

基于均匀设计法优化绿原酸-栀子苷组合治疗 实验性脂肪肝大鼠的剂量配比

赵逍, 林曼婷, 王玉杰, 王宏国, 李国辉, 张利敏, 周海虹, 陈少东

(厦门大学医学院, 厦门 361005)

摘要: 目的: 运用“均匀设计法”优化绿原酸-栀子苷组合治疗实验性脂肪肝大鼠的最佳剂量配比, 探讨中药有效成分配伍配比规律。方法: 运用数学模型“均匀设计法”对绿原酸-栀子苷组合中的2种中药有效成分进行分组设计, 分为6种组合对高脂饮食诱导的实验性脂肪肝大鼠模型进行治疗, 观察各组大鼠肝脏的病理变化, 并以肝组织甘油三酯(TG)、血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、总胆固醇(CHO)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)测定作为筛选指标, 优选二者的最优剂量配比, 并根据所得重新分组验证。结果: 与正常组比较, 模型组脂肪肝大鼠肝组织TG、血清LDL-C、CHO含量明显升高($P<0.01$), 血清HDL-C含量明显降低($P<0.01$), 血清ALT、AST活性明显升高($P<0.01$), 肝组织存在明显脂肪变性。经多元逐步回归分析, 绿原酸-栀子苷组合治疗脂肪肝的最佳剂量配比是绿原酸90mg+栀子苷90mg。结论: 应用均匀设计与药理学分析的方法可有效优化中药有效成分组合的最佳剂量配比。

关键词: 绿原酸; 栀子苷; 脂肪肝; 均匀设计; 中药有效成分组合; 最优剂量配比

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(No.81274155, No.81503529, No.81503404), 福建省自然科学基金面上项目(No.2014J01374), 福建省高等学校新世纪人才计划项目

Study on the dose ratio of Chlorogenic acid-Geniposide to treat rats with experimental fatty liver based on uniform design

ZHAO Xiao, LIN Man-ting, WANG Yu-jie, WANG Hong-guo, LI Guo-hui, ZHANG Li-min, ZHOU Hai-hong, CHEN Shao-dong

(Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To explore the active ingredients and dose ratio of medicine, combined with the optimal dose ratio of Chlorogenic acid-Geniposide to treat rats with experimental fatty liver. Methods: The active ingredients and optimized prescription were screened out, adopting uniform design to divide Chlorogenic acid-Geniposide into six combinations, by using experiment on high fat diet-induced fatty liver rat models, and the pathological results were observed. The serum LDL-C, HDL-C, CHO, ALT, AST and liver TG were taken as the screening-indexes. Results: Compared with the normal groups, the serum LDL-C, CHO, ALT, AST and liver TG in model groups were significantly higher ($P<0.01$), the serum HDL-C in model group was significantly decreased ($P<0.01$), and the pathology of liver tissue got obvious steatosis. According to stepwise regression analysis of uniform design, the best ratio of Chlorogenic acid-Geniposide to anti-NAFLD were Chlorogenic acid 90mg with Geniposide 90mg. Conclusion: Uniform design is the appropriate way to confirm the optimized prescription for active ingredient of Chinese medicine.

Key words: Chlorogenic acid; Geniposide; Fatty liver; Uniform design; Active ingredient; Optimized prescription

Funding: General Program of National Natural Science Foundation of China (No.81274155, No.81503529, No.81503404), General Program of Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2014J01374), Program for New Century Excellent Talents in Higher Education Institution of Fujian Province

本课题组在前期研究中已发现并证实, 源于《伤寒论》中茵陈蒿汤, 其组成中药为茵陈、栀子、大黄, 呈现出显著的抗脂肪肝的药理作用^[1]; 同时, 成功利用数学模型均匀设计法, 筛选出茵陈蒿汤抗非酒精性脂肪性肝病的效应中药及其配比剂

通讯作者: 陈少东, 福建省厦门市思明区大学路168号厦门大学医学院中医系, 邮编: 361005, 电话: 0592-2183069

E-mail: adong@xmu.edu.cn

量为“3g茵陈+1.5g栀子(1kg大鼠每日用量)”^[2],表明均匀设计法可作为中药复方剂量配比优化的有效工具^[3]。基于前期“茵陈与栀子配伍是茵陈蒿汤抗脂肪肝主效应中药”的工作基础,在研究中发现中药茵陈中的重要有效成分绿原酸与栀子中的重要有效成分栀子苷联合应用具有类似于茵陈-栀子降低游离脂肪酸诱导的HepG2细胞内脂肪含量的药理作用,提示绿原酸、栀子苷可能为中药抗脂肪肝的重要药效物质基础,但其最佳剂量配比还需进一步研究以明确。为此,本文运用高脂饮食诱导的实验性脂肪肝大鼠模型,结合均匀设计法,深入剖析绿原酸-栀子苷组合改善脂质代谢、抗炎性反应损伤等不同作用途径的最佳剂量配比,探讨中药有效成分组合的配比规律,现报道如下。

材料

1. 动物 清洁级6周龄雄性Wistar大鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号:SCXK(沪)2008_0001。

2. 药物 绿原酸(纯度98%以上,批号:ZL121115005)、栀子苷(纯度98%以上,批号:ZL12-12-06),均购自南京泽朗医药科技发展有限公司,贮-4℃冰箱保存备用。血脂康胶囊(0.3g/粒,12粒/盒,批号:20130106),北京北大维信生物科技有限公司生产。

3. 主要试剂 甘油三酯(triglyceride, TG)试剂盒(批号:20130112),血清低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号:20121106),血清高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒(批号:20130122),血清总胆固醇(total cholesterol, CHO)试剂盒(批号:20130103),均购自北京北化康泰临床试剂有限公司。血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)试剂盒(批号:20130420)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)试剂盒(批号:20130424)购自南京建成生物工程研究所。

方法

1. 模型制备 采用单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型。除正常组进食普通饲料外,其余各组大鼠均以高脂饲料喂养4周,高脂饲料(83.25%基础饲料、10%猪油、1.5%胆固醇、0.2%脱氧胆酸钠、5%蔗糖、0.05%丙硫氧嘧啶)购自苏州双狮实验动物饲料科技有限公司[生产批号:苏饲审(2009)05302]。

表1 均匀设计筛选实验组方案

组别	绿原酸(X1)	栀子苷(X2)	生药量(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)
组1	15	45	60
组2	30	90	120
组3	45	30	75
组4	60	75	135
组5	75	15	90
组6	90	60	150

各组大鼠均自由饮水。

2. 均匀设计实验方案 根据均匀设计实验方案,选用U₆(6⁴)表,将绿原酸、栀子苷作为考察因子,以X1代表绿原酸,以X2代表栀子苷。每个因子各取6个水平,水平为1 000g大鼠每日给药量,依据2010年版《中华人民共和国药典》结合相关文献使用安全剂量,令X1、X2均在15-90mg的剂量范围内,重复递增6次。并结合选用U₆(6⁴)使用表设定各因子和水平,得出剂量配比优化实验组方表(表1),即均匀设计组1-组6。

3. 分组与用药

3.1 均匀设计“筛选”实验 雄性Wistar大鼠55只,自造模起,按随机数字表将大鼠分为正常组(6只)和造模组(49只),造模4周后,将造模组随机分为模型组、均匀设计各组(组1-组6),每组7只。均匀设计各组按1mL/100g鼠体质量分别灌胃相应药物4周。正常组、模型组给予相应量的饮用水灌胃。

3.2 均匀设计“验证”实验 Wistar雄性大鼠60只,自造模起,按随机数字表将大鼠分为正常组(10只)和造模组(50只),造模4周后,将造模组随机分为模型组、最佳剂量配比组、绿原酸组、栀子苷组、血脂康组,每组10只。药物组按1mL/100g鼠体质量分别灌胃相应药物4周(表2)。正常组、模型组给予相应量的饮用水灌胃。

表2 均匀设计验证实验各组给药剂量

组别	生药量(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)
正常组	0
模型组	0
最佳剂量配比组	90mg绿原酸+90mg栀子苷
绿原酸组	90mg绿原酸
栀子苷组	90mg栀子苷
血脂康组	200mg血脂康

4. 检测项目与方法

4.1 肝组织TG含量测定 肝组织匀浆制备:取200mg湿肝,加入乙醇-丙酮(1:1)3mL,3 000r/min匀浆,10s×3次,在有塞的试管中充分摇匀,放置过夜。翌日4℃离心(3 000r/min,15min)后取上清液分装于1.5mL离心管中,取10μL上清液用于TG含量测定。

4.2 血清CHO、HDL-C、LDL-C含量测定 按试剂盒方法测定。

4.3 血清ALT、AST活性测定 采用比色法。

4.4 肝组织HE染色 肝组织以4%多聚甲醛固定液固定,经修整后进行组织脱水,自动石蜡包埋机常规包埋,连续切片,切片厚度为4μm,然后以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法进行染色,最后在光学显微镜下观察肝脏病理学变化并拍照。

表3 均匀设计筛选实验各相关指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肝组织TG (mmol/L)	血清CHO (mmol/L)	血清LDL-C (mmol/L)	血清HDL-C (mmol/L)	血清ALT (U/L)	血清AST (U/L)
正常组	6	2.83±0.72	1.32±0.12	0.43±0.12	1.93±0.41	38.77±8.24	32.98±6.28
模型组	7	6.34±1.21**	2.23±0.38**	1.42±0.21**	0.83±0.25**	87.32±31.22**	89.92±32.37**
组1	7	4.90±0.67	1.90±0.37	0.88±0.17	1.30±0.25	77.80±23.69	91.32±17.58
组2	7	4.55±0.66	1.68±0.07	0.72±0.10	1.28±0.11	48.00±11.73	68.13±11.92
组3	7	4.63±0.38	1.80±0.23	0.96±0.20	1.26±0.21	70.18±18.06	73.18±14.43
组4	7	4.10±0.70	1.76±0.18	0.77±0.10	1.33±0.17	39.45±9.25	61.51±13.17
组5	7	4.70±0.65	1.96±0.21	0.91±0.13	1.20±0.19	67.65±12.38	74.96±12.92
组6	7	3.81±0.26	1.58±0.31	0.73±0.16	1.42±0.13	30.84±10.24	48.17±9.60

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

5. 统计学方法 所有数据均使用SPSS 12.0软件包进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 Q 检验。均匀设计“筛选”实验采用多元逐步回归分析(以 $\alpha=0.05$ 为显著水准进行统计检验)以剖析不同作用途径的相应效应中药及其剂量配比。等级资料采用 $Ridit$ 分析。

结果

1. 均匀设计筛选实验

1.1 正常组、模型组大鼠肝组织病理HE染色的变化 见图1。正常组大鼠肝小叶及肝窦结构完整,肝索整齐排列于中央静脉周围,肝细胞胞质均匀,汇管区清晰,无明显脂质与炎性反应细胞浸润,气球样变偶见。模型组大鼠可见肝小叶及肝窦组织被破坏,肝索排列松散,肝细胞肿胀,胞浆疏松,内有大小不等的脂肪滴,以中央静脉周围最为明显,出现以大泡性为主的脂肪变性,并可见局灶性炎性反应细胞浸润、甚至坏死。

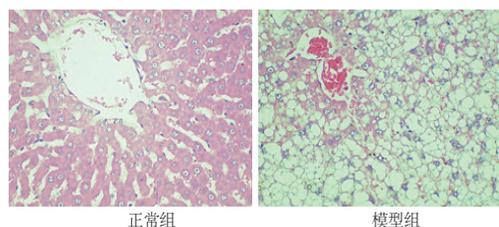


图1 大鼠肝组织病理HE染色示意图($\times 400$)

1.2 绿原酸-栀子苷组合抗脂肪肝的剂量配比优化分析 与正常组比较,模型组肝组织TG含量以及血清ALT活性显著升高($P<0.01$),说明高脂饮食可诱导大鼠出现脂肪肝炎症反应损伤的病理状态。针对不同的实验指标,均匀设计各组数据(表3)经SPSS软件进行回归处理,得出均匀设计回归方程(表4)。其中, X_1 、 X_2 分别为绿原酸、栀子苷, Y 取最小值时,肝脏TG、血清LDL-C、CHO、AST、ALT的治疗效应均为最优,故推测绿原酸90mg+栀子苷90mg的剂量配比是其治疗脂肪肝的最佳剂量配比。基于均匀设计法优化的绿原酸-栀子苷的剂量配比,进一步运用高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型,对均匀

设计“筛选”实验所得结果进行验证(表2)。

表4 均匀设计回归分析结果

指标	回归方程	<i>R</i>	<i>P</i> 值	最优剂量配比
肝TG	$Y=4.896-233.911X_1X_2+3.174X_2$	0.983	0.000	绿原酸90mg+栀子苷90mg
血清LDL-C	$Y=1.062-3.409X_2-15.148X_1X_2$	0.952	0.868	
血清HDL-C	$Y=1.242+44.273X_1X_2$	0.007	0.025	
血清CHO	$Y=1.938-60.206X_1X_2$	0.834	0.039	
血清ALT	$Y=80.590-9.497.655X_1X_2$	0.978	0.001	
血清AST	$Y=87.561-6.861.980X_1X_2$	0.925	0.008	

2. 均匀设计验证实验

2.1 各组大鼠相关指标的变化 见表5。与正常组比较,模型组血清CHO、LDL-C、肝组织TG水平、血清ALT、AST活性均显著升高($P<0.01$),HDL-C显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,绿原酸-栀子苷组能明显降低血清CHO、LDL-C、肝组织TG水平($P<0.01$, $P<0.05$),提高血清HDL-C水平($P<0.05$);绿原酸组能明显降低血清LDL-C与肝组织TG水平($P<0.05$);栀子苷组能明显降低肝组织TG水平,升高血清HDL-C水平($P<0.05$);血脂康组能明显降低血清LDL-C水平($P<0.05$)。绿原酸-栀子苷组降低血清CHO与肝组织TG水平明显优于血脂康组($P<0.05$),栀子苷组降低肝组织TG水平明显优于血脂康组($P<0.05$)。与模型组比较,绿原酸组、栀子苷组、绿原酸-栀子苷组、血脂康组均可显著降低血清ALT、AST活性($P<0.05$, $P<0.01$),绿原酸-栀子苷组降低ALT活性明显优于绿原酸组($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠肝组织病理的变化 见图2。正常组、模型组大鼠肝组织病理与“筛选”实验基本相似。绿原酸-栀子苷组大鼠肝细胞肿胀程度及内含脂肪滴较模型组大为减少,肝小叶轮廓较为清晰,肝索排列较为有序。绿原酸组、栀子苷组、血脂康组镜下图像均较接近模型组而有所改善,细胞内脂滴数量有所减少,门管区炎性反应减轻。

表5 均匀设计验证实验各组大鼠相关指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝组织TG (mmol/L)	血清CHO (mmol/L)	血清LDL-C (mmol/L)	血清HDL-C (mmol/L)	血清ALT (U/L)	血清AST (U/L)
正常组	10	3.96±0.55	1.41±0.13	0.54±0.21	1.76±0.30	23.92±5.94	27.48±4.26
模型组	10	7.78±1.19**	2.07±0.36**	1.05±0.26**	1.08±0.32**	70.21±13.35**	91.60±23.62**
绿原酸组	10	6.45±0.67 [△]	1.82±0.38	0.77±0.23 [△]	1.31±0.63	48.93±6.79 [△]	44.85±11.46 ^{△△}
栀子苷组	10	6.24±0.74 [△]	1.84±0.14	0.86±0.10	1.70±0.56 [△]	30.96±6.88 ^{△△}	38.68±13.81 ^{△△}
绿原酸-栀子苷组	10	6.09±0.75 ^{△△}	1.67±0.16 [△]	0.78±0.16 [△]	1.51±0.19 [△]	28.96±7.88 ^{△△▲▲}	35.26±12.77 ^{△△}
血脂康组	10	7.23±0.26 ^{□■}	1.88±0.29 [■]	0.78±0.09 [△]	1.24±0.54	34.07±8.15 ^{△△}	35.93±9.94 ^{△△}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与绿原酸组比较,^{▲▲} $P<0.01$;与栀子苷组比较,[□] $P<0.05$;与绿原酸-栀子苷组比较,[■] $P<0.05$ 。

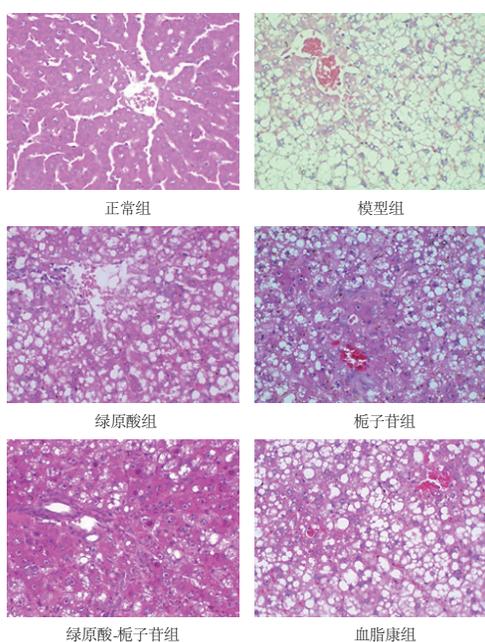


图2 验证实验各组大鼠肝组织HE染色(×200)

讨论

“均匀设计法”是一种将数论和多元统计相结合的实验设计方法,适用于多因素、多水平的实验研究。目前,均匀设计法被逐渐运用于中医药研究中,作为筛选中药复方物质基础或有效组分的现代技术手段之一^[4-5],其筛选作用的可靠性已初步得到验证。该法的运用可以简化实验操作,降低实验次数,并能定量地分析各因素对试验结果的影响,预报优化条件及优化结果的区间估计。在分析中药复方配伍规律的探索上,需要研究

各药味对复方药效的影响,此时应充分发挥均匀设计法多因素多水平的优势,借助其寻找出定量预报复方的剂量优化条件。

本研究旨在探索一种阐明中药有效成分组合剂量配比优化的思路与方法,以绿原酸-栀子苷组合为切入点,运用均匀设计法,通过多元逐步回归,从肝组织TG等多个指标观察该组合对脂肪肝的调节作用。实验结果显示,尽管所选指标有所不同,但是其筛选出最优剂量配比却如此一致,从回归方程可知,绿原酸与栀子苷的最优剂量均应取其实验范围内的最大值90mg,方为该中药有效成分组合治疗脂肪肝的最佳剂量配比,表明绿原酸-栀子苷组合存在特定的剂量配比规律,这将为今后开展中药有效成分复方的新型药物研发奠定一定的理论依据。

参考文献

- [1] 林曼婷,范应,陈少东,等.茵陈蒿汤调节高脂饮食诱导大鼠脂质代谢紊乱的作用机制.中华中医药杂志,2011,26(10):2428-2430
- [2] 陈少东,周海虹,李雪梅,等.茵陈蒿汤抗游离脂肪酸对HepG2细胞脂毒性作用的效应中药研究.中华中医药杂志,2010,25(9):1381-1383
- [3] 徐维佳,周海虹,陈少东.均匀设计在中药复方研究中的应用分析.中国实验方剂学杂志,2010,16(13):236-236
- [4] 高鹏,安宁飞,赵明宏,等.均匀设计在丹心痛最佳配比筛选中的应用.中草药,2003,34(2):123-125
- [5] 陈少东,胡义扬,冯琴,等.基于均匀设计的祛湿化痰复方抗脂毒性作用的主效应中药分析.中国中西医结合杂志,2008,28(5):422-426

(收稿日期:2016年1月12日)