

基于 PCA-GR 的补阳还五汤及其精简方抗脑缺血 损伤功效的谱效关系研究

刘青萍¹, 晏峻峰¹, 杨欣², 夏相宜², 张水寒², 刘芳³, 王宇红³, 蔡光先^{3*}

(1. 湖南中医药大学管理与信息工程学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006;
3. 湖南中医药大学湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地、中药粉体关键技术及装备国家
地方联合工程实验室, 湖南长沙 410208)

[摘要] 采用高效液相色谱法获取 12 批补阳还五汤全方、14 批补阳还五汤精简方指纹图谱化学成分的数据, 运用主成分分析法(principal component analysis, PCA)对采集的数据进行降维处理, 计算出综合排名第一的中药材指纹图谱批次。运用灰色关联度法(grey relational analysis, GRA)将所求批次的指纹图谱特征峰和脑损伤的保护作用关联起来, 探讨补阳还五汤全方及精简方中指纹图谱共有峰和特有峰与脑损伤保护作用贡献程度的强弱关系。本研究结合 PCA 和 GRA 开展补阳还五汤谱效关系研究, 能提升数据的有效性和准确度。

[关键词] 补阳还五汤; 谱效关系; 主成分分析; 灰色关联度; 脑缺血损伤

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.003

The Spectrum-Effect Relationship of Buyang Huanwu and its Optimized Prescriptions on Cerebral Ischemia Injury Based on PCA-GR Method

LIU Qingping¹, YAN Junfeng¹, YANG Xin², XIA Xiangyi², ZHANG Shuihan²,
LIU Fang³, WANG Yuhong³, CAI Guangxian^{3*}

(1. Management and Information Engineering School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Powder of Chinese Traditional and Innovative Medicine State Key Laboratory of Ministry of Hunan University of Chinese Medicine, Powder of Chinese Traditional Key Technologies and Equipment of Local Joint National Engineering Laboratory, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] The HPLC fingerprint of the 12 batches of Buyang Huanwu Decoction and the 14 batches of its optimized prescriptions were determined. The principal component analysis (PCA) was used to reduce the data dimension. The ranked first batch of fingerprints of Chinese medicines were evaluated. The protective effects of brain damage and the characteristic peaks were correlated by grey relational analysis (GRA). The correlation between common peaks and characteristic peaks of Buyang Huanwu Decoction and its optimized prescriptions with its contribution on the protective effect of cerebral ischemia were discussed. According to the method of PCA and GRA, the spectrum-effect relationship research of Buyang Huanwu Decoction can be improved effectively and accurately.

[Keywords] Buyang Huanwu Decoction; spectrum-effect relationship; PCA; GRA; cerebral ischemia injury

谱效关系^[1]通过色谱及其联用技术, 结合化学计量学的理论和方法, 分析所提取的指纹图谱特征信息, 能实现指纹图谱数据的量化或优化。运用数据挖掘的方法能将指纹图谱数据中标识的

活性成分群特征峰与中药的药效贡献度关联起来, 计算中药复方中指纹图谱和药效之间的关系, 为中药复方物质基础研究奠定基础。本研究采用 PCA 和 GRA 探讨补阳还五汤脑损伤保护作用的谱

[收稿日期] 2016-06-17

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)课题(2012CB723503); 湖南省教育厅科技项目(13C683, 13C672); 湖南省教育厅(KC2011B027); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(2013年); 中医药数字化技术基础研究平台。

[作者简介] 刘青萍, 女, 博士, 研究方向为中医药信息学。

[通讯作者] * 蔡光先, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 366620183@qq.com。

效关系,考察补阳还五汤全方及精简方的指纹图谱特有峰、共有峰与药效间的关联度,探讨补阳还五汤的药效物质基础研究,为经典名方的再次开发提供新思路。

1 材料

1.1 药材

补阳还五汤、补阳还五汤精简方(黄芪 30 g,地龙 6 g,川芎 9 g)干浸膏均由湖南中医研究院中药所张水寒教授提供。补阳还五汤是由不同批次中药材,按照传统水煎法浓缩干燥后制备成干浸膏^[2],相当于含 4.5 g 原药材/g;补阳还五汤精简方由不同批次中药材,按新工艺制备成干浸膏,相当于 4.7 g 原药材每克。

1.2 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20AVP 紫外检测器,日本岛津公司);FNI01-2 型鼓风干燥箱 (长沙仪器仪表厂);Image-Pro Express 图像分析系统(日本 Olympus 公司);AE 240 电子分析天平(METTLER 公司)。红四氮唑(英国 BIOFER 公司,批号 20110728);水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20111114);乙腈为色谱纯;水为纯净水。

1.3 动物

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量为 250~280 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.4 色谱条件与系统适用性实验

Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm);柱温 40 ℃;流速 1.0 mL/min;检测波长 264 nm;梯度洗脱程序为 0-70 min,96%-5%(水),4%-75%(乙腈);进样量 10 μL。

1.5 供试品溶液的制备

称取补阳还五汤全方浸膏 0.2410 g,精密加入 10 mL 甲醇,超声 20 min,过滤,备用;称取补阳还五汤精简方浸膏 0.2560 g,精密加入 10 mL 甲醇,超声 20 min,过滤,备用。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

采用大脑中动脉线栓法,经左侧颈外-颈内动

脉插线,建立大脑中动脉闭塞模型^[3]。室温保持为 20~30 ℃,手术时使用加热垫。术后将动物置于装有清洁垫料的饲养盒内,自由饮水、进食。按照本研究设计方案的需求,将大鼠分成假手术组、模型组、补阳还五汤精简方高、中、低剂量组和补阳还五汤全方组,每组各有大鼠 10 只。给予假手术组和模型组等容积的无菌蒸馏水;补阳还五汤全方组和精简方组在术后第 1 日起给药^[4],分别以 2.41 g/kg 和 3.15 g/kg 药液灌胃,给药容积 10 mL/kg,给药 7 d 后处死取材,并按文献^[5]方法检测脑干湿重和脑梗死面积。前期研究的结果表明,补阳还五汤中剂量组抗脑缺血损伤的效果最佳,其疗效优于补阳还五汤全方组。本研究中的补阳还五汤精简方采用中剂量组的给药剂量。

2.2 补阳还五汤 HPLC 指纹图谱比较分析研究

本研究选取 12 批补阳还五汤全方(简称全方)和 14 批补阳还五汤精简方(简称精简方)供试品溶液,测定其指纹图谱,采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版软件进行分析,按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的规定,建立不同批次补阳还五汤全方和补阳还五汤精简方的指纹图谱^[4]。相似度结果表明:全方和精简方色谱图中主要色谱峰在 0-70 分钟内基本分布均匀,指纹图谱相似度在 0.9-1.0 之间,各批样品之间相似度高,制备工艺比较稳定。

2.3 基于 PCA 的补阳还五汤指纹图谱分析研究

PCA^[6]是对数据进行降维处理的技术。这种方法利用数据中原本存在的相关性,将高维的原始数据压缩成低维的数据(主成分),在该过程中通过选取数据集中分布的主方向,减少因数据压缩而产生的数据精度损失。PCA 能在尽量不丢失原有信息的基础上,对原始数据进行降维,降低后续数据处理的难度。

本研究采用标准差标准化(zero-mean normalization, z-score),对精简方和全方指纹图谱特征峰峰面积的数据进行标准化,转化为均值为 0,标准差为 1 的数据。运用 PCA 将精简方指纹图谱特征峰峰面积标准化后的数据进行降维处理,计算得到各主成分的累积贡献率为[0.683,0.784,0.863,0.931,0.979,0.992,0.997,0.998,0.999,1,1,1,1],由此可知,精简方前 5 个主成分包含原始数据中 98%的信息。同理,计算得

到全方各成分的累积贡献率为[0.599,0.79,0.884,0.934,0.963,0.982,0.990,0.994,0.997,0.999,1,1],全方中前4个主成分包含原始数据93%的信息。采用PCA能对14批精简方样本和12批全方样本进行综合评价^[2](如表1所示),探讨不同批次样本质量的稳定性。

表1 精简方及全方各样本主成分综合得分和排名精简方

精简方样本	综合得分	排名	精简方样本	综合得分	排名
1	0.70	7	1	-3.75	12
2	-2.65	14	2	-0.63	7
3	2.09	3	3	-0.65	9
4	-1.73	10	4	-0.63	8
5	-1.87	11	5	-1.55	11
6	-1.48	9	6	0.13	6
7	-0.93	8	7	1.31	4
8	-2.11	12	8	1.71	3
9	-2.39	13	9	2.43	1
10	1.67	5	10	2.38	2
11	2.65	1	11	-0.78	10
12	2.65	2	12	0.33	5
13	1.74	4			
14	1.65	6			

2.4 基于 GRA 的补阳还五汤谱效关系研究

GRA^[7]是在部分信息未知的情况下,用来度量事物之间、因素之间关联性大小的数据分析方法。该方法能定量描述事物、因素之间的变化情况,并通过其变化趋势判断事物间、因素间关系的强弱、大小和次序。

本研究计算全方及精简方的指纹图谱特征峰峰面积^[7],将全方的数据作为子序列,精简方数据作为母序列。采用公式 $Y_{nk} = X_{nk}/X_k$ 进行计算(X_{nk} 为原始数据, Y_{nk} 为规格化处理后的数据, X_k 为第 k 行数据的均值),将原始数据进行规格化处理,以解决子序列和母序列测度不统一的问题。结合前期研究中全方及精简方对脑缺血模型大鼠神经功能评分、脑梗死面积和脑干湿重比的影响^[8],运用 GRA 判断全方及精简方的指纹图谱特有峰、共有峰与其调节脑缺血损伤药效之间的关联度(如表2所示)。

3 结果

3.1 基于 PCA 的补阳还五汤指纹图谱研究结果

本研究从全方及精简方各批样本指纹图谱综合得分的结果可知,精简方第11批样本和补阳还五汤全方第9批样本质量稳定性排名第一。通过PCA降维后的综合指标,能反映全方及精简方的主成分信

表2 全方及精简方与神经功能评分、脑梗死面积和脑干湿比的关联度

峰号	全方及精简方与神经功能评分的关联度	全方及精简方与脑梗死面积的关联度	全方及精简方与脑干湿比的关联度	备注
1	0.49	0.45	0.49	全方特有峰
2	0.78	0.81	0.82	共有峰
3	0.61	0.41	0.50	精简方特有峰
4	0.61	0.41	0.50	精简方特有峰
5	0.61	0.41	0.50	精简方特有峰
6	0.91	1	1	共有峰
7	0.76	0.78	0.8	共有峰
8	0.49	0.45	0.48	全方特有峰
9	1	0.62	0.79	共有峰
10	0.49	0.45	0.48	全方特有峰
11	0.73	0.74	0.76	共有峰
12	0.71	0.71	0.74	共有峰
13	0.72	0.72	0.74	共有峰
14	0.97	0.6	0.77	共有峰
15	0.67	0.44	0.55	共有峰
16	0.75	0.49	0.6	共有峰

息,筛选出综合排名第一、质量稳定的样本指纹图谱作为谱效关系研究的基础。

3.2 基于 GRA 的补阳还五汤谱效关系研究结果

本研究采用 GRA 开展补阳还五汤的谱效关系研究,具体结果如下:全方及精简方与神经功能评分关联度结果表明,两者共有峰排名均大于各自的特有峰;精简方的特有峰排名大于全方,保留时间为 $t_R=32.59,44.10,20.65,6.47$ 和 26.40 min 的化学成分贡献度分别排在前5位;从全方及精简方与脑梗死面积关联度结果可知,两者中9个共有峰排名大于各自的特有峰,补阳还五汤全方特有峰排名大于补阳还五汤精简方;保留时间为 $t_R=20.65,6.47,26.40,33.42$ 和 40.18 min 的化学成分贡献度分别排在前5位;全方及精简方与脑干湿比关联度结果表明,两者的共有峰排名均大于各自的特有峰,且精简方的特有峰排名大于全方,保留时间为 $t_R=20.65,6.47,26.40,32.59$ 和 44.10 min 的化学成分贡献度分别排在前5位。

采用 PCA- GRA 分析补阳还五汤的谱效关系,结果表明全方及精简方的共有峰中,保留时间为 $t_R=6.47,20.65,26.40$ min 的化学成分,调控脑梗死面积、脑水肿的贡献度排名位于前三位,调节神经功能症状的贡献度排名位于第3、4、5(下转第56页)

孕,肾虚是主要病机,治疗以补肾为主,兼调他脏。正如上述病案,以补肾调经为主。现代研究^[10]也证实,补肾中药可以调节内分泌机制,提高卵巢对LH的反应,从而调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,促进卵泡生长、发育、成熟和排出,恢复月经周期。《丹溪心法》曰:“若是肥盛妇人,稟受甚厚,恣于酒食之人,经水不调,不能成胎,谓之脂满溢,闭塞子宫”。PCOS患者的另一个临床表现就是体态偏胖,而肥胖的主要发病原因即为痰湿停聚,痰湿内停日久,阻滞经络,气血运行不畅导致痰湿瘀阻,故王小云教授认为痰湿、血瘀是其标,是加重肾气虚损的病理性产物。在临床治疗时要在肾虚基础之上根据情况加健脾化痰祛湿及活血化瘀之药,进一步促进疗效。本病案亦为本虚标实之证,在中药调周的原则下也酌加祛痰湿瘀标邪之药物,标本同治,提高疗效。

参考文献:

- [1] 贺晓霞,王若光.平衡阴阳法对多囊卵巢综合征雌雄激素的调节[J].湖南中医药大学学报,2016,36(2):16-19.

- [2] Fahimeh T, Masoumehs, Maryam T, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of kanmn population. Iranian PCOS prevalence study[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9: 39.
- [3] 姚婷,林洁.尤昭玲教授治疗多囊卵巢综合征经验对经验浅析[J].湖南中医药大学学报,2015,35(8):38-40.
- [4] 吴英姿.中西医结合治疗多囊卵巢综合征的研究近况[J].中国中医药现代远程教育,2013,11(11):155-156.
- [5] 董惠娟,张丹英,俞超芹,等.多囊卵巢综合征患者焦虑和抑郁状况的调查[J].中华现代护理杂志,2012,18(10):1189-1190.
- [6] 王铁枫,刘雁峰.从肝之为病探析多囊卵巢综合征的病因病机[J].现代中医临床,2014,21(5):1-3.
- [7] 杨正望,文炯,张增玲.补肾化痰方对PCOS大鼠卵巢颗粒细胞CYP450表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2011,31(1):30-32.
- [8] 冯璇,王小云.王小云教授“以情胜情”法治疗更年期女性情绪障碍经验[J].中华中医药杂志,2014,29(3):789-792.
- [9] 杨洪艳,王小云,许英,等.中医身心同治方案治疗绝经综合征抑郁症状的随机对照研究[J].广东医学,2011,32(16):2209-2211.
- [10] 胡秀慧,傅萍.补肾化痰祛瘀法对肥胖型多囊卵巢综合征患者生殖激素及血脂的影响[J].浙江中西医结合杂志,2013,23(7):562-564.

(本文编辑 贺慧娥)

(上接第15页)位。从上述研究结果可知,全方及精简方三个共有峰可能对调控脑缺血损伤起到关键作用。

4 结论

本研究采用PCA,将补阳还五汤全方及精简特征峰的高维数据压缩成低维数据(主成分),并计算出综合排名第一、质量稳定的样本指纹图谱序列,将其作为补阳还五汤抗脑缺血损伤功效谱效关系研究的基础。该方法揭示了不同批次全方及其精简方指纹图谱特征峰的相似性和差异性,为评价中药复方的品质特征研究提供了数据支撑。运用GRA将全方及精简方指纹图谱标识的特征峰峰面积与神经功能评分、脑梗死面积、脑干湿比等药效指标相关联,计算两者指纹图谱化学成分中,对脑损伤具有保护作用的主要成分。通过PCA和GRA对采集的指纹图谱和药效数据进行分析,结果客观评价了补阳还五汤抗脑缺血损伤保护作用的谱效关系,提升了数据的有效性和准确度,为中药的药效物质基础方法

研究提供了新思路。

参考文献:

- [1] 李生茂,刘琳,谭睿,等.市售沙棘HPLC指纹图谱一致性及抗氧化活性谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2016,21(11):47-50.
- [2] 夏相宜,王宇红,蔡光先,等.脑健胶囊对MCAO大鼠脑水肿、梗死面积及体质量的影响[J].中医学报,2014,29(4):532-534.
- [3] 刘芳,刘青萍,王宇红,等.补阳还五汤及其精简方抗脑缺血损伤功效比较[J].中国中医药信息,2014,21(9):46-49.
- [4] 刘青萍.补阳还五精简方脑健片治疗脑缺血后脑损伤的谱效关系和药代动力学数学模型研究[D].长沙:湖南中医药大学,2014.
- [5] 易健,黄昕.脑得健方对大鼠局灶性脑缺血后神经功能及梗死面积的影响[J].湖南中医药大学学报,2010,30(1):9-11.
- [6] 金苹,朱粉霞,谭晓斌,等.基于主成分分析的茶叶预防肺癌药效物质研究[J].中药材,2013,36(6):948-952.
- [7] 肖新平.关于灰色关联度量化模型的理论研究和评论[J].系统工程理论与实践,1997(8):76-81.
- [8] 刘青萍,晏峻峰,刘芳,等.补阳还五汤精简方对脑缺血模型大鼠神经功能及脑梗死面积的影响[J].中国中医药信息杂志,2014,21(10):54-57.

(本文编辑 李杰)