	S54	148.36 $\pm$ 8.91*	67.43	0.80
S21	159.09 $\pm$ 9.83*	36.81	0.43	S55	148.19 $\pm$ 7.36*	67.91	0.80
S22	153.72 $\pm$ 7.46*	52.14	0.62	S56	145.93 $\pm$ 3.31*	74.35	0.88
S23	151.15 $\pm$ 8.54*	59.44	0.70	S57	145.80 $\pm$ 4.69*	74.72	0.88
S24	153.88 $\pm$ 8.92*	51.67	0.61	S58	147.72 $\pm$ 5.86*	69.24	0.82
S25	147.46 $\pm$ 7.31*	69.99	0.83	S59	148.00 $\pm$ 5.77*	68.44	0.81
S26	154.69 $\pm$ 13.59*	49.36	0.58	S60	147.76 $\pm$ 6.66*	69.12	0.82
S27	157.75 $\pm$ 15.43*	40.63	0.48	S61	144.14 $\pm$ 4.22*	79.46	0.94
S28	161.73 $\pm$ 7.65*	29.26	0.35	S62	151.76 $\pm$ 6.46*	57.71	0.68
S29	151.69 $\pm$ 8.07*	57.92	0.68	S63	153.03 $\pm$ 6.62*	54.08	0.64
S30	150.04 $\pm$ 13.64*	62.61	0.74				

2.3 丹参水溶性成分谱-效相关灰色关联度分析

2.3.1 确定序列 进行灰色关联分析的基础为确定系统特征序列（即母序列或参考因素序列）与相关因素序列（即子序列或比较因素序列）。本研究是对丹参水溶性各成分（即对应各峰）对相对血管增长

率、相对心脏修复率的影响程度进行分析，故将药效学数据作为母序列，记为 $X_0(k)$, $k=1, 2, \dots, 63$ ；将丹参水溶性成分中 9 种成分的峰值作为子序列，分别记为 $X_1(k), X_2(k), \dots, X_9(k)$, $k=1, 2, \dots, 63$ 。

2.3.2 原始数据处理 采用均值化变换，对数据进

行无量纲化处理, 得到均值化序列。

$$Y_i = \{Y_i(k)\}_{k=0}^{63}, i = 0, 1, \dots, 9$$

$$Y_i(k) = \frac{X_i(k)}{\frac{1}{63} \sum_{k=1}^{63} X_i(k)} = \frac{63X_i(k)}{\sum_{k=1}^{63} X_i(k)}$$

$$i=0, 1, 2, \dots, 9, k=1, 2, \dots, 63$$

2.3.3 关联系数与关联度的确定

(1) 关联系数: 按以下公式计算。

$$\xi_{0i}(k) = \frac{\min_i \min_k \Delta_{0i}(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_{0i}(k)}{\Delta_{0i}(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_{0i}(k)}$$

$$i=0, 1, 2, \dots, 9, k=1, 2, \dots, 63$$

(2) 关联度 (γ_{0i}): 按以下公式计算。

$$\gamma_{0i} = \frac{1}{9} \sum_{k=1}^9 \xi_{0i}(k), i = 1, 2, \dots, 9$$

Y_i 为共有峰, ρ 为分辨系数, $0 \leq \rho \leq 1$, 一般取 $\rho = 0.5$;

$$\Delta_{0i}(k) = |Y_0(k) - Y_i(k)|, i = 0, 1, 2, \dots, 9, k = 1, 2, \dots, 63$$

(3) 关联极性分析

$$\sigma_i = \sum_{k=1}^{63} kY_i(k) - \frac{\sum_{k=1}^{63} Y_i(k) \sum_{k=1}^{63} k}{63}, i = 0, 1, 2, \dots, 9$$

若 $\text{sgn}(\sigma_i) = \text{sgn}(\sigma_0)$, 则 Y_i 与 Y_0 呈现正关联, 表示 Y_i 对 Y_0 起加强作用; 若 $\text{sgn}(\sigma_i) = -\text{sgn}(\sigma_0)$, 则说明 Y_i 与 Y_0 呈现负关联, 表示对 Y_0 起削弱作用, 其中 $i = 1, 2, \dots, 9$ 。sgn(x) 为符号函数。对丹参水溶性成分中 $Y_i (i = 1, 2, \dots, 9)$ 与 Y_0 间的关联度及关联极性进行分析, 结果见表 6。

结果表明, 丹参水溶性成分对相对血管增长率

表 6 丹参水溶性成分 $Y_i (i = 1, 2, \dots, 9)$ 与 Y_0 间的关联度及关联极性

Table 6 Correlation degree and correlation polarity of *S. miltiorrhiza* water-soluble component $Y_i (i = 1, 2, \dots, 9)$ and Y_0

Y_i	关联度及关联极性	
	相对血管增长率	相对心脏修复率
1	(+) 0.780 8	(+) 0.823 8
2	(+) 0.616 3	(+) 0.650 7
3	(+) 0.707 5	(+) 0.717 9
4	(+) 0.734 1	(+) 0.747 9
5	(+) 0.816 7	(+) 0.844 5
6	(+) 0.762 7	(+) 0.823 9
7	(+) 0.771 5	(+) 0.799 0
8	(+) 0.762 5	(+) 0.824 7
9	(+) 0.693 0	(+) 0.704 0

的影响程度由大到小排序为紫草酸 > 丹参素 > 丹酚酸 E > 丹酚酸 B > 异丹酚酸 B/异丹酚酸 E > 迷迭香酸 > 丹酚酸 H > 丹酚酸 A > 原儿茶醛。

丹参水溶性成分对相对心脏修复率的影响程度由大到小排序为紫草酸 > 异丹酚酸 B/异丹酚酸 E > 丹酚酸 B > 丹参素 > 丹酚酸 E > 迷迭香酸 > 丹酚酸 H > 丹酚酸 A > 原儿茶醛。

3 讨论

中药是一个多成分的非线性复杂体系, 含有大量信息的中药指纹图谱形成了一个巨大的多维信息库, 具有模糊性及灰色性, 利用灰色关联度分析法对中药指纹图谱进行识别, 具有良好的适应性, 近年来被广泛地应用于中药谱-效相关研究领域^[15-16]。灰色关联分析能很好地针对不同药效学指标进行敏感度分析, 可将分析结果定量化, 从而清楚地将各种成分之间的影响程度进行排序。丹参为临床上广泛应用的心血管疾病的治疗药物, 现代研究表明, 丹参水溶性成分具有显著的促血管生成及心脏保护作用, 本研究利用灰色关联度分析方法, 首次建立了丹参水溶性成分促斑马鱼血管生成及心脏保护作用的谱-效关系, 确定了各共有峰所代表的化学成分对促血管生成及心脏保护作用贡献的大小。

经分析可知, 紫草酸对各药效作用均具显著的正相关作用, 且影响程度最大, 提示其为丹参促斑马鱼血管生成和心脏修复的主要药效成分, 可对其进行进一步的药效评价研究, 探讨作用机制, 以期挖掘新药提供新的思路。本实验选取的丹参中 9 种水溶性成分均对促斑马鱼血管增长、心脏保护起增强作用, 且 9 种成分关联度 (药效作用率) 趋势基本一致, 提示丹参的促血管生成和心脏修复作用是相互关联的。

在 9 种成分中, 丹酚酸 B 的相对峰面积约为紫草酸的 10~20 倍, 但丹酚酸 B 与各药效学指标的关联度均弱于紫草酸, 且不同成分对不同药效指标的影响程度也不尽相同, 说明只检测中药中 1 个或多个化学活性成分或指标成分的含量难以全面、客观评价中药质量优劣。

文献研究表明, 丹参素具有显著的促血管生成及心脏保护作用, 其促血管生成作用可能与上调血管内皮生长因子 (VEGF)、基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)、趋化因子受体 4 (CXCR4) 等细胞因子的表达有关^[17]; 其心脏保护作用可能与调节自噬、下调 ATP5G1 基因表达有关^[18]。此外, 丹酚酸 B 可

通过增加心肌组织 VEGF、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 和血红素氧合酶-1 (HO-1) 的表达发挥促血管生成作用^[19]; 可通过影响自噬蛋白, 降低心肌炎症反应和氧化应激, 抑制心肌细胞凋亡, 从而产生心脏保护作用^[20]。对紫草酸的促血管生成及心脏保护作用的研究尚未见报道, 需进行深入研究。本研究对丹参水溶性成分促血管生成及心脏保护作用的谱-效相关性研究, 可为丹参促血管生成及心脏保护作用物质基础的阐明提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 崔国祯, 徐燕玲, 孙安露, 等. 丹参素衍生物对斑马鱼促血管新生作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(6): 795-800.
- [3] 李巧玉, 刘 杨, 包华音. 近 5 年丹参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2014, 16(2): 145-146.
- [4] 宋 凡, 李岳洋, 孙纪元, 等. 丹参素促大鼠心肌细胞及心脏干细胞增殖的作用 [J]. 心脏杂志, 2013, 25(6): 644-648.
- [5] 励 峰, 任 贤, 徐向阳, 等. 丹参多酚酸盐保护体外循环后心脏功能的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(2): 178-182.
- [6] 刘振杰, 史志龙, 王伽伯, 等. 基于化学指纹图谱和抗血小板聚集效价的丹参质量评价 [J]. 分析化学, 2017, 45(5): 693-699.
- [7] 赵渤年, 于宗渊, 丁晓彦, 等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
- [8] 李 岩. 基于生物碱类成分的通痹胶囊谱-效相关评价系统的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [9] 吴 霞, 林 兵, 王忠震, 等. 雷公藤的免疫抑制活性及毒性的谱效关系研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 547-552.
- [10] 王振强, 赵思蕾, 余佳丽, 等. 广藿香不同药用部位挥发油物质基础差异与抗白色念珠菌的相关性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 774-782.
- [11] 李 晶, 沈震亚, 陈 超, 等. 南丹参中酚酸类成分抗氧化活性谱效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2895-2897.
- [12] 林梦雅, 张玉萍, 李 雅, 等. 基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3447-3452.
- [13] 贺 静. 丹参水溶性提取物的物质基础及其体外抗氧化活性研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [14] 杨龙飞, 赵渤年, 丁晓彦, 等. 基于斑马鱼模型的丹参促血管生成及心脏损伤保护作用的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2620-2624.
- [15] 卿勇军, 刘 文, 杜 平, 等. 基于灰色关联度分析戊己丸对胃蛋白酶抑制作用的谱效关系 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3390-3395.
- [16] 胡 露, 张 锦, 蔺良才, 等. 基于谱效关系的头花蓼抑菌作用物质基础研究 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 2037-2040.
- [17] 卫 国, 段佳林, 殷 英, 等. 丹参素和羟基红花黄色素 A 促血管新生及抗大鼠心肌梗死作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2576-2578.
- [18] 孙大伟, 冯丽莎, 高 青, 等. 基于自噬基因 Beclin-1 与 LC3 探讨丹参素对 H/R 大鼠心肌细胞 ATP5G1 表达的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(11): 1493-1497.
- [19] 周 丹, 田 天, 舒 庆, 等. 丹酚酸 B 对大鼠缺血心肌血管再生的促进作用 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5166-5169.
- [20] 刘晓龙, 崔子林, 李 阳, 等. 丹酚酸 B 对脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用 [J/OL]. 中国实验方剂学杂志. [2019-03-20]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191337>.