

通过两种方法评价气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分对胃溃疡模型大鼠的影响^A

吴寅萍^{1*}, 王 帅¹, 孟宪生^{1#}, 包永睿¹, 潘 英², 韩 凌²(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁本溪三药有限公司, 辽宁 本溪 117004)

中图分类号 R285.5; R573 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2116-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.02

摘 要 目的: 通过传统方法和灰度图像分析法研究气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分对胃溃疡模型大鼠溃疡指数的影响。方法: 采用正交设计[$L_{16}(2^{15})$], 2个水平、15个因素对气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分作用的主次及两两交互作用进行初步研究。实验分为16组, 各组大鼠分别给予不同抗胃溃疡有效组分的组合, 应用传统方法和灰度图像分析法综合观察大鼠用药后的溃疡指数。以SPSS19.0统计软件对两种方法经对数转化后进行相关性分析。结果: 各有效组分抗胃溃疡效应大小依次为甘草黄酮>甘草三萜>柴胡皂苷>延胡索生物碱。Pearson简单相关系数 $r=0.997$, 双侧检验 $P=0.000$, 在0.01水平上, 两种方法之间具有显著的正相关性。结论: 气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分对胃溃疡模型大鼠的主次及两两交互作用的研究可通过控制主要作用组分的含量从而有效地控制气滞胃痛颗粒的质量。

关键词 传统方法; 灰度图像分析法; 溃疡指数; 胃溃疡模型; 大鼠

Effects of Anti-gastric Ulcer Effective Components in Qizhi Weitong Granules on Gastric Ulcer Model Rats Based on Two Evaluation Methods

WU Yin-ping¹, WANG Shuai¹, MENG Xian-sheng¹, BAO Yong-rui¹, PAN Ying², HAN Ling²(1. College of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China; 2. Liaoning Benxi Third Pharmaceutical Company Limited, Liaoning Benxi 117004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of anti-gastric ulcer effective components in Qizhi weitong granules on the ulcer index of gastric ulcer model rats by traditional method and gray-scale images analysis method. METHODS: The functional order and interaction between any two factors of anti-gastric ulcer effective components in Qizhi weitong granules were studied preliminarily by $L_{16}(2^{15})$ orthogonal design (2 levels, 15 factors). The rats were divided into 16 groups, and they were given different combinations of anti-gastric ulcer effective components. The ulcer index of the rats after medication was observed through traditional method and gray-scale image analysis method. Correlation analysis of two methods was conducted after logarithmic transformation using SPSS19.0 software. RESULTS: Glycyrrhiza flavonoids had the most prominent anti-gastric ulcer effect among anti-gastric ulcer effective components in Qizhi weitong granules followed by glycyrrhiza triterpenoid, saikosaponin and corydalis alkaloid. Pearson simple correlation coefficient was 0.997 ($P=0.000$). There was significant positive correlation between two methods ($P=0.01$). CONCLUSIONS: The studies on the functional order and the interaction between any two factors of anti-gastric ulcer effective components in Qizhi weitong granules can control the quality of Qizhi weitong granules effectively by controlling the contents of main active components.

KEY WORDS Traditional method; Gray-scale image analysis method; Ulcer index; Gastric ulcer model; Rats

气滞胃痛颗粒是国家基本药物, 由柴胡、香附(炙)、白芍、枳壳、延胡索(炙)、甘草(炙)6味药组成, 具有舒肝行气、和胃止痛的功效, 在临床上可用于肝郁气滞、胸痞胀满、胃脘疼痛等证的治疗, 具有抗溃疡、抗炎镇痛和促胃动力三个主要作用^[1-4]。目前, 国内外文献并未对气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分作用的主次及其两两交互作用作明确的表述。在前期的组分富集及体内、外药效筛选研究工作中, 本课题组对气滞胃痛颗粒中6味药的有效物质组分别进行了筛选、提取、纯

化和富集, 得到各组分的纯度均在70%以上, 并对各组分的抗胃溃疡作用进行了初步药效研究, 筛选出具有抗胃溃疡作用的有效组分, 包括甘草黄酮、甘草三萜、柴胡皂苷和延胡索生物碱, 将这4个组分作为一个整体组成对其进行抗胃溃疡作用的主次及两两交互作用研究^[5-8]。

本研究采用正交设计, 分别给予大鼠不同的抗胃溃疡有效组分的组合, 应用传统方法和灰度图像分析法^[9-12]综合评价大鼠用药后的溃疡指数, 为进一步考察气滞胃痛颗粒抗胃溃疡的作用机制及质量控制提供一定参考^[13-15]。

1 材料

1.1 仪器

HSS型电子恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); Milli-Q型超纯水处理装置(美国Millipore公司); ACCULAB ALC-11C4型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)

^A 基金项目: 国家科技重大专项课题资助(No.2010ZX09401-304-201)

* 硕士研究生。研究方向: 生药学药物分析。电话: 0411-87406496。E-mail: 670040117@qq.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物分析。电话: 0411-87406496。E-mail: mxsvvv@126.com

有限公司];Kodak N137 型数码相机(美国伊士曼柯达公司);Image J 医学图像分析软件(美国国立卫生研究院)。

1.2 药材

甘草、柴胡、延胡索药材均购自辽宁本溪三药有限公司,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

气滞胃痛颗粒(辽宁本溪三药有限公司,批号:20111123);奥美拉唑肠溶胶囊(哈药集团三精制药诺捷有限责任公司,批号:100430327);所用试剂均为分析纯。

1.4 动物

健康SD大鼠200只,♀,体质量(200±20)g,由大连医科大学实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(辽)2008-0002]。

2 方法

2.1 组分的制备

甘草黄酮、甘草三萜、柴胡皂苷和延胡索生物碱均由本课题组提取、纯化和富集,纯度分别为88.3%、90.5%、70.3%、71.8%。

2.2 组分组合的正交设计

试验选用L₁₆(2¹⁵)正交设计表,即进行16组试验,2个水平,15个因素(其中,4个因素为主效应列,6个因素为两两交互作用列),交互作用表示为如A与B交互作用,即表示为AB。根据正交设计表中主效应的水平配成16种不同组合的配方,如第1组4个效应列均为1水平,配成不含任何组分的配方,第16组为ABCD 4个组分混合的配方。正交设计1~16组给药情况如下:1组,等量生理盐水;2组,A₁B₁C₁D₁;3组,A₁B₁C₂D₁;4组,A₁B₁C₂D₂;5组,A₁B₂C₁D₁;6组,A₁B₂C₁D₂;7组,A₁B₂C₂D₁;8组,A₁B₂C₂D₂;9组,A₂B₁C₁D₁;10组,A₂B₁C₁D₂;11组,A₂B₁C₂D₁;12组,A₂B₁C₂D₂;13组,A₂B₂C₁D₁;14组,A₂B₂C₁D₂;15组,A₂B₂C₂D₁;16组,A₂B₂C₂D₂。表头设计见表1。

表1 表头设计

Tab 1 Headers design

因子	A	B	AB	C	AC	BC	-	D	AD	BD	-	CD	-	-	-
列号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

2.3 分组与给药

200只大鼠按体质量随机均分成20组,即空白(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、气滞胃痛颗粒(0.675 g/kg)、奥美拉唑(0.005 4 g/kg)与正交设计16组。ig给药,每天1次,连续15 d。

根据气滞胃痛颗粒中抗溃疡有效组分剂量与试验的可操作性确定药物的因素数与水平数,气滞胃痛颗粒中抗溃疡有效组分为因素[甘草黄酮(A)、甘草三萜(B)、柴胡皂苷(C)、延胡索生物碱(D)],取给药和不给药2个水平,各组分给药剂量按生药量折算。因素与水平见表2。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A,g/kg	B,g/kg	C,g/kg	D,g/kg
水平1	0	0	0	0
水平2	0.0117	0.045	0.072	0.045

2.4 复制模型

大鼠从给药第14天开始禁食不进水24 h,第15天ig给药1 h后ig无水乙醇(1 ml/只),以复制胃溃疡模型。

2.5 指标的测定

大鼠ig无水乙醇1 h后摘眼球取血,分离血清备用,脱颈椎处死大鼠,结扎胃贲门和幽门,并经胃壁向胃腔内注入中性福尔马林溶液5 ml,将胃取出,放入中性福尔马林溶液中固定15 min,沿胃大弯剪开胃壁,测量各组溃疡指数,同时计算溃疡抑制百分率[(模型组溃疡指数-用药组溃疡指数)/模型组溃疡指数×100%]。

2.6 溃疡指数计算方法

2.6.1 传统方法 将在福尔马林中固定好的胃组织取出,展平,直尺测量溃疡损伤长度:胃黏膜层条索状损伤的长度大于1 mm者测量其长度,每1 mm计1分,若宽度超过1 mm者将其计分加倍,计分总数为该大鼠的溃疡指数。

2.6.2 灰度图像分析法 应用Image J软件测定溃疡指数。

2.7 统计学方法

利用SPSS19.0统计软件对两法经对数转化后所得两组数据进行相关性分析,计算Pearson简单相关系数,并评价其相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 溃疡指数计算结果

溃疡指数计算结果见表3。

表3 溃疡指数计算结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The results of ulcer index($\bar{x} \pm s$)

组别	传统方法		灰度图像分析法	
	溃疡指数,mm	抑制率,%	溃疡指数,mm	抑制率,%
空白组	0		0	
模型组	8.58±0.53	0	2.81±0.26	0
气滞胃痛颗粒组	2.74±0.53	68.07*	0.91±0.26	67.62*
奥美拉唑组	2.58±0.41	69.93*	0.84±0.52	70.11*
正交设计1组	7.65±0.41	10.84*	2.53±1.35	9.96*
正交设计2组	5.41±0.39	36.95*	1.77±1.04	37.01*
正交设计3组	4.08±0.45	52.45*	1.32±0.30	53.02*
正交设计4组	4.82±0.52	43.82*	1.57±0.21	44.13*
正交设计5组	4.19±0.42	51.17*	1.35±0.24	51.96*
正交设计6组	4.37±0.47	49.07*	1.41±0.57	49.82*
正交设计7组	3.08±0.24	64.10*	1.03±1.20	63.35*
正交设计8组	3.84±0.28	55.24*	1.28±1.18	54.45*
正交设计9组	3.13±0.29	63.52*	1.14±1.79	59.43*
正交设计10组	3.60±0.23	58.04*	1.18±0.99	58.01*
正交设计11组	3.27±0.56	61.89*	1.09±0.91	61.21*
正交设计12组	3.64±0.59	57.58*	1.20±0.34	57.30*
正交设计13组	2.61±0.86	69.58*	0.86±1.04	69.40*
正交设计14组	3.46±0.71	59.67*	1.15±0.87	59.07*
正交设计15组	2.20±0.57	74.36*	0.76±0.90	72.95*
正交设计16组	4.49±0.98	47.67*	1.50±0.24	46.62*

与模型组比较: * $P<0.05$

vs.model group: * $P<0.05$

3.2 直观分析方法

溃疡指数计算结果的直观分析(传统方法)见表4。表中K1和K2分别表示水平1下和水平2下溃疡指数之和的平均数,R为极差,即K1与K2之差的绝对值,R值的大小表明各因素抗胃溃疡作用的显著程度。

3.3 方差分析

方差分析结果见表5。

表4 溃疡指数计算结果的直观分析(传统方法)

Tab 4 Direct analysis of the results of ulcer index (traditional method)

因素	列号	传统方法			灰度图像分析法		
		K1	K2	R	K1	K2	R
A	1	4.680	3.300	1.380	1.532	1.117	0.415
B	2	4.450	3.530	0.920	1.482	1.167	0.315
AB	3	4.340	3.640	0.700	1.433	1.218	0.215
C	4	4.303	3.678	0.625	1.424	1.226	0.198
AC	5	4.402	3.578	0.824	1.459	1.191	0.268
BC	6	4.175	3.805	0.370	1.399	1.251	0.148
-	7	4.120	3.860	0.260	1.371	1.279	0.092
D	8	3.776	4.204	0.428	1.260	1.390	0.130
AD	9	4.274	3.706	0.568	1.415	1.235	0.180
BD	10	4.286	3.694	0.592	1.427	1.222	0.205
-	11	3.999	3.981	0.018	1.325	1.325	0.000
CD	12	4.296	3.684	0.612	1.436	1.214	0.222
-	13	4.129	3.851	0.278	1.364	1.286	0.078
-	14	4.044	3.936	0.108	1.356	1.294	0.062
-	15	4.236	3.744	0.492	1.396	1.254	0.142

表5 方差分析结果

Tab 5 The results of ANOVA

方差来源	传统方法					灰度图像分析法				
	离差平方和	自由度	均方	F	P	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	7.618	1	7.618	23.863	0.005	0.714	1	0.714	22.296	0.005
B	3.386	1	3.386	10.606	0.023	0.378	1	0.378	11.810	0.019
AB	1.960	1	1.960	6.140	0.046	0.198	1	0.198	6.183	0.045
C	1.562	1	1.562	4.895	0.078	0.168	1	0.168	5.249	0.071
AC	2.722	1	2.722	8.529	0.033	0.270	1	0.270	8.443	0.034
BC	0.548	1	0.548	1.715	0.247	0.096	1	0.096	3.001	0.144
D	0.731	1	0.731	2.290	0.191	0.060	1	0.060	1.874	0.229
AD	1.288	1	1.288	4.036	0.101	0.119	1	0.119	3.717	0.112
BD	1.404	1	1.404	4.399	0.090	0.181	1	0.181	5.640	0.064
CD	1.501	1	1.501	4.701	0.082	0.185	1	0.185	5.774	0.061

3.4 两种评价方法间的相关性分析

利用SPSS19.0统计软件对A法与B法经对数转化后所得两组数据进行相关性分析,计算得Pearson简单相关系数 $r=0.997$,双侧检验 $P=0.000$,在0.01水平上,两种方法之间具有显著的正相关性。

综合两种评价方法,直观分析结果表明:各有效组分抗胃溃疡效应大小依次为A(甘草黄酮)>B(甘草三萜)>C(柴胡皂苷)>D(延胡索生物碱)。正交设计表中两两交互作用有6列,传统方法表明两两交互作用大小依次为AC>AB>CD>BD>AD>BC,灰度图像分析法表明两两交互作用大小依次为AC>CD>AB>BD>AD>BC,进一步做方差分析。方差分析结果表明:A(甘草黄酮)和B(甘草三萜)有显著抗胃溃疡作用,C(柴胡皂苷)和D(延胡索生物碱)抗胃溃疡作用不显著。虽然柴胡皂苷抗胃溃疡作用不显著,但两两交互作用列中A(甘草黄酮)和D(柴胡皂苷)合用对抗胃溃疡有促进作用,A(甘草黄酮)和B(甘草三萜)合用也具有一定的抗胃溃疡作用,其余列两两交互作用影响甚小。D(延胡索生物碱)抗胃溃疡作用不显著,两两交互作用列中与其他药合用抗胃溃疡作用也不显著。直观分析和方差分析的结果基本一致。

4 讨论

正交试验设计是一种利用正交表安排多因素多水平试验,并用统计分析考察结果。本研究采用均匀分散、整齐可

比、计算简便的方式分析从气滞胃痛颗粒中得到的4个抗胃溃疡有效组分复方作用的主次及其两两交互作用。与各试验因素、各水平的全搭配试验相比,可减少试验次数,提高试验效率,迅速得到较理想的实验结果。

本研究采用传统方法和灰度图像分析法两种方法综合评价胃溃疡模型大鼠的溃疡指数。相关性分析结果显示,两种溃疡指数分析方法具有很大的相关性。其中,灰度图像分析法通过Image J医学图像分析软件来计算溃疡指数,与目测的传统方法相比更加科学客观地评价溃疡指数,具有一定的可信度。

结合直观分析与方差分析结果,气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分作用的主次依次为甘草黄酮>甘草三萜>柴胡皂苷>延胡索生物碱。对两两交互作用进行初步研究,甘草黄酮和柴胡皂苷合用对抗胃溃疡有促进作用,甘草黄酮和甘草三萜合用也具有一定的抗胃溃疡作用,其余列两两交互作用影响甚小。气滞胃痛颗粒中抗胃溃疡有效组分对胃溃疡模型大鼠作用的主次及两两交互作用的研究可以通过控制起主要作用组分的含量从而有效地控制气滞胃痛颗粒的质量,为气滞胃痛颗粒质量控制及其抗胃溃疡作用机制的研究提供理论依据。笔者仅对4个有效组分两两交互作用进行初步研究,至于复杂的交互作用,尚待进一步探讨。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 570.
- [2] 姚东, 孟宪生, 包永睿, 等. 气滞胃痛颗粒镇痛作用研究及机制初探[J]. 中成药, 2012, 34(3): 560.
- [3] 王彦云, 吴振宇, 郑君, 等. 气滞胃痛冲剂药理学实验研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 622.
- [4] 马惠颖. 气滞胃痛颗粒联合用药分析[J]. 中国药师, 2008, 11(2): 234.
- [5] 高雪岩, 王文全. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695.
- [6] 李芳, 李建北, 张东明. 柴胡的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2): 120.
- [7] 王红, 田明, 王森, 等. 延胡索现代药理及临床研究进展[J]. 中医药学报, 2010, 38(6): 108.
- [8] 张继稳, 陈立兵, 葛卫红, 等. 中药物质组相关概念释义[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2008, 10(2): 1.
- [9] Wang S, Bao YR, Meng XS. Evaluation of gastric ulcer model based on gray-scale image analysis[J]. Afr J Microbiol Res, 2011, 5(11): 1285.
- [10] 于海玲, 郭建鹏, 王丹. 老鹳草对小鼠无水乙醇型胃溃疡的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 874.
- [11] 杨苹, 马世平. 复方丹蒲汤抗实验性胃溃疡的作用[J]. 中成药, 2006, 28(3): 391.
- [12] 何雪峰, 李晓辉, 李淑惠, 等. 三七总皂苷对家兔实验性动脉粥样硬化的预防作用[J]. 中国药房, 2007, 18(6): 408.
- [13] 孙红, 杨明, 于德伟, 等. 树舌多糖对大鼠胃黏膜损伤的保护作用[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1546.
- [14] 李备, 刘华蓉, 潘永全, 等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制探讨[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 51.
- [15] 江涛, 唐春萍, 陈艳芬, 等. 高良姜总黄酮对大鼠实验性胃溃疡模型的影响[J]. 中药材, 2009, 32(2): 260.

(收稿日期: 2012-07-24 修回日期: 2012-12-05)