

芍药甘草汤抗胃溃疡作用的谱效关系[△]

何利^{1*},付志丽¹,熊燕¹,赵坤¹,杨滔¹,杨玲¹,刘文^{2#}(1.贵州护理职业技术学院基础医学部,贵阳 550025;2.贵州医科大学药学院,贵阳 550004)

中图分类号 R289.5;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)06-0693-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.06.08



摘要 目的 研究芍药甘草汤抗胃溃疡作用的谱效关系。方法 制备11批芍药甘草汤,以无水乙醇造模法制备胃溃疡大鼠模型,以胃康灵为阳性对照,考察各批芍药甘草汤对模型大鼠胃组织中防御因子一氧化氮(NO)、表皮生长因子(EGF)、超氧化物歧化酶(SOD)和攻击因子丙二醛(MDA)含量的影响。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》建立11批芍药甘草汤的HPLC指纹图谱并进行相似度评价,通过与混合对照品比对指认共有峰。通过灰色关联分析法分析芍药甘草汤抗胃溃疡作用的谱效关系。结果 11批芍药甘草汤均可显著降低胃溃疡模型大鼠胃组织中MDA的含量,显著增加NO、EGF、SOD的含量($P < 0.01$),对胃溃疡有一定的改善作用。11批样品的图谱中共有23个共有峰,与对照指纹图谱的相似度均大于0.9;通过与混合对照品比对,共指认了7个共有峰,分别为没食子酸(峰5)、芍药内酯苷(峰9)、芍药苷(峰10)、甘草苷(峰12)、芹糖苷甘草苷(峰14)、异甘草苷(峰15)、甘草酸(峰22)。7个指认共有峰和药效指标的平均关联度均大于0.6,其中又以峰22(甘草酸)、峰10(芍药苷)、峰12(甘草苷)的平均关联度较大,分别为0.807、0.772、0.770。结论 芍药甘草汤抗胃溃疡作用是多个成分协同作用的结果,其中甘草酸、芍药苷、甘草苷可能是其主要的药效贡献成分。

关键词 芍药甘草汤;抗胃溃疡;谱效关系;灰色关联分析

Spectrum-effect relationship of anti-gastric ulcer effect of Shaoyao gancao decoction

HE Li¹, FU Zhili¹, XIONG Yan¹, ZHAO Kun¹, YANG Tao¹, YANG Ling¹, LIU Wen²(1. Dept. of Basic Medicine, Guizhou Nursing Vocational College, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the spectrum-effect relationship of anti-gastric ulcer effect of Shaoyao gancao decoction. **METHODS** Eleven batches of Shaoyao gancao decoction were prepared; gastric ulcer model was established by anhydrous ethanol modeling method. Using Weikangling as positive control, the effects of Shaoyao gancao decoction on the contents of defensive factors [nitric oxide (NO), epidermal growth factor (EGF), superoxide dismutase (SOD)] and attack factor [malondialdehyde (MDA)] in gastric tissue of model rats were investigated. HPLC fingerprints of 11 batches of Shaoyao gancao decoction were established and similarity evaluation was performed with *Similarity Evaluation System of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint* (2004A edition); common peaks were identified by comparing with mixed control. The spectrum-effect relationship of Shaoyao gancao decoction against gastric ulcer was analyzed based on the grey correlation analysis. **RESULTS** Eleven batches of Shaoyao ganyao decoction could significantly decrease the content of MDA in gastric tissue, while increased the contents of NO, EGF and SOD in gastric ulcer model rats ($P < 0.01$), and had a certain inhibitory effect on the gastric ulcer. There were 23 common peaks in chromatograms of 11 batches of samples, and the similarity with the control fingerprint was not less than 0.9. By comparing with mixed control, 7 common peaks were identified, namely gallic acid (peak 5), albiflorin (peak 9), paeoniflorin (peak 10), liquiritin (peak 12), isoliquiritin apioside (peak 14), isoliquiritoside (peak 15), glycyrrhizic acid (peak 22). The average correlation degree of 7 identified common peaks and pharmacodynamic indexes were greater than 0.6, of which peak 22 (glycyrrhizic acid), peak 10 (paeoniflorin) and peak 12 (liquiritin) had the largest correlation, and their values were 0.807, 0.772 and 0.770 respectively. **RESULTS** The anti-gastric ulcer effect of Shaoyao gancao decoction is the result of the synergistic effect of multiple components, among which glycyrrhizic acid, paeoniflorin and liquiritin may be the main pharmacodynamic components.

KEYWORDS Shaoyao gancao decoction; anti-gastric ulcer; spectrum-effect relationship; grey correlation analysis

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82060704);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2018]1016)

* 硕士研究生。研究方向:中药新技术与新制剂。E-mail: 614156496@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,硕士。研究方向:中药及民族药新制剂研发。E-mail:642771631@qq.com

胃溃疡是临床十分常见的消化性溃疡之一,是由多种因素引起的胃黏膜肌层坏死性缺损病变^[1]。现代医学普遍认为,胃溃疡的发病机制与胃黏膜中攻击因子与防御因子水平的不平衡有关,因此通过测定攻击因子和防御因子水平可有助于评估胃溃疡的转归情况^[2]。

在中医学中,胃溃疡属于“胃脘痛”范畴^[3]。芍药甘草汤始载于《伤寒论》,原方由白芍和炙甘草两味药按质量比1:1组成,二药相伍,可奏酸甘化阴、调和肝脾、柔筋止痛之效,是古今常用的缓急止痛经方^[4]。现代药理学研究表明,芍药甘草汤具有保护胃黏膜、解除平滑肌痉挛等药理作用,被广泛用于临床治疗以内脏平滑肌过度活动、剧烈痉挛等为特征的疾病,尤以胃溃疡为甚^[5-6]。目前,方中各单味药的化学成分研究较为明确^[7-8],但治疗胃溃疡的药效物质基础尚未见明确报道。各单味药的化学成分研究不能客观、完整地揭示该方药效与各成分之间的联系,无法全面、真实地反映芍药甘草汤抗胃溃疡的药效物质基础。

本课题组前期对芍药甘草汤的提取工艺进行了优化^[9],并证实了其抗胃溃疡的作用^[10]。目前,谱效学已被学者广泛应用于中药活性成分和药理作用关系的研究领域,该法可通过线性或非线性数学处理,将化学指纹图谱与中药药效有机结合,从而挖掘与药效相关的物质基础^[11]。基于此,本研究拟以大鼠胃组织内防御因子一氧化氮(nitric oxide, NO)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和攻击因子丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量为药效指标,考察芍药甘草汤的抗胃溃疡作用;同时,本研究拟建立11批芍药甘草汤的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)指纹图谱,然后通过灰色关联分析法将抗胃溃疡药效指标与指纹图谱信息进行关联,旨在初步探讨芍药甘草汤抗胃溃疡的药效物质基础,为该方的进一步研究应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1260 II型HPLC仪、DAD型紫外-可见检测器(美国Agilent公司),Auy220型电子天平(日本Shimadzu公司),SK8210HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),HH-4型数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司),Spectra MAX Plus 384型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸对照品(批号180213,纯度 $\geq 99.9\%$)、芍药内酯苷对照品(批号180324,纯度 $\geq 99.3\%$)、芹糖异甘草苷对照品(批号181216,纯度 $\geq 98.9\%$)、异甘草苷对照品(批号180826,纯度 $\geq 98.1\%$)、甘草酸对照品(批号181025,纯度 $\geq 98.9\%$)均购自成都植化纯生物技术有限公司;芍药苷对照品(批号110736-201842,纯度 $\geq 99.4\%$)、甘草苷对照品(批号111610-201607,纯度 $\geq 98.1\%$)均购自中国食品药品检定研究院;磷酸盐缓冲液

(批号20190517)购自北京索莱宝科技有限公司;大鼠EGF酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号ZC36425)、大鼠NO ELISA试剂盒(批号ZC 37502)、大鼠MDA ELISA试剂盒(批号ZC 36429)、大鼠SOD ELISA试剂盒(批号ZC36451)均购自上海茁彩生物科技有限公司;10%中性福尔马林固定液(批号190603)购自贵州科伦药业有限公司;苏木精(批号H9627)、伊红Y(批号71014544)、二甲苯(批号10023418)、石蜡(批号69019361)、乙腈(色谱纯)、无水乙醇均购自国药集团化学试剂有限公司;胃康灵(阳性对照,批号201910029,规格0.4 g/粒)购自黑龙江葵花药业股份有限公司;甲醇(色谱纯)购自美国Tedia公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

白芍饮片和炙甘草饮片各11批,分别购自贵州各医药企业或药房,具体来源信息见表1。上述药材经贵州中医药大学周汉华教授鉴定,分别为毛茛科植物芍药*Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根和豆科植物甘草*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎的炮制加工品。

表1 11批芍药甘草汤中芍药饮片和炙甘草饮片的来源信息

编号	来源	批号	
		白芍	炙甘草
S1	贵州一品药业有限公司	170502	A170601
S2	贵州一品药业有限公司	171202	170101
S3	贵州一品药业有限公司	170301	170501
S4	贵州一品药业有限公司	180601	C180310
S5	贵阳云岩百合中西药房	170401	180402
S6	贵阳云岩百合中西药房	170701	180315
S7	贵州同济堂制药有限公司	170801	180501
S8	贵州同济堂制药有限公司	170401	180811
S9	贵州同济堂制药有限公司	180301	180301
S10	贵州芝林大药房零售连锁有限公司	170901	180801
S11	贵州芝林大药房零售连锁有限公司	171101	180315

1.3 实验动物

SPF级SD大鼠84只,雌雄各半,体质量为(220 \pm 20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。

2 方法与结果

2.1 芍药甘草汤抗胃溃疡作用的考察

2.1.1 芍药甘草汤药液的制备 按质量比1:1称取白芍饮片、炙甘草饮片粉末(过四号筛)各200g,加8倍量80%乙醇,回流提取3次,每次1.5h,过滤,合并滤液,减压浓缩,于60℃下干燥至恒定质量,得干浸膏(每1g干浸膏相当于生药总量3.33g),粉碎,于干燥器中保存,备用;临用时,加水超声(功率500W,频率59kHz)45min使溶解,混匀,制成质量浓度为0.32g/mL的药液。

2.1.2 分组 SD大鼠适应性喂养1周后,随机分为对照组、模型组、胃康灵组和不同批次(S1~S11)芍药甘草汤

组,每组6只,雌雄各半。

2.1.3 给药与造模 各给药组大鼠的给药量均以70 kg成人服用药等效剂量的1倍按体表面积换算法进行换算,芍药甘草汤组大鼠灌胃相应药液2.16 g/kg(按生药总量计),胃康灵组大鼠灌胃相应药液0.432 g/kg(溶剂为水),对照组和模型组大鼠灌胃水,每天1次,每次2 mL,连续给药7 d。除对照组外,其余各组大鼠采用无水乙醇造模法造模,于第6天给药后禁食不禁水24 h,于第7天末次给药2 h后灌胃无水乙醇10 mL/kg复制胃溃疡模型。

2.1.4 取样 各组大鼠造模1.5 h后,麻醉,脱颈处死,自胸骨剑突下沿腹中线开腹,取出胃,用生理盐水洗净胃内容物,平铺于玻璃板上,切取胃黏膜中溃疡瘢痕周围组织适量,一部分放入10%中性福尔马林固定液中,固定24 h,待制备苏木精和伊红Y染色病理切片;另一部分用预冷的0.02 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0~7.2,下同)清洗,去除血液并用吸水纸吸干,称定质量,备用。将组织块移入匀浆器中,按质量-体积比1:5加入5~10 mL预冷的磷酸盐缓冲液,充分研磨,得到组织匀浆液。将制备好的组织匀浆液于3 000 r/min离心15 min,取上清液,用于后续检测。

2.1.5 组织病理学观察 取固定24 h后的胃组织,用不同体积分数的乙醇脱水,将已透明的组织块浸入石蜡中完成浸蜡,后续进行包埋、切片、烤片和脱蜡、苏木精-伊红Y染色。以中性树脂封片后,置于显微镜下观察染色结果(图1)。结果显示,对照组大鼠胃黏膜上皮细胞结构完整,黏液细胞及腺体细胞排列紧密整齐,黏膜未见充血、炎症细胞浸润。与对照组比较,模型组大鼠胃黏膜损伤严重,黏膜上皮细胞大面积缺损,黏液细胞受损,

腺体细胞排列紊乱,黏膜充血及炎症细胞浸润现象明显,提示胃溃疡模型复制成功。与模型组比较,11批芍药甘草汤组和胃康灵组大鼠胃黏膜上皮细胞结构较为完整,黏液细胞及腺体细胞脱落受损较少,黏膜充血及炎症细胞浸润现象明显改善,提示胃黏膜受损均能在一定程度上减轻。

2.1.6 胃组织中MDA、NO、EGF、SOD含量检测 按试剂盒说明书使用酶标仪检测大鼠胃组织匀浆液中MDA、NO、EGF、SOD的含量,运用SPSS 23.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果显示,与对照组比较,模型组大鼠胃组织中MDA含量显著升高,NO、EGF、SOD含量均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,11批芍药甘草汤组大鼠胃组织中MDA含量均显著降低($P<0.01$),NO、EGF、SOD含量均显著升高($P<0.01$),且部分批次的效果显著优于胃康灵($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表2。

上述结果表明,11批芍药甘草汤均能在一定程度上减少攻击因子MDA的含量,增加防御因子NO、EGF、SOD的含量,调节了攻击因子和防御因子的动态平衡,对无水乙醇所致胃溃疡有一定的抑制作用。

2.2 11批芍药甘草汤HPLC指纹图谱的建立

2.2.1 芍药甘草汤提取物的制备 按“2.1.1”项下方法制备芍药甘草汤的干浸膏,备用。

2.2.2 溶液的制备 (1)混合对照品溶液:分别取没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为48.20、230.58、822.00、294.70、59.68、31.98、416.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。(2)供试品溶液:精密

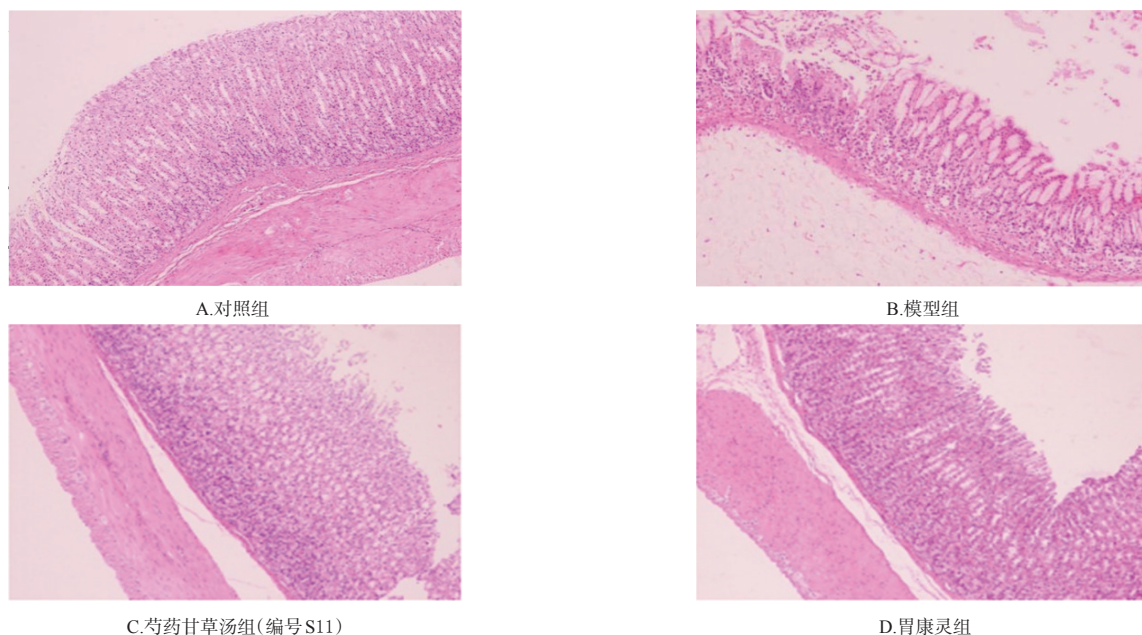


图1 各组大鼠胃组织病理切片的显微镜图(苏木精-伊红Y染色,×100)

表2 各组大鼠胃组织中MDA、NO、EGF、SOD含量的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA/(nmol/mL)	NO/(μ mol/L)	EGF/(pg/mL)	SOD/(ng/mL)
对照组	1.241 ± 0.104	14.048 ± 0.232	78.260 ± 2.314	152.932 ± 10.110
模型组	2.211 ± 0.089 ^{ad}	8.968 ± 0.173 ^{ad}	46.708 ± 2.092 ^{ad}	66.451 ± 2.127 ^a
S1芍药甘草汤组	1.836 ± 0.174 ^{bd}	10.218 ± 0.095 ^{bc}	55.315 ± 6.798 ^{bd}	108.479 ± 6.488 ^{bd}
S2芍药甘草汤组	1.662 ± 0.062 ^b	10.372 ± 0.094 ^b	56.406 ± 5.782 ^{bc}	109.946 ± 5.081 ^{bc}
S3芍药甘草汤组	1.696 ± 0.059 ^b	11.179 ± 0.674 ^b	57.651 ± 1.815 ^b	103.771 ± 8.764 ^{bd}
S4芍药甘草汤组	1.602 ± 0.050 ^b	10.563 ± 0.130 ^b	57.006 ± 1.334 ^b	130.888 ± 4.269 ^{bc}
S5芍药甘草汤组	1.299 ± 0.047 ^{bd}	10.718 ± 0.456 ^b	58.776 ± 1.839 ^b	140.688 ± 8.647 ^{bd}
S6芍药甘草汤组	1.553 ± 0.126 ^{bc}	10.854 ± 0.291 ^b	57.564 ± 4.512 ^b	118.672 ± 2.975 ^b
S7芍药甘草汤组	1.597 ± 0.105 ^b	10.551 ± 0.255 ^b	58.238 ± 3.030 ^b	126.861 ± 11.171 ^b
S8芍药甘草汤组	1.596 ± 0.055 ^b	10.337 ± 0.645 ^b	54.103 ± 2.638 ^{bd}	128.646 ± 4.261 ^b
S9芍药甘草汤组	1.603 ± 0.070 ^b	10.829 ± 0.354 ^b	57.513 ± 0.860 ^b	117.195 ± 7.626 ^b
S10芍药甘草汤组	1.824 ± 0.073 ^{bc}	10.131 ± 0.454 ^{bd}	57.979 ± 2.981 ^b	112.228 ± 4.081 ^b
S11芍药甘草汤组	1.757 ± 0.075 ^b	10.597 ± 0.282 ^b	57.642 ± 5.428 ^b	119.209 ± 6.188 ^b
胃康灵组	1.673 ± 0.079 ^b	10.786 ± 0.177 ^b	61.436 ± 0.928 ^b	121.356 ± 11.692 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与胃康灵组比较, $P < 0.05$; d: 与胃康灵组比较, $P < 0.01$

称取芍药甘草汤提取物 0.6 g, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 轻轻振荡摇匀后称定质量, 超声(功率 500 W, 频率 59 kHz)处理 45 min, 放冷后再次称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 以 Diamonsil C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱, 以乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B) 为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 10% A→13% A; 5~11 min, 13% A→14% A, 11~20 min, 14% A→16% A; 20~25 min, 16% A→18% A; 25~27 min, 18% A; 27~28 min, 18% A→20% A; 28~34 min, 20% A; 34~40 min, 20% A→30% A; 40~50 min, 30% A→40% A; 50~60 min, 40% A→55% A); 检测波长依次为 285 nm (0~7 min)、230 nm (7~35 min)、360 nm (35~46 min)、258 nm (46~60 min); 流速为 1 mL/min; 柱温为 35 °C; 进样量为 10 μ L。

2.2.4 精密度考察 取同一芍药甘草汤供试品溶液(编号 S11), 按“2.2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 以甘草酸峰(因甘草酸峰分离良好且在各批次样品中出峰稳定)为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示, 各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 均不高于 2.90% ($n=6$), 表明本方法精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 取同一芍药甘草汤供试品溶液(编号 S11), 分别于室温下放置 0、2、4、6、12、24 h 时按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 以甘草酸峰为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示, 各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 均不高于 2.89% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 重复性考察 取同一批芍药甘草汤提取物(编号 S11), 按“2.2.2(2)”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 以甘草酸峰为参照峰(S), 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果显示, 各共有峰相对峰面积和相对保留时间的 RSD 均不高于 2.70% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.7 指纹图谱的建立 取 11 批白芍饮片、炙甘草饮片, 按“2.2.1”项下方法制备提取物, 再按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液, 分别取 10 μ L 按“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》, 以 S1 样品图谱为参照图谱, 将时间窗宽度设为 0.1 s, 采用多点校正法进行全峰匹配以生成叠加指纹图谱, 采用中位数法生成对照指纹图谱(R), 详见图 2。图 2 显示, 11 批样品图谱中共有 23 个共有峰。

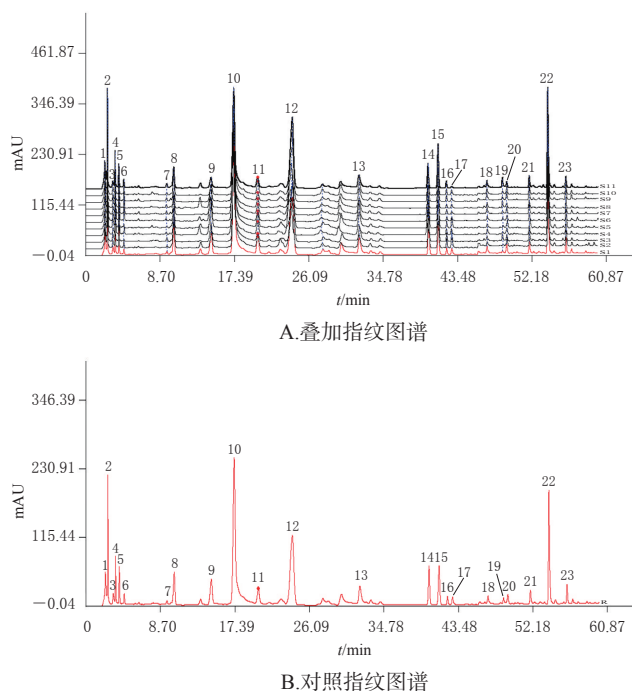
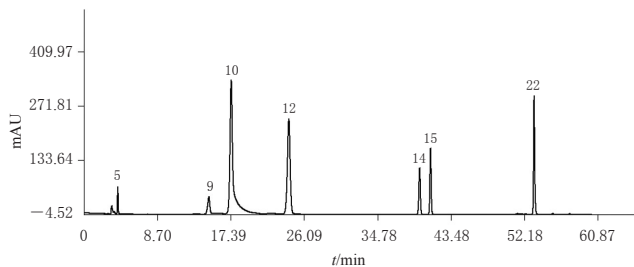


图2 11批芍药甘草汤的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱

2.2.8 共有峰指认 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图(图 3)。通过对比混合对照品图谱与对照指纹图谱中各成分峰的保留时间, 共指认出 7 个共有峰, 分别为没食子酸(峰 5)、芍药内酯苷(峰 9)、芍药苷(峰 10)、甘草苷(峰 12)、芹糖异甘草苷(峰 14)、异甘草苷(峰 15)、甘草酸(峰 22)。

2.2.9 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)》对 11 批芍药甘草汤的指纹图谱进行相似度评价。结果显示, 11 批样品的色谱图与对照指纹图谱的相似度均大于 0.9, 详见表 3。这说明 11 批样品化学成分的一致性良好。



5:没食子酸;9:芍药内酯苷;10:芍药苷;12:甘草苷;14:芹糖异甘草苷;15:异甘草苷;22:甘草酸

图3 混合对照品溶液的HPLC图

表3 11批芍药甘草汤的相似度评价结果

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	R
S1	1.000	0.978	0.985	0.976	0.973	0.973	0.986	0.982	0.993	0.994	0.988	0.987
S2	0.978	1.000	0.990	0.979	0.985	0.978	0.989	0.983	0.974	0.981	0.962	0.991
S3	0.985	0.990	1.000	0.987	0.990	0.983	0.995	0.990	0.981	0.989	0.975	0.996
S4	0.976	0.985	0.987	1.000	0.993	0.987	0.985	0.991	0.961	0.983	0.948	0.989
S5	0.973	0.989	0.990	0.993	1.000	0.991	0.991	0.995	0.963	0.983	0.952	0.995
S6	0.973	0.978	0.983	0.987	0.991	1.000	0.989	0.990	0.962	0.981	0.957	0.991
S7	0.986	0.989	0.895	0.985	0.991	0.989	1.000	0.991	0.985	0.991	0.978	0.999
S8	0.982	0.983	0.990	0.991	0.995	0.990	0.991	1.000	0.969	0.986	0.963	0.994
S9	0.993	0.974	0.981	0.961	0.963	0.962	0.985	0.969	1.000	0.988	0.993	0.983
S10	0.994	0.981	0.989	0.983	0.983	0.981	0.991	0.986	0.988	1.000	0.981	0.992
S11	0.988	0.962	0.975	0.948	0.952	0.957	0.978	0.963	0.993	0.981	1.000	0.976
R	0.978	0.991	0.996	0.989	0.995	0.991	0.999	0.994	0.983	0.992	0.976	1.000

2.3 芍药甘草汤抗胃溃疡作用的谱效关系

2.3.1 抗胃溃疡指标的数据转化 将“2.1.6”项下各组大鼠胃组织中攻击因子MDA和防御因子NO、EGF、SOD含量按下式进行数据转化:MDA抑制率=[(模型组含量-芍药甘草汤组含量)/模型组含量]×100%;NO、EGF、SOD促进率=[(芍药甘草汤组含量-模型组含量)/芍药甘草汤组含量]×100%,结果见表4。

表4 芍药甘草汤抗胃溃疡指标的数据转化结果

组别	MDA抑制率/%	NO促进率/%	EGF促进率/%	SOD促进率/%
S1芍药甘草汤组	16.96	12.23	15.56	38.74
S2芍药甘草汤组	24.83	13.54	17.19	39.56
S3芍药甘草汤组	23.29	19.78	18.98	35.96
S4芍药甘草汤组	27.54	15.10	18.06	49.23
S5芍药甘草汤组	41.25	16.33	20.53	52.77
S6芍药甘草汤组	29.76	17.38	18.86	44.00
S7芍药甘草汤组	27.77	15.00	19.80	47.62
S8芍药甘草汤组	27.82	13.24	13.67	48.35
S9芍药甘草汤组	27.50	17.19	18.79	43.30
S10芍药甘草汤组	17.50	11.48	19.44	40.79
S11芍药甘草汤组	20.53	15.37	18.97	44.26

2.3.2 灰色关联分析 采用均值法对原始数据进行无量纲化处理^[12]。分别以11批芍药甘草汤对胃溃疡模型大鼠胃组织中攻击因子MDA的抑制率和防御因子NO、SOD、EGF的促进率作为参考序列 $X_0(k)$,取对应批次芍药甘草汤HPLC指纹图谱指认的7个共有峰的相对峰面积作为比较序列 $X_i(k)$ (i 表示共有峰编号),代入下式计算参考序列与比较序列的灰色关联系数: $\zeta_{0i}(k) =$

$\frac{\Delta(\min)+\rho\Delta(\max)}{\Delta_{0i}(k)+\rho\Delta(\max)}$,其中 $\Delta_{0i}(k)=|X_0(k)-X_i(k)|$,分辨系数 ρ 为0.5^[13]。然后,再计算灰色关联度(r),即为参考序列与比较序列的灰色关联系数 $\zeta_{0i}(k)$ 的平均值^[14]。各个药效指标 r 的均值,即为相应成分的平均关联度,结果见表5。

表5 芍药甘草汤中7个指认共有峰与抗胃溃疡药效指标的关联度结果

峰号	成分	r				平均关联度	归属	排序
		MDA	NO	EGF	SOD			
5	没食子酸	0.635	0.655	0.555	0.573	0.605	芍药	7
9	芍药内酯苷	0.630	0.679	0.634	0.588	0.633	芍药	6
10	芍药苷	0.731	0.798	0.799	0.758	0.772	芍药	2
12	甘草苷	0.729	0.816	0.787	0.749	0.770	炙甘草	3
14	芹糖异甘草苷	0.717	0.760	0.644	0.738	0.715	炙甘草	5
15	异甘草苷	0.686	0.779	0.748	0.680	0.723	炙甘草	4
22	甘草酸	0.769	0.790	0.848	0.819	0.807	炙甘草	1

根据灰色关联分析结果可知,芍药甘草汤指纹图谱中指认的7个共有峰与药效指标间的平均关联度均大于0.6,表明各指认共有峰与药效指标间均有关联性^[15],平均关联度由高到低依次为:甘草酸(峰22)>芍药苷(峰10)>甘草苷(峰12)>异甘草苷(峰15)>芹糖异甘草苷(峰14)>芍药内酯苷(峰9)>没食子酸(峰5),其中与药效指标关联性最强的前3位分别为甘草酸(峰22)、芍药苷(峰10)、甘草苷(峰12),其平均关联度均大于0.75。结果表明,芍药甘草汤的抗胃溃疡活性可能并非某单一成分的作用,而是多成分协同起效的结果,其中又以甘草酸(峰22)、芍药苷(峰10)、甘草苷(峰12)对药效活性的贡献最大,提示这3个成分可能是芍药甘草汤发挥抗胃溃疡作用的主要药效贡献成分。

3 讨论

本课题组前期对检测波长进行考察发现,由于芍药甘草汤成分复杂,单一波长难以全面体现所有成分的特征,故在全波长扫描的基础上,采用波长切换法着重考察了285、230、360、258 nm波长下的色谱信息。结果显示,在本实验波长切换条件下,检测到的色谱峰较多,基线较稳定,色谱信息较为全面,更有利于进行后续的谱效关系分析。

胃溃疡是临床十分常见的消化性溃疡之一,病因复杂。现代医学普遍认为,胃黏膜保护因子与攻击因子的失衡是胃溃疡的重要发病机制^[2]。本研究对胃黏膜攻击因子和防御因子进行了筛选:众多研究表明,氧化应激反应与胃溃疡发生的病理生理机制密切相关^[16-17],其中MDA是氧自由基作用与脂质过氧化反应降解所形成的产物,可直接损伤胃黏膜,是导致胃溃疡损伤的重要攻击因子之一;SOD可对氧自由基进行清除,从而抑制因

氧自由基与多价不饱和脂肪酸结合形成MDA对胃黏膜细胞的损伤作用,是胃黏膜的重要保护因子^[18];胃溃疡在发生及愈合过程中涉及胃黏膜组织损伤、血管新生、上皮组织重构等过程,EGF作为胃黏膜防御因子的代表,不仅能抑制胃酸分泌和胃黏膜细胞凋亡,还能促进黏膜血管再生,并诱导上皮细胞合成,从而保护胃黏膜不受攻击因子的损伤^[19];充足的胃黏膜血流对胃黏膜的防御机制十分重要,NO作为血管调节因子,可舒张血管,增加胃黏膜血流量,从而输送更多的营养物质,为上皮损伤的重建提供能量,以维持胃黏膜的完整性并促进急性损伤的愈合^[20]。因此,本研究选择攻击因子MDA和防御因子SOD、NO、EGF作为抗胃溃疡程度的评价指标,以更全面反映芍药甘草汤的药效,并利于后续开展谱效关系分析。

芍药甘草汤作为古代经典名方之一,既往临床研究已证实其具有较好的抗胃溃疡作用^[5-6],然而尚未有研究对其具体的抗胃溃疡物质进行深入剖析和探索。单一的药效学或者指纹图谱研究都难以阐明其抗胃溃疡的药效物质基础,故本研究对其药效指标和指纹图谱的相关性进行了探讨,以进一步揭示其内在的药效物质基础。本研究结果显示,从芍药甘草汤中指认的7个共有峰与4个抗胃溃疡活性指标均有关联性(平均关联度>0.6),提示中药作为一个极其复杂的化合物体系,其治疗作用的发挥很有可能是几个成分甚至几类成分共同作用的结果;其中又以峰22、峰10、峰12的平均关联度较大,具有较强的关联性(平均关联度>0.75),提示甘草酸、芍药苷、甘草苷可能是芍药甘草汤发挥抗胃溃疡作用的主要药效贡献成分。但是本实验仅指认了7个共有峰,有待后续进一步研究。

综上所述,本研究成功建立了芍药甘草汤抗胃溃疡的谱效关系,可为该方的抗胃溃疡药效物质基础研究提供参考,也可为后期深入研究芍药甘草汤的临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 巩子汉,王玉,王艳威,等.基于网络药理学的白及治疗胃溃疡的作用研究[J].中国临床药理学杂志,2020,36(17):2714-2716,2720.
- [2] 蒙晓冰,薛皓方,刘锐,等.半夏泻心汤加减治疗胃溃疡肝气犯胃证的疗效及对患者黏膜攻击和保护因子的影响[J].时珍国医国药,2020,31(3):624-627.
- [3] 魏广义,刘楠楠,王淑美,等.抗胃溃疡中药实验研究进展[J].中药药理与临床,2020,36(5):228-232.
- [4] 陈平,曾瑾,杨安东,等.古代经典名方芍药甘草汤的处方及关键信息考证[J/OL].中药药理与临床:1-20[2022-02-09]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20210524.001>.
- [5] 褚雪菲,刘道龙,韩广明.芍药甘草汤合一贯煎加减治疗慢性萎缩性胃炎胃阴不足证的影响[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(18):107-112.
- [6] 何利,刘巍,王冠华,等.基于正交试验优选芍药甘草汤胃漂浮缓释片处方工艺研究[J].亚太传统医药,2020,16(1):62-65.
- [7] 梁文娟,尹迪,郗建宇,等.美丽芍药根中黄酮类成分及其生物活性[J].中成药,2021,43(2):399-403.
- [8] 崔园园,周永峰,马艳芹,等.基于UPLC-Q-TOF-MS法分析生、炙甘草中化学成分的差异性[J].中国药房,2020,31(9):1049-1053.
- [9] 杜平,刘文,卿勇军,等.不同评价指标对芍药甘草汤提取工艺优化的影响[J].中成药,2018,40(10):2188-2193.
- [10] 刘文,杜平,卿勇军,等.基于“药辅合一”的芍药甘草胃漂浮片对急性胃溃疡家兔的药效及机制研究[J].中草药,2019,50(3):647-652.
- [11] 张小艺,刘久石,高石曼,等.中药谱效关系的研究方法及应用进展[J].中国中药杂志,2019,44(20):4405-4411.
- [12] 王莹,吴红杰,管庆霞,等.基于灰色关联分析法探索芍药甘草汤对癫痫小鼠脑保护作用的谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(16):56-62.
- [13] 冯月,段飞鹏,李一圣,等.不同产地金钗石斛醇提物HPLC指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究[J].中国药房,2021,32(15):1825-1830.
- [14] 刘婧,黄潇,付小梅,等.基于主成分因子加权和灰色关联分析法的栀子利胆作用谱效关系分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(14):135-142.
- [15] 林婧,梁洁,黄春燕,等.壮药华佗豆不同极性部位HPLC指纹图谱的建立及其镇痛抗炎作用的谱效关系[J].中国药房,2021,32(17):2079-2084.
- [16] CHEN P, SHEN Y, SHI H, et al. Gastroprotective effects of Kangfuxin-against ethanol-induced gastric ulcer via attenuating oxidative stress and ER stress in mice[J]. *Chen Biol Interact*, 2016, 260:75-83.
- [17] 万军,包奇昌.去氢吴茱萸碱对实验性胃溃疡大鼠胃黏膜的保护作用及机制研究[J].中草药,2020,51(18):4698-4703.
- [18] 李丽.基于“TLRs信号通路”观察不同配穴对预防应激性胃溃疡“调衡防控”的分子机制研究[D].长春:长春中医药大学,2021.
- [19] 禄保平,张留巧,巴明玉.毛德西安胃清幽方对胃溃疡模型大鼠溃疡愈合质量的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(2):368-370.
- [20] 金佳熹,周冰玉,李柳蓉,等.新鲜山药提取物对小鼠胃溃疡的预防作用研究[J].中国比较医学杂志,2020,30(3):8-13.

(收稿日期:2021-11-01 修回日期:2022-02-10)

(编辑:邹丽娟)