

中药杂志, 2017, 39(3): 272~274.

[10]张慧,李冬霞,栗志勇,等. 芎芷石膏汤对硝酸甘油致偏头痛大鼠血浆 NO, NOS, CGRP 及脑中 5-HT, 5-HIAA 含量的影响. 中国实验方剂学杂志, 2014, 21(17): 175~180.

[11]凌玲. 偏头痛与癫痫的视频脑电图分析研究. 现代诊断与治疗, 2013, 24(10): 2305.

[12]田振华, 黄国华伶, 张翔云, 等. 苗医验方"四大血"抗炎、镇痛作用拆方研究. 亚太传统医药, 2013, 9(3): 12~14.

[13]苏瑾, 唐仕欢, 郭非非, 等. 含白芷方剂组方规律及核心药对"白芷-川芎"分子机制的研究. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1331~1337.

[14]Holland PR, Goadsby PJ. Targeted CGRP small molecule antagonists for acute migraine therapy. Neurotherapeutics, 2018, 15(2): 304~312.

[15]Tassorelli C, Grazzi L, de Tommaso M, et al. Noninvasive vagus nerve

stimulation as acute therapy for? migraine: The randomized PRESTO study. Neurology, 2018, 91(4): e364~e373.

[16]Yao G, Yu T M, Han X M, et al. Therapeutic effects and safety of olcegepant and telcegepant for migraine: A meta-analysis. Neural Regen Res, 2013, 8(10): 938~947.

[17]Zhang X C, Kainz V, Zhao J, et al. Vascular ERK mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. Ann Neurol, 2013, 73(6): 741~750.

[18]Dussor G, Yan J, Xie J Y, et al. Targeting TRP channels for novel migraine therapeutics. ACS Chem Neurosci, 2014, 5(11): 1085~1096.

[19]Xing Y, Ming J, Liu T, et al. Decreased expression of TRPV4 channels in HEI-OC1 cells induced by high glucose is associated with hearing impairment. Yonsei Med J, 2018, 59(9): 1131~1137.

Effect of Miao Medicine Dingtong Decoction on TRPV4 - MAPK Axis in SD Rats with Migraine*

Huang Yuan, Wu Yuanhua, Zhang Donglan, Cao Liping, Liu Shixi, Shao Yong**

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

Objective: To study the effect of Miao medicine decoction on TRPV4-MAPK axis in trigeminocervical complex (TCC) and its mechanism on migraine rats induced by nitroglycerin. **Methods:** 100 SD rats were randomly divided into 5 groups with 20 rats in each: the control group, the model group, the positive control group (6mg/kg sumatriptan) and dingtong groups (5.14 g/kg, 10.28 g/kg). The experimental migraine rat model was replicated by subcutaneous injection of nitroglycerin. The serum 5-hydroxytryptamine (5-HT), calcitonin gene-related peptide (CGRP), interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α) levels were detected by ELISA. The expressions of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and p38 proteins were detected by immunohistochemistry staining (IHC). Levels of TRPV4, p38, p-p38, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2, p-ERK1/2), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p-JNK were determined by western blot and qRT-PCR. **Results:** During 180 min after 3rd injection, the ethological scores of rats in Dingtong 10.28 g/kg group was (142 \pm 30), lower than those in the model group and 5.14 g/kg Dingdong group. The incubation period of rats in 10.28 g/kg group was (14.2 \pm 4.5) min, which was longer than those in the model group and 5.14 g/kg group. The serum levels of 5-HT, CGRP, IL-1 β and TNF- α , the expressions of TRPV4, p38, p-p38, p-ERK1/2, JNK and p-JNK in TCC tissues were significantly higher in 10.28 g/kg group than those in the model group and 5.14 g/kg Dingdong group. **Conclusions:** Miao medicine dingtong decoction on migraine rats has a certain therapeutic effect, its mechanism may be related to the inhibition of TRPV4-MAPK axis in TCC tissues.

Key words Miao medicine dingtong decoction, TRPV4-MAPK axis, migraine rat models, nitroglycerin, trigeminocervical complex

基于 TOPSIS 法综合评价补肾活血方不同极性部位治疗 DR 的效果*

王 芯¹, 邓立萍¹, 谢孟君¹, 张 梅^{1**}, 谢学军^{2**}

(¹成都中医药大学 药学院, 成都 611137; ²成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

摘 要 目的: 基于 TOPSIS 法综合评价补肾活血方不同极性部位对糖尿病视网膜病变(DR)的治疗作用。方法: 依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水提取补肾活血方得到不同极性部位提取物。比较不同极性部位给药后大鼠视网膜消化铺片, 免疫组化法检测 VEGF 和 HIF-1 α 的蛋白表达, ELISA 法测定血浆 AGEs 浓度, 采用 TOPSIS 法综合评价不同极性部位对 DR 的治疗作用。结果: 与空白组比较, 模型组各检测结果均具有显著性差异; 与模型组比较, 各给药组对 DR 大鼠视网膜微血管内皮细胞与周细胞比值明显降低, 血浆 AGEs 浓度明显降低, 视网膜 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达下调。TOPSIS 法综合评价结果显示各不同极性部位

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774202); 四川省科技厅应用基础研究重点项目(2017JY0013)。 ** 通讯作者: 张梅, 教授, 博士生导师, 从事中药及其复方药效物质基础及质量控制研究, Email: zhangmei63@cdutcm.edu.cn; 谢学军, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治眼底病的基础与临床研究, Email: xxj8848@163.com。

给药组得分按高低排序为三氯甲烷组 > 正丁醇组 > 石油醚组 > 乙酸乙酯组 > 水部位组, 表明三氯甲烷部位对 DR 改善效果最佳, 水部位效果最差。结论: 补肾活血方不同极性部位对 DR 有不同程度的改善作用, 其中三氯甲烷部位对 DR 治疗效果最优; 基于 TOPSIS 法可公正、客观地评价补肾活血方不同极性部位治疗 DR 的药效作用。

关键词 补肾活血方; 不同极性部位; DR; 视网膜内皮细胞/周细胞; AGEs; VEGF; TOPSIS

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2019.04.031

糖尿病性视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)是常见的微血管并发症,是成年人最主要的致盲疾病之一,由于其隐匿性和患者观念问题,极有可能成为首位致盲原因^[1-3]。中医药通过益气养阴、补气健脾、滋补肝肾和活血化瘀等法在治疗糖尿病及其并发症方面有着独特的优势,显示出治疗 DR 的广阔前景。大量临床及药理研究表明,由课题组研制的补肾活血方(地黄、丹参、葛根、人参组成)具有防治 DR 作用^[4-9]。

前期课题组对补肾活血方化学成分鉴定结果显示其主要含皂苷类、黄酮类及酚酸类等成分^[10]。对不同极性部位进行了高效液相色谱(HPLC)分析,发现不同极性部位化学成分具有差异,但各极性部位对 DR 的治疗作用大小尚不清楚。因此,为进一步研究该复方防治 DR 的药效物质基础,探讨补肾活血方不同极性部位药效活性,拟对补肾活血方不同极性部位治疗 DR 作用进行比较。逼近理想解排序法(TOPSIS, Technique for order preference by similarity to ideal solution)是通过计算各对象与最优方案、最劣方案的相对距离而进行排序,用于解决多对象多属性决策问题的一种常用方法,已被广泛应用于各个领域^[11,12]。本实验在前期基础上,根据视网膜消化铺片、血管内皮生长因子(VEGF)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)以及晚期糖基化终末产物(AGEs)的检测结果,基于 TOPSIS 法对补肾活血方不同极性部位治疗 DR 的药效活性进行综合评价,以期为后续研究提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物 地黄、丹参、人参、葛根购自成都市荷花池药材市场,经成都中医药大学中药资源与鉴定系裴瑾教授鉴定分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根、五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥细支根或须根、豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. 的干燥根。

将地黄、丹参、葛根、人参按 2: 2: 2: 1 的比例依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水各提取两次,第一次为 8 倍量提取,第二次为 6 倍量提取,分别合并各部位提取液,减压回收溶剂,得不同极性部位浸膏,得率分别为:石油醚部位 0.992%、三氯甲烷部位 0.290%、乙酸乙酯部位 0.716%、正丁醇部位 5.975%、水部位 32.933%。将各极性部位浸膏加水制成含生药浓度为 1 g/mL 大鼠灌胃液,于 4℃ 冰箱保存,备用。

阳性对照药芪明颗粒由浙江万晟药业有限公司生产,批号:171188,加水配制成浓度为 1 g/mL 的灌胃液。

1.2 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 140 g ~ 170 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,生产动物合格证号:SCXK(川)2015-30。高脂高糖饲料(47% 常规饲料、45% 猪油、10% 蔗糖、2% 胆固醇、1% 胆盐)由成都达硕实验动物有限公司提供。动物饲养于成都中医药大学药学院动物房,自由采食、饮水,适应性饲养 1 w 后开始实验。

1.3 试剂 HIF-1 α (abcam 公司,批号: ab216842); VEGF

(PROTEINTECH 公司,批号: 19003-1-AP); 山羊抗兔(批号: SP-9001)、正常山羊血清(批号: ZLI-9021)、浓缩型 DAB 试剂盒(批号: K135925C) 北京中杉金桥生物有限公司; Rat AGEs ELISA KIT(茁彩公司,批号: ZC-37286)。

1.4 仪器 转轮式切片机(徕卡-2016 德国); TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司); BMJ-III 型包埋机、PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); 数码三目摄像显微镜(BA400Digital, 麦克奥迪实业集团有限公司)等; 图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (美国 Media Cybernetics 公司)。

1.5 方法

1.5.1 实验动物分组及处理 将 48 只大鼠测量体重后随机均分为 8 组,每组 6 只。空白组用普通饲料喂养,其余组以高脂高糖饲料喂养 4 w 后,禁食 12 h,以 4.5 ml/kg 的给药体积,腹腔注射浓度为 1% 的链脲佐菌素(STZ),造成胰岛素抵抗。空白组注射等量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72 小时后尾尖取血,测定血糖值,将血糖值 ≥ 16.67 mmol/L 纳入造模成功大鼠。此后每组大鼠均采用普通饲料喂养。继续喂养 12 w 后开始给药,给药组大鼠分别采用灌胃给药的方式给予补肾活血方不同极性部位的提取物灌胃液(给药体积为 11.67 ml/kg),每日一次,持续 4 w。阳性组大鼠给予芪明颗粒(给药体积为 1.22 ml/kg)。空白组和模型组大鼠给予等体积的蒸馏水。给药期间大鼠均可以自由饮水和摄取普通饲料。在末次给药后,腹主动脉取血,置于肝素钠抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min,分离大鼠血浆以检测 AGEs; 取眼球组织检测相应指标。实验期间保持大鼠生存环境的洁净,对大鼠状态和二便进行观察,并对其血糖进行监测。

1.5.2 视网膜消化铺片检测 眼球经多聚甲醛固定,清水冲洗浸泡后,手术显微镜下去除眼前节及玻璃体,剥离视网膜,消化铺片,铺片室温自然干燥,存放 4℃ 过夜,常规苏木素-伊红染色,显微镜下检视,分别记录内皮细胞数和周细胞数,并计算二者的比值(E/P)。

1.5.3 免疫组化检测视网膜 VEGF 和 HIF-1 α 的蛋白表达 多聚甲醛固定后的视网膜组织,按病理检验 SOP 进行脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等操作,最后镜检。VEGF 和 HIF-1 α 一抗浓度为 1: 100。染色判定标准以蓝色为阴性细胞,白色为底物,黄色或棕黄色为阳性细胞。免疫组化染色的切片在 400 倍下选取 3 个不同的视野计算切片中组织的光密度和面积,然后计算每张图像的平均光密度(OD 值)。

1.5.4 大鼠血浆 AGEs 检测 大鼠血浆中 AGEs 的含量测定采用 ELISA 法检测,实验步骤严格按照 Rat AGEs ELISA 试剂盒(货号: ZC-37286)说明书进行检测。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值,计算样品浓度。

1.5.5 TOPSIS 法综合评价药效^[12] TOPSIS 法是一种多目标决策算法,被运用于多个领域。以 VEGF 和 HIF-1 α 的平均光密度值、AGEs 浓度以及铺片 E/P 值为评价指标,对补肾活血方不同极性部位防治 DR 药效作用进行综合分析评价,得出排序结果。具体步骤如下:

对指标进行标准化处理,当指标为正向指标时,其标准化

公式为: $\chi_{ij} = \frac{\chi_{ij}}{\chi_{j\max}}$ 当指标为负向指标时,其标准化公式为: $\chi_{ij} = 1 - \frac{\chi_{ij}}{\chi_{j\max}}$

对进行处理后的数据进行向量规范化处理,向量规范化均

用下式进行变换: $b_{ij} = a_{ij} / \sqrt{\sum_{i=1}^m a_{ij}^2}$ $i=1, \dots, m$ $j=1, \dots, n$

确定正理想解 C^* 和负理想解 C^0 。设正理想解 C^* 的第 j 个属性值为 c_j^* , 负理想解 C^0 的第 j 个属性值为 c_j^0 , 则正理想解 $c_j^* = \max_i c_{ij}$ $j=1, 2, \dots, n$, 负理想解 $c_j^0 = \min_i c_{ij}$ $j=1, 2, \dots, n$ 。

计算各方案离理想点和负理想点的欧氏距离。各方案 i 离理想点和负理想点的距离 d_i^* 、 d_i^0 的计算公式分别为: $d_i^* = [\sum_{j=1}^n (c_{ij} - \max\{c_j^*\})^2]^{1/2}$ 和 $d_i^0 = [\sum_{j=1}^n (c_{ij} - \min\{c_j^0\})^2]^{1/2}$];

根据公式 $C_i = \frac{d_i^0}{d_i^0 + d_i^*}$ 分别计算综合评价指数 C_i 值。

2 结果

2.1 大鼠一般状态观察和血糖测定 空白组大鼠生长状态良好,毛色光泽,二便正常且饮水量少;其余组大鼠随着时间的推移,食量和饮水量增至为空白组大鼠的2倍~3倍,出现大便溏涩,小便多且浑浊,毛色发黄粗糙及断尾等情况。空白组大鼠血糖一直保持着相对稳定状态;其余组大鼠血糖注射STZ后急剧升高且维持高血糖状态,由此可见,大鼠血糖升高是DR模型建立成功的标志之一。给药期间,各给药组大鼠血糖与模型组比较无明显差异,表明其对血糖改善无明显效果。血糖监测结果见表1。

表1 补肾活血方不同极性部位对DR大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

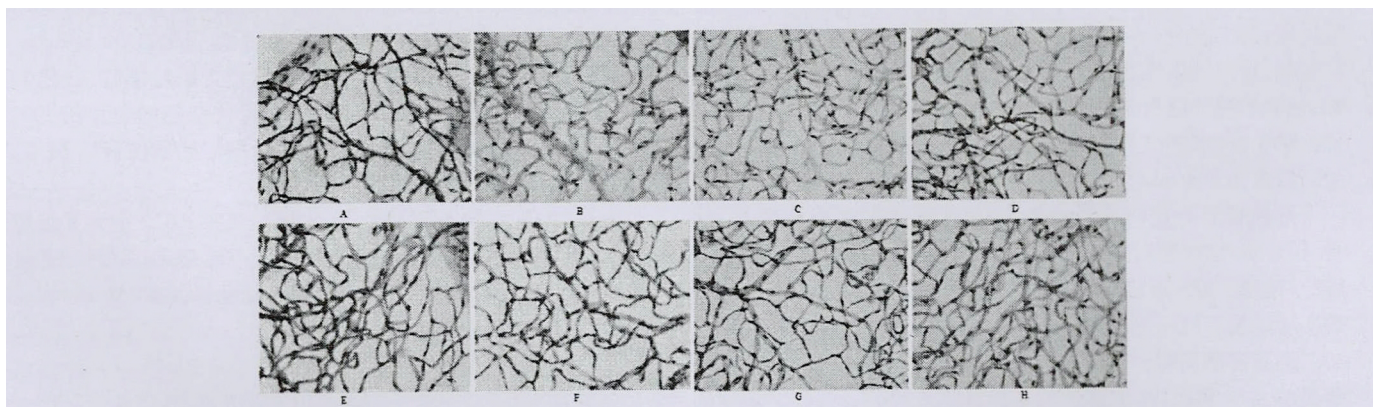
组别	剂量/ (g/kg)	Glu/(mmol/L)						
		第1w	第5w	第7w	第11w	第15w	第17w	第20w
空白对照		3.5±0.7**	5.7±0.4**	6.5±1.2**	4.5±0.4**	6.5±2.5**	5.4±0.6**	5.9±1.0**
模型对照		4.1±1.2	5.6±0.9	22.6±11.5	30.3±6.2	27.7±8.2	25.4±6.4	24.5±4.6
芪明颗粒	1.22	3.8±0.5	5.9±0.7	22.7±4.2	22.7±8.3	19.1±8.1	26.0±7.2	24.6±7.4
石油醚	11.67	4.0±0.7	6.0±0.6	26.0±4.3	29.0±6.9	26.1±8.9	29.4±7.6	23.2±7.0
三氯甲烷	11.67	3.9±0.5	5.4±0.4	27.8±5.7	28.4±6.9	29.4±4.7	33.2±0.2	30.5±6.5
乙酸乙酯	11.67	3.5±0.8	5.4±0.6	27.0±5.2	29.8±6.4	24.4±7.3	27.7±4.7	25.9±7.2
正丁醇	11.67	3.7±1.0	5.4±9.8	28.4±6.6	26.8±7.5	18.8±8.9	26.8±7.5	23.6±7.8
水部位	11.67	4.0±0.4	5.6±0.2	24.7±8.2	28.9±6.7	27.0±6.8	25.6±7.4	33.3±0.9

与模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (下同)。

2.2 视网膜铺片检测结果 铺片结果显示空白组视网膜血管分布均匀,模型组出现视网膜血管分布紊乱扭曲等现象,表明模型组大鼠视网膜血管损伤严重,各给药组视网膜血管虽有不同程度损伤但与模型组比损伤较轻,结果见图1。对每张切片进行读片,镜下共计数3个视野内内皮细胞和周细胞数量,计算内皮细胞数和周细胞数比值(E/P),结果见表2。统计结果显示,与空白组相比,模型组E/P值明显升高;与模型组相比,芪明颗粒组、三氯甲烷组和正丁醇组E/P值均明显降低;水部位组和乙酸乙酯组E/P值无显著性变化,不具统计学意义。

表2 补肾活血方不同极性部位对DR大鼠视网膜微血管内皮细胞与周细胞比值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (g/kg)	内皮细胞与周细胞比值/ (E/P)
空白对照	-	6.82±5.25**
模型对照	-	15.52±4.91
芪明颗粒	1.22	7.95±3.51**
石油醚	11.67	10.63±3.63*
三氯甲烷	11.67	8.67±3.07**
乙酸乙酯	11.67	12.04±3.99
正丁醇	11.67	7.69±2.50**
水部位	11.67	12.63±4.58



A: 空白对照; B: 模型对照; C: 芪明颗粒 1.22 g/kg; D: 石油醚 11.67 g/kg; E: 三氯甲烷 11.67 g/kg; F: 乙酸乙酯 11.67 g/kg; G: 正丁醇 11.67 g/kg; H: 水部位 11.67 g/kg(下同)。

图1 补肾活血方不同极性部位对DR视网膜血管铺片的影响(HE, ×400)

2.3 免疫组化检测视网膜 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达 免疫组化切片可见 VEGF 和 HIF-1 α 阴性表达为蓝色,阳性表达为黄色,白色为底物。空白组大鼠的视网膜中存在少量的 VEGF 和 HIF-1 α 表达;模型组大鼠的 VEGF 和 HIF-1 α 表达最多,各给药组大鼠的 VEGF 和 HIF-1 α 表达量均介于空白组和模型组之间,结果见图 2、图 3。统计结果显示,与空白组相比,模型组大鼠眼球组织 VEGF 和 HIF-1 α 表达明显上调;与模型组相比各给药组大鼠 VEGF 表达明显下调,除水部位组以外,各给药组 HIF-1 α 蛋白含量显著下调。结果见表 3。

表 3 补肾活血方不同极性部位对 DR 大鼠视网膜 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g/kg)	D/OD 值	
		VEGF	HIF-1 α
空白对照	-	0.235 \pm 0.009 **	0.286 \pm 0.015 **
模型对照	-	0.259 \pm 0.005	0.318 \pm 0.016
芪明颗粒	1.22	0.244 \pm 0.006 **	0.293 \pm 0.012 **
石油醚	11.67	0.244 \pm 0.012 **	0.290 \pm 0.013 **
三氯甲烷	11.67	0.238 \pm 0.011 **	0.295 \pm 0.015 *
乙酸乙酯	11.67	0.248 \pm 0.011 *	0.293 \pm 0.019 **
正丁醇	11.67	0.244 \pm 0.010 **	0.298 \pm 0.014 *
水部位	11.67	0.241 \pm 0.008 **	0.301 \pm 0.010

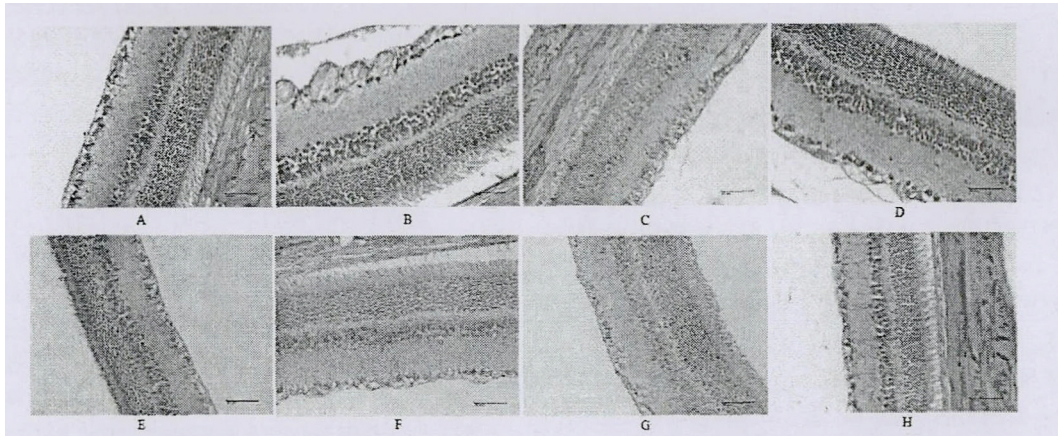


图 2 补肾活血方不同极性部位对 DR 大鼠视网膜 VEGF 免疫组化染色的影响 ($\times 400$)

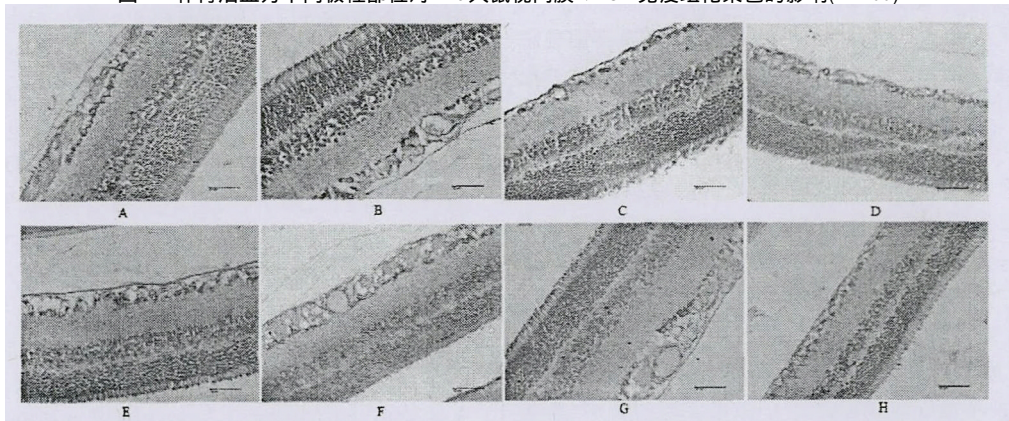


图 3 补肾活血方不同极性部位对 DR 大鼠视网膜 HIF-1 α 免疫组化染色的影响 ($\times 400$)

2.4 ELISA 法检测 AGEs 含量 与空白组大鼠相比,模型组大鼠血浆 AGEs 浓度显著升高;与模型组相比,芪明颗粒组和不同极性部位组大鼠血浆中 AGEs 浓度显著降低,见表 4。

表 4 补肾活血方不同极性部位对 DR 大鼠血浆 AGEs 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g/kg)	血浆 AGEs 浓度/ (ng/mL)
空白对照	-	268 \pm 25 **
模型对照	-	443 \pm 34
芪明颗粒	1.22	286 \pm 37 **
石油醚	11.67	291 \pm 26 **
三氯甲烷	11.67	298 \pm 53 **
乙酸乙酯	11.67	313 \pm 34 **
正丁醇	11.67	352 \pm 24 **
水部位	11.67	294 \pm 74 **

2.5 TOPSIS 法综合评价药效结果 由于各指标药效表达结果不一致,因此,以 VEGF、HIF-1 α 、AGEs 和铺片 E/P 值为评价指标,采用 TOPSIS 法对补肾活血方不同极性部位防治 DR 药效作用进行综合分析评价,得出排序结果。TOPSIS 计算在 MATLAB 软件(美国 MathWorks 公司)上编程实现。综合得分见表 5。根据评价结果,空白组得分最高,模型组得分最低。各给药组得分越接近空白组,其治疗 DR 效果越好,即得分越高效果越优。根据结果可知各给药组得分按高低排序为三氯甲烷组 > 芪明颗粒组 > 正丁醇组 > 石油醚组 > 乙酸乙酯组 > 水部位组,其中三氯甲烷组综合评价指数排序较其他给药组最高,表明三氯甲烷部位防治 DR 效果最好;水部位组得分最低,表明其对 DR 防治效果最差。

表5 补肾活血方不同极性部位对各药理指标 TOPSIS 法综合评价得分的影响

组别	TOPSIS 法综合评价得分	得分高低排序
空白对照	1	1
模型对照	0	8
芪明颗粒	0.7688	3
石油醚	0.6819	5
三氯甲烷	0.7966	2
乙酸乙酯	0.5544	6
正丁醇	0.6905	4
水部位	0.5400	7

3 讨论

目前复制糖尿病模型常用的化学诱导试剂主要有四氧嘧啶(ALX)和链脲佐菌素(STZ)等。ALX和STZ对动物肝肾等均有毒性,但STZ毒性较小且诱导2型糖尿病成模率较ALX高,且成模后能维持稳定的高血糖状态^[13]。STZ复制DR模型方式可分为两种,一种为一次性大剂量注射STZ后诱导出DR模型;另一种为先采用高脂高糖饲料让大鼠出现胰岛素抵抗,再腹腔注射少量STZ,二者相结合,诱导DR模型^[14]。由于前一种方式很容易造成大鼠的死亡,用量较多不经济,故采用高脂高糖饲料结合STZ造模的方法复制DR模型。实验对40 mg/kg、45 mg/kg和50 mg/kg三种STZ用量进行了考察。通过预实验发现,注射STZ剂量为40 mg/kg的大鼠不易出现死亡但造模成功率较低,注射STZ剂量为50 mg/kg的大鼠造模成功率高但更易死亡,综合考虑,故选取45 mg/kg作为STZ注射剂量,在此剂量下造模成功率高且死亡率相对较低。

由于STZ的毒性以及实验持续时间长等原因,实验过程中,大鼠死亡率高,尤其是在注射STZ后的两周内大鼠大量死亡,且后期亦陆续出现死亡。有文献报道,糖尿病感染大鼠死亡率高达80%^[15]。通过监测大鼠死亡前的相关药理指标,解剖死亡大鼠发现,死亡大鼠的肌酐、尿素氮等指数更高,但总蛋白、胆固醇和甘油三酯水平更低,且出现明显的肺水肿和肾脓肿^[16]。分析大鼠的死亡原因,可能与感染、营养不良、淋巴循环受阻、STZ自身毒性以及环境气候等有关^[17]。故在实验过程中,为防止大鼠死亡,应及时清理其排泄物和大鼠尸体,定期清洗饮水瓶,注意清洁和消毒,保持大鼠生长环境的通风性等。

芪明颗粒由黄芪、葛根、地黄等组成,是首个国家批准的治疗DR的中成药新药。临床研究表明,芪明颗粒能保护微血管、延缓DR的疾病进程,用于治疗DR安全有效^[18]。基于本实验研究对象及疾病模型,故选择治疗DR疗效良好的上市中药复方制剂芪明颗粒作为阳性对照药。

DR是糖尿病最常见的微血管并发症之一,研究表明^[19]DR的基本形态学改变有微血管扭曲聚集、内皮细胞增生、血管壁周细胞凋亡等,通过视网膜铺片可以观察到视网膜血管扭曲的情况。在糖尿病病理情况下DR大鼠视网膜微血管的周细胞凋亡是DR最早、且最具特征性的病理损害,因此内皮细胞与周细胞的比值(E/P)会增加。视网膜铺片结果显示,与空白组相比,模型组出现视网膜血管网分布紊乱,局部扭曲聚集等现象,E/P值升高,表明模型组大鼠视网膜血管损伤严重。芪明颗粒组、三氯甲烷组和正丁醇组E/P值较模型组明显降低,提示芪明颗

粒、三氯甲烷和正丁醇部位能抑制血管周细胞数量的减少,改善DR微血管分布紊乱等情况。文献和前期研究表明,视网膜VEGF过度表达贯穿DR发生、发展,VEGF过表达会导致血管渗漏和新生血管形成,HIF-1 α 能够激活并促进VEGF等下游基因的转录,DR大鼠视网膜中HIF-1 α 与VEGF表达增强,与DR的发生发展密切相关^[20-21]。AGEs可活化HIF-1 α ,从而刺激VEGF的增加,视网膜病变程度与AGEs含量呈正相关^[6-9]。因此,本实验检测指标选择主要以VEGF信号通路为主,综合考虑后对上述指标进行了检测。结果显示,模型组大鼠VEGF、HIF-1 α 和AGEs的表达与空白组相比显著增加,提示DR与VEGF、HIF-1 α 和AGEs的表达相关,这与前期研究一致。给药组大鼠各指标有不同程度的降低,表明补肾活血方不同极性部位对DR有不同程度的改善作用,其治疗DR可能与直接抑制VEGF高表达或通过抑制HIF-1 α 和AGEs的高表达,从而间接降低VEGF的表达,保护血管-视网膜屏障、降低血管通透性、减少新生血管形成、保护血管内皮功能等有关。

实验对补肾活血方不同极性部位治疗DR的药效作用进行了研究,检测了VEGF、HIF-1 α 、AGEs等指标,由于各给药组对各指标的影响不一致,故采用TOPSIS法进行综合评价,评价结果表明三氯甲烷部位对DR治疗效果最优;水部位效果最差。课题组对三氯甲烷部位进行了HPLC分析,通过与对照品色谱图比较,确定了三氯甲烷部位含有二氢丹参酮、隐丹参酮、丹参酮I和丹参酮IIA和人参皂苷Rd等成分。课题组前期研究发现,丹参提取物通过抑制HIF-1 α 的表达而发挥治疗DR作用的脂溶性有效成分可能为丹参酮IIA、隐丹参酮、丹参酮I、15,16-二氢丹参酮I等^[22];葛根素、丹酚酸B、人参皂苷Rd为补肾活血方防治DR的可能药效物质^[23];人参提取物通过抑制HIF-1 α 的表达而发挥治疗DR水溶性活性成分可能为人参皂苷Rd、人参皂苷Rh1和人参皂苷Re等^[24]。因此,丹参酮IIA、隐丹参酮、丹参酮I、二氢丹参酮I、人参皂苷Rd等成分可能是三氯甲烷部位治疗DR的药效物质基础。

中药成分复杂、作用靶点多,往往需要检测多个指标来评价药效,且通常逐一分析指标而得出结论。由于逐个分析各指标得到的结果往往不一致,因此为确切反映药效结果,则需要对多个指标进行综合评价^[25]。目前,用于评价多指标的综合评价方法有多种,如TOPSIS法、综合指数法和模糊综合评价法等。有文献报道,杨等人基于模糊物元模型评价大黄不同提取部位降血脂的效果^[26];肖等人采用多指标综合指数法评价了栀子根不同提取部位保肝作用^[27];陈等人应用TOPSIS法对生脉胶囊治疗慢性充血性心力衰竭的疗效进行了综合评价^[28]。由于综合指数法权重作用较明显,易夸大权重大的指标和掩盖权重小的指标的作用;模糊综合评价法计算复杂,确定指标权重的主观性较强^[29]。且本实验测量指标较少,采用主成分分析等方法与这两种方法组合评价亦不适用,因此未选择这两种方法作为综合评价的方法。TOPSIS法基于归一化的数据矩阵,计算各评价对象与最优方案和最劣方案间的距离,获得各评价对象与最优方案的相对接近程度,以此作为评价优劣的依据,该方法简单、客观,能反映不同评价对象的优劣程度,对资料无严格要求且能消除不同量纲对评价结果的影响^[11,12],因此采用此法对结果进行综合评价,评价结果与前期研究基础在一定程度上具有一致性,表明TOPSIS法用于评价补肾活血方不同极性部位治疗DR的作用公正、客观且可行。

参考文献

- [1] 张文博, 聂红平. 糖尿病视神经病变. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(9): 135~137.
- [2] Wong T Y, Cheung C M G, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy. Nat. Rev. Dis. Prim. 2016; 2: 16012.
- [3] 倪妙玲, 金智生. 糖尿病视网膜病变的中医临床治疗进展. 中医研究, 2019, 32(7): 78~80.
- [4] 王笃亲, 谢学军, 万李, 等. 补肾活血中药对早期糖尿病大鼠视网膜内屏障损伤的影响. 中国中医眼科杂志, 2019, 29(2): 102~106.
- [5] 秦学维, 谢学军. 基于中医阴阳理论认识糖尿病视网膜病变中 VEGF 与 PEDF 的平衡关系. 辽宁中医杂志, 2018, 45(4): 715~717.
- [6] 秦伟, 谢学军, 李志英, 等. 补肾活血中药复方对 AGEs 条件下体外纯化培养视网膜 Müller 细胞活力的影响. 中医学报, 2017, 45(4): 9~12.
- [7] 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. 眼科新进展, 2013, 33(12): 1101~1105.
- [8] 秦伟, 谢学军, 李志英, 等. 补肾活血方对 AGEs 条件下体外纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞 HIF-1 α 介导缺氧信号通路的影响. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(2): 71~75.
- [9] 谢学军, 宋明霞, 张梅, 等. 补肾活血中药复方对高糖及糖基化终末产物条件下视网膜 Müller 细胞的影响. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(6): 735~740.
- [10] 李杨, 刘思妍, 周鑫, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术快速识别补肾活血方的化学成分. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 111~121.
- [11] 何昱, 盖玉权, 周惠芬, 等. 麻黄汤处方剂量的多目标优化研究. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1270~1275.
- [12] 邓春燕, 刘汉波, 王晖. 加权 Topsis 法评价在促透剂促透效果评价中的应用. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(4): 412~416.
- [13] 王晗, 罗向霞, 李欢, 等. 化学诱导的糖尿病视网膜病变动物模型研究进展. 中国中医眼科杂志, 2015, 25(4): 297~299.
- [14] 高玉, 吴晋晖, 柳林. 链脲佐菌素诱发性糖尿病大鼠早期视网膜病变模型的建立. 第二军医大学学报, 2010, 31(10): 1053~1059.
- [15] 王彦江, 谢席胜, 冯胜刚, 等. 感染对糖尿病大鼠病理状态的影响. 西部医学, 2014, 26(11): 1433~1437.
- [16] 王彦江, 谢席胜, 冯胜刚, 等. STZ 诱导糖尿病大鼠造模法中大鼠死亡原因探讨. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(4): 691~695.
- [17] 王晓黎, 张锦. 糖尿病合并感染及高危因素分析. 中国微生物学杂志, 2012, 24(3): 257~258.
- [18] 李春艳, 杨莉. 芪明颗粒治疗肝肾阴虚型非增殖期糖尿病视网膜病变患者的临床效果分析. 临床医学研究与实践, 2017, 2(29): 37~38.
- [19] 马栋, 郭承伟. 络治法对 STZ 诱导的糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片中 VCAM-1 表达的影响. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2015, 29(1): 64~68.
- [20] Xu Y, Cheng Q, Yang B. Increased sCD200 Levels in Vitreous of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy and Its Correlation With VEGF and Proinflammatory Cytokines. Investigative Ophthalmology Visual Science, 2015, 56(11): 6565.
- [21] 王闪闪, 程贤琨, 潘文强, 等. 格列齐特联用羟苯磺酸钙对糖尿病视网膜病变大鼠 PKC、VEGF、HIF-1 α 表达的影响. 牡丹江医学院学报, 2019, 40(3): 11~14.
- [22] 李杨, 徐秒, 陈换飞, 等. 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. 中草药, 2017, 48(11): 2231~2236.
- [23] 刘思妍, 王芯, 潘奕璇, 等. 基于视网膜 Müller 细胞的地黄调节 AGEs 干预下 HIF-1 α 表达的谱效关系研究. 中成药, 2019, 网络首发.
- [24] 王紫燕, 李杨, 姚红娥, 等. 基于视网膜 Müller 细胞的人参皂苷类成分调节糖基化终末产物干预下 HIF-1 α 表达的谱效关系研究. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 91~95.
- [25] 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. 2014, 49(9): 1304~1309.
- [26] 杨蕊菁, 顾家瑛, 朱顺娟, 等. 基于变异系数权重的模糊物元模型评价大黄不同提取部位降血脂的效果. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(2): 169~172.
- [27] 肖日传, 罗光明, 朱继孝, 等. 基于偏最小二乘法和多指标综合指数法的栀子根不同提取部位保肝作用评价. 中草药, 2017, 48(23): 4921~4927.
- [28] 陈磊, 梁伟雄, 吕志平. 生脉胶囊治疗慢性充血性心力衰竭临床疗效的 TOPSIS 法综合评价. 南方医科大学学报, 2010, 30(4): 820~822.
- [29] 杜聘. 中医临床疗效评价方法浅述. 实用中医内科杂志, 2011, 25(4): 65~66.

Evaluation of the Effect of Different Polar Parts from Bushen Huoxue Prescription on Diabetic Retinopathy Based on TOPSIS*

Wang Xin¹, Deng Liping¹, Xie Mengjun¹, Zhang Mei^{1**}, Xie Xuejun^{2**}

(¹ School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137,

² Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072)

Objective: To evaluate the therapeutic effects of different polar parts from Bushen Huoxue prescription on diabetic retinopathy (DR) based on TOPSIS. **Methods:** The extracts of different polar parts were obtained by successively extracting Bushen Huoxue prescription with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, n-butanol and water. Retinas after administration with different polar parts were compared and prepared, expressions of VEGF and HIF-1 α protein were determined by immunohistochemistry, AGEs concentration in plasma was determined by ELISA. The therapeutic effects of different polar parts on DR were evaluated based on TOPSIS. **Results:** Compared with the control group, the pharmacological test results in all model groups showed significantly difference. Compared with the model group, the ratios of microvascular endothelial cell to peripheral cells were decreased in all different polar parts groups, AGEs concentration was decreased, protein expressions of VEGF and HIF-1 α were down regulated. TOPSIS evaluation showed that the scores in each group were ranks as chloroform

group > n-butanol group > petroleum ether group > ethyl acetate group > water part group indicating that the chloroform part had the best improvement effect on DR while the effect of water part was the worst. **Conclusion:** The different polar parts from Bushen Huoxue prescription have different effects on DR. Among them the chloroform part is the best for treating DR. Based on TOPSIS method, the effect of different polar parts from Bushen Huoxue prescription on DR can be evaluated fairly and objectively.

Key words Bushen Huoxue prescription, different polar parts, DR, retina endothelial cells/peripheral cells, AGEs, VEGF, TOPSIS

消乳增胶囊治疗小鼠乳腺增生作用机制的血清代谢组学研究

汤浩^{1,2*} 陈丽津² 梁晓静³ 王磊³ 郭勇³

(¹甘肃省人民医院药剂科,兰州 730000; ²甘肃中医药大学药学院,兰州 730000; ³中国科学院兰州化学物理研究所西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃天然药物重点实验室,兰州 730000)

摘要 目的: 利用代谢组学技术探讨消乳增胶囊治疗乳腺增生的作用机制。方法: 将雌性小鼠随机分成: 空白对照组、模型组和消乳增 1.3 g/kg 组, 每组 10 只。采用雌二醇联合黄体酮制备乳腺增生模型。测定小鼠乳头直径、血清中雌二醇和黄体酮含量以及观察乳腺组织病理形态变化。给药 30 天后, 采集小鼠血样用于 GC-MS 代谢组学的分析, 并寻找差异性代谢物。结果: 消乳增胶囊显著缩小小鼠乳头直径, 使雌二醇和黄体酮含量向正常水平调节, 改善小鼠乳腺增生病理形态, 并通过代谢组学技术鉴定出 15 个潜在的特征代谢物。结论: 消乳增胶囊可能是通过调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、丙酮酸代谢、磷酸肌醇代谢、色氨酸代谢等途径改善氨基酸代谢、糖代谢、脂肪代谢及能量代谢来协同发挥抗乳腺增生的作用, 具有多靶点性。

关键词 消乳增胶囊; 乳腺增生; 作用机制; 代谢组学

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2019.04.032

乳腺增生症是最为常见的女性乳腺疾病, 主要是由于内分泌功能紊乱所致的乳房疼痛、肿块或结节等症状, 本质是乳腺组织发生不同程度增生而又复旧不全所致的乳腺结构异常。乳腺增生症虽常被认为是一种良性疾病, 但实际上仍具有癌变趋势, 其中非典型增生和外周型导管内乳头状瘤已被当作乳腺癌癌前病变。由此可见, 乳腺增生症应该得到足够重视。代谢组学是通过分析生物体内小分子代谢物的变化, 以先进技术检测和数据处理为手段, 能够反映某种干扰因素(如环境变化、药物、病菌等)对生物体内生化过程和微环境的影响, 进而考察代谢物与机体生理、病理状态下的相对关系, 为疾病的预防、诊断、治疗提供新的思路。有相关文献^[1]研究, 利用代谢组学探讨利乳康对乳腺增生症大鼠的作用机制, 结果代谢组学分析表明, LRK 的治疗效果主要与调节前列腺素 E2、磷脂酰胆碱、白三烯 B4、磷脂酰丝氨酸等 10 种代谢产物有关。途径分析表明, 代谢产物与花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢、亚油酸代谢有关。

消乳增胶囊是甘肃省人民医院的院内制剂, 由当归、白芷、白芍、元胡、陈皮等共 18 味药配伍而成, 具有疏肝理气、通络止痛的功能, 临床上用于治疗乳痛、乳腺增生症。目前, 对消乳增胶囊的研究集中在成分测定、工艺研究、药理毒理等方面, 而对于药物作用机制还未开展过研究, 因此本论文应用代谢组学的方法, 研究消乳增胶囊对乳腺增生病机体内源性物质的影响, 从内源性物质在消乳增给药前后的变化趋势来探讨消乳增治疗乳腺增生病的可能代谢途径, 进而为中药复方治疗乳腺增生病机机制的研究提供参考。

1 材料与方

1.1 试验药物 消乳增胶囊由甘肃省人民医院提供, 规格: 0.4 g/粒, 生产批号: 20171201。戊酸雌二醇片, 购自拜耳医药保健有限公司, 规格: 1 mg/片, 批号: 380A; 黄体酮软胶囊, 购自浙江爱生药业有限公司, 规格: 100 mg/粒, 批号: 20180309。将消乳增胶囊壳掰开, 取其内容物适量加纯化水配制成浓度为 192.5 mg/mL 的混悬液。所有混悬液在 4 °C 下保存, 用前加热至 37 °C 并摇匀。取适量戊酸雌二醇片, 研磨成细粉, 精密称量后加纯化水溶解, 配制成浓度为含雌二醇 0.25 mg/mL 的混悬液; 将黄体酮软胶囊, 用干净的小刀切开, 将其内容物重悬于芝麻油中, 制成终浓度为含黄体酮 2.0 mg/mL 的混悬液。

1.2 动物 健康 SPF 级昆明雌性未孕小鼠 30 只, 体重 20 g ~ 25 g, 购于兰州大学动物实验中心, 生产合格证号: SCXK(甘)2014-0004。将实验动物饲养于甘肃省人民医院动物实验房中, 室温 20 °C ~ 25 °C, 相对湿度 30 % ~ 50 %, 自然光照下(12 h 光照/12 h 黑暗)统一喂养, 给予普通鼠饲料和纯化水。

1.3 试剂 小鼠雌二醇、孕酮 Elisa 试剂盒, 均购自于上海蓝基生物科技有限公司, 批号为: 20170812、20170425; 无水乙腈, 购自美国天地公司, 批号: 150208; 甲基胺盐酸盐, 购自阿拉丁试剂有限公司; 吡啶, 购自上海麦克林生化科技有限公司, 批号: 171129; MSTFA, 含 1% 三甲基氯硅烷, 购自阿拉丁试剂有限公司; 正庚烷, 购自天津市光复精细化工研究所, 批号: 090314; 十六烷, 购自山东西亚化学工业有限公司, 批号: 161002。

1.4 仪器 BX43 手动系统显微镜(日本奥林巴斯公司); ELX808 全自动酶标仪(美国宝特公司); MLS-3750 高压灭菌器(日本三洋公司); MIR-254 生化培养箱(日本三洋公司); ASET

* 通信作者: 汤浩, 主任药师, 硕士生导师, E-mail: gssy_th@163.com。