

利用“层次分析”法对石榴叶鞣质及主要成分 减肥降脂活性的综合评价^{*}

□雷 帆 陶佳林 苏 慧 邢东明 林 晗 杜力军^{**}

(清华大学生物科学与技术系药物药理研究室 北京 100084)

摘 要:利用层次分析软件,采用半数有效量(EC_{50})作为评价参数,对石榴叶总鞣质及其主要成分的减肥降脂作用效果进行拟合,分析了各成分的综合作用,找出了总鞣质中最具代表性的单体成分SY1,并在此基础上进一步验证了层次法分析软件的适用性。结果表明该软件能够有效地反映被评价成分的综合药效,并具有准确、简便易行、易操作等特点。

关键词:药效评价 层次分析法 石榴叶 减肥降脂

建立科学规范的中药药效评价方法,全面、科学地评价中药中复杂成分的药效关系,是中药现代化研究领域的重大前沿课题之一。建立一个客观评价中药药效的方法,进而为国际所接受,无论是对提高中药在世界舞台上的竞争力,还是对完善治疗方法评价体系,都是非常重要的。

药物的疗效取决于其内在的物质基础。药物的化学成分组成极其复杂,各组分间会存在相互作用,药物的药效往往是各成分作用加和、协同和互补或拮抗的结果,同时由于各成分作用的多靶点性,很难用一个指标对某一或某些成分做出综合判断。采用经典的多元线性回归等统计建模方法也无法准确反映出中药各成

分和总体间的复杂关系。鉴于药物疗效所面对的对像是由各大系统组成的有机生命体,具有有序的递阶层次,我室陶佳林采用层次分析法,对各项权重进行估计,并通过判断实验数据的有效性对权重进行校正,得到每个层次的组合权重。将这些权重与各个成分药效的半数有效量(EC_{50})相乘,再归一化,得出最终的量化结果,最终实现对中药复杂体系中各个成分综合药效进行数学评判的目的^[1]。在此基础上,利用上述原理将其编成软件,采用菜单技术和人机对话方式,使数据输入更加方便,计算过程更加简单。

我室多年研究发现,石榴叶提取物具有较好的调节血脂作用,并确定其有效部位为总鞣质。总鞣质不但可以降低高脂模型动物的血脂,还有预防正常动物的血脂升高的作用^[2]。脂肪细胞在脂肪代谢中有着

收稿日期:2007-04-24

修回日期:2007-05-08

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30572340):用数学模型对石榴叶总鞣质及其主要活性成分对脂肪细胞作用的综合评价,负责人:杜力军。

^{**} 联系人:杜力军,本刊编委,教授,主要从事药理学研究,Tel/Fax:010-62773630,E-mail:lijundu@mail.tsinghua.edu.cn。

重要的地位,它可以分泌多种活性因子调节机体脂质的吸收和代谢。研究表明,减少脂肪细胞内脂质的贮存可以起到降低血脂,纠正糖脂代谢紊乱,缓解高脂对肝脏的毒性的作用^[3]。所以,我们采用脂肪细胞作为研究石榴叶总鞣质和其中主要单体成分(SY1,SY2 和 SY3)作用的靶细胞。我们研究了各个单体成分对脂肪细胞内脂质合成分解代谢的影响,利用该软件进行了拟合,分析了各组分在总鞣质减肥降脂中的作用,确定了其中的主要活性成分,并进一步验证了该软件的准确性和适用性。

一、实验材料和方法

1. 试剂、仪器与材料

(1) 试剂。

高糖 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基 (Gibco),地塞米松磷酸钠,中性胰岛素注射液,考马斯亮蓝 G250,磷酸二羟丙酮 (DHAP) 均为 Sigma 产品;脂肪乳注射剂购自广州绿十字药业有限公司 (12B0076SI-2);DNA Marker II 和 Trizol 均为天为时代公司产品。甘油和甘油三酯(TG)试剂盒购自北京中生物高技术公司(010401),禽类成髓细胞瘤病毒中逆转录酶 (Alfalfa mosaic virus, AMV) 一步法 RT-PCR 试剂盒为上海生工产品;其余试剂均为国产分析纯。

(2) 分析仪器。

TC-52/H 型基因扩增仪 (Bioer),酶标仪 (microplate reader, Model 550, Bio-Rad),DYCZ-40D 型转移电泳槽和 DYY-III-5 型水平电泳仪 (北京六一厂),凝胶成像分析系统 (上海复日),CO₂ 培养箱 (MCO-15AC)。

(3) 实验材料。

石榴叶采自山东枣庄,由本室向兰博士鉴定为石榴科植物石榴 *Punica granatum L.* 的干燥叶,其植物标本编号为 20001012。石榴叶鞣质,批号为 010203,总鞣质含量为 64%,其中 SY1 含量为 10%,SY2 含量为 3%,SY3 含量为 4%。SY1,批号:000811;SY2,批号:020412;SY3,批号:000318。均由本室向兰博士提供。

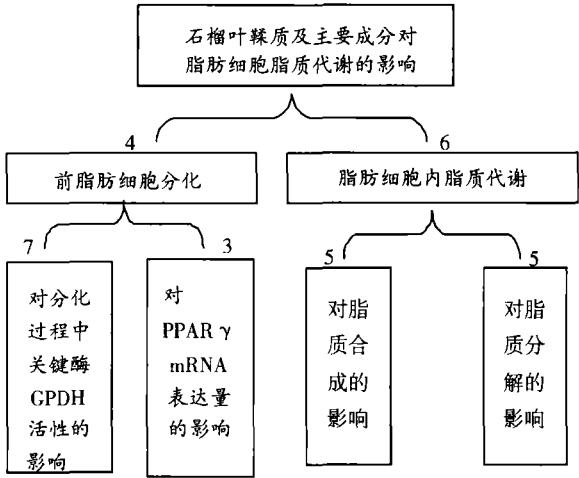
2. 实验方法

(1) 前脂肪细胞培养和诱导分化成脂肪细胞。

参照文献[3]的方法用组织块天花板贴壁培养法获得前脂肪细胞,以 1×10^5 个/mL 接种于培养瓶,在 37℃、5% CO₂ 条件下的细胞培养箱中培养。当前脂肪细胞达到接触抑制时,加入诱导培养基,诱导分化。诱导培养基包括:高糖 DMEM 培养基,含 10% 胎牛血清, 10^{-8} M 地塞米松和 0.5 U/mL 胰岛素。诱导分化到第 4 天可见前脂肪细胞内聚集大量脂滴,成为成熟脂肪细胞。

表 1 石榴叶鞣质及其中主要成分对脂肪细胞脂质代谢的 EC₅₀

药效	EC ₅₀ (μg/mL)			
	石榴叶鞣质	SY1	SY2	SY3
抑制胞内脂质量	6.03	1.84	0.35	9.82
抑制 LPL 活性	1.61	0.48	3.02	0.71
促进脂质分解	4.36	0.08	25.4	0.65
抑制 GPDH	9.47	0.70	3.10	3.14
抑制 PPAR γ mRNA 表达	3.09	0.15	2.81	3.21



注:图中数字表示同一层次中各个实验的权重

图 1 石榴叶鞣质及其中主要成分对脂肪细胞脂质代谢影响的递阶层次结构图

表 2 实验数据用层次分析法数学模型处理后最后结果

	石榴叶鞣质	SY1	SY 2	SY 3
得分	0.0685	0.6786	0.0801	0.1728
排序	4	1	3	2

注:SY1 得分最高 0.6786,排序第一。即以上述四方面综合评价,SY1 药效最好。

(2) 药物对脂肪细胞内脂质合成和分解的影响。

大鼠前脂肪细胞用诱导培养基培养 5 天后,加入不同浓度的药物,阳性对照组采用异丙肾上腺素 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,空白对照组加入同体积的 1% DMSO 溶液。细胞与药物共培养 10 天,隔日换培养液。细胞用 Kreb's Ringer 缓冲液冲洗后加入含肝素钠 $1\text{U}/\text{mL}$ 的 Kreb's Ringer 磷酸盐缓冲液,在 37°C 、 CO_2 条件下的培养箱中培养 30 min。吸取上清液,一部分用 Bradford 法测定蛋白质含量,另一部分加入预冷的脂肪乳溶液,用文献[4]的方法测定溶液中脂蛋白酯酶(LPL)活力。用甘油三酯试剂盒检测细胞内甘油三酯含量。每组设四个平行孔。结果表示药物对胞内脂质合成的影响。前脂肪细胞诱导分化 5 天后,加入不同浓度药物,药物与细胞共孵 8 h,取出培养基。用甘油试剂盒检测其中的甘油含量。计算药物对甘油释放的百分率,它代表药物对脂肪细胞内脂质分解的影响。

(3) 药物对前脂肪细胞分化的作用。

前脂肪细胞加入含药物的诱导培养基培养,阴性对照细胞换用基础 DMEM 培养基培养。药物与细胞共培养 10 天。破膜液破细胞膜检测其中甘油 3-磷酸脱氢酶(GPDH)活性^[5]。另取细胞破膜液,用 Bradford 法测定蛋白质含量,用 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表示。结果计算:GPDH 活力单位 $1\text{U} = 1\text{nM NADH 变化}/\text{min}$;GPDH 比活 = GPDH 活力/ μg 蛋白。细胞用含药物的诱导培养基培养 10 天。按照 Trizol 说明书操作方法提取细胞总 RNA 后,按照一步法 RT-PCR 试剂盒使用说明书操作扩增 PPAR γ mRNA。大鼠 PPAR γ 引物序列:5'-AGCAGAGCAAAGAGGTGG-3'和 5'-GATGGGCTTCACGTTTCAG-3';GAPDH 引物序列:5'-GACCACAGTCCATGCTCATCACT-3'和 5'-TCCACCACCTGTGCTGTA G-3'。

3. 结果统计分析

实验得到的数据经 EXCEL 软件进行统计学处理。数据表示为均数 $\pm$ 标准差,进行组间 t 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。各组均数与相应的对照组数据相比,得到抑制百分率或作用增加百分率,用序贯法求出各个药物的半数有效量(EC_{50}),将各成分的 EC_{50} 代入层次分析软件进行拟合。

建立降脂减肥相关药理作用的递阶层次结构,并对各层次结构的权重进行赋值。运行层次分析软件(HECP V1.0 版,由本室陶佳林博士编制),输入相应的数据和权重,得到最终综合分析结果。

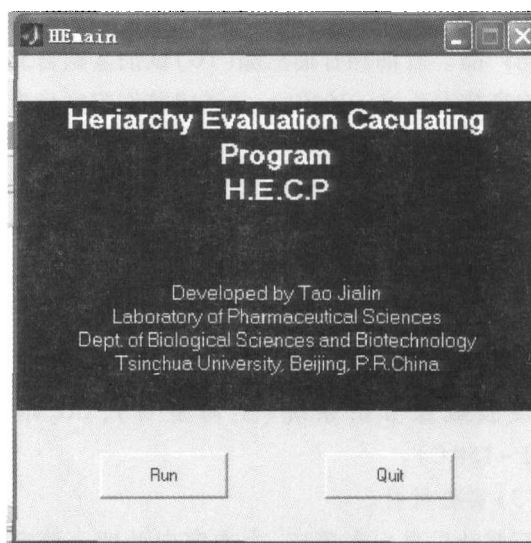
二、结果与分析

(1) 石榴叶鞣质、SY 1、SY 2 和 SY 3 在上述各个实验中的 EC_{50} 数据结果见表 1。表 1 显示,石榴叶鞣质中各个成分对脂肪细胞脂质代谢中的不同方面具有强弱不同的作用,每个单体都在不同的作用环节发挥最大的作用。

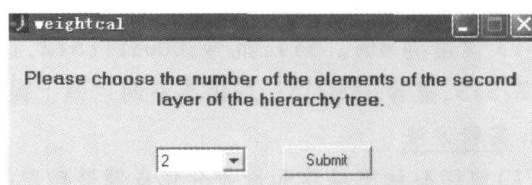
(2) 按照陶佳林方法建立问题的递阶层次结构及各个结构的权重。石榴叶鞣质及其中主要成分对脂肪细胞脂质代谢影响的递阶层次结构见图 1。

(3) 将石榴叶鞣质对脂代谢作用数据代入软件,通过数学拟合计算得到各个成分的得分和排名。程序运行过程如下。

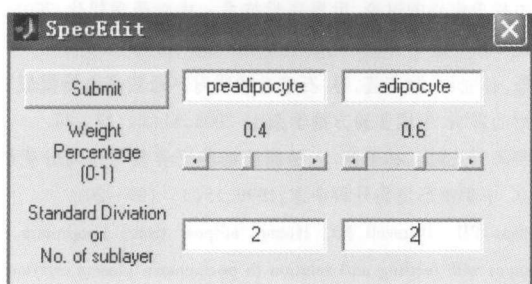
首先运行程序。



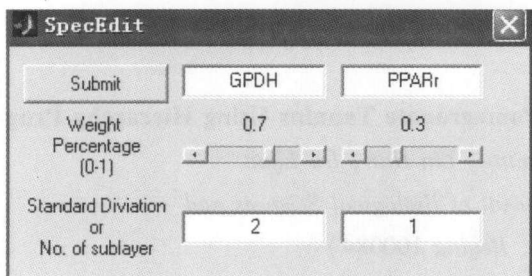
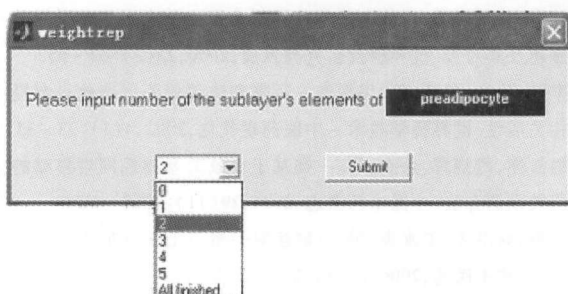
按照提示输入最高层次的平行元素的数目(本实验平行元数为 2)。



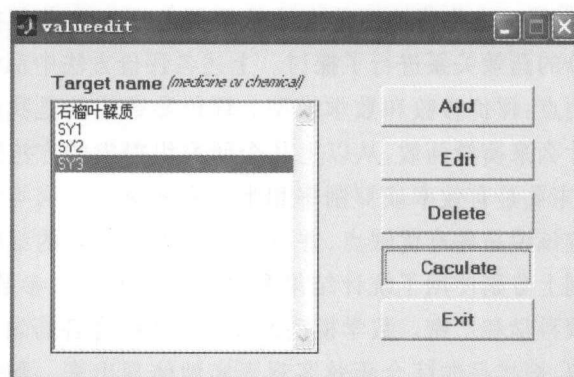
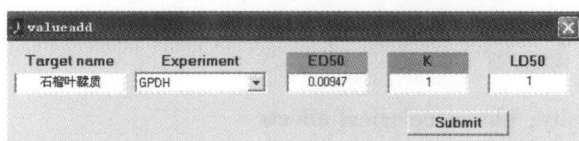
依次输入名称,对应权重比例(0.4:0.6)和下层次中元素量(下一层次中各有2个元素)。



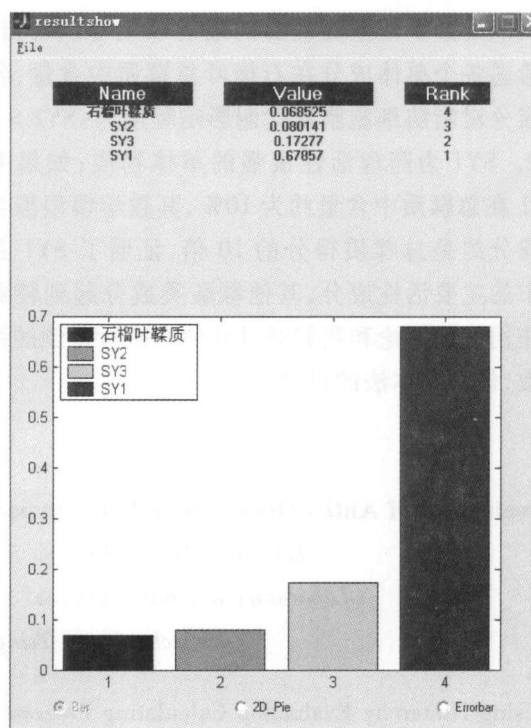
依次按照提示输入各元素对应的下层次名称和对应权重,直到输入全部层次。



依次输入各实验数据



最后检验数据输入正确,点击计算(caculate),得出最后结果(见表2)。



三、讨 论

我国的药理工作者就如何运用和运用何种数学模型评价中药药效进行了多方位的探讨,并提出了不同的药效评价方法,包括最早的水闸门法^[6],总分法^[7]和聚类-矩阵和法^[8],以及近年来发展起来的人工神经网络模型^[9]和非线性建模-多目标优化的三联

法^[10]等。这些药效评价方法从不同角度对中药复杂成分的药效关系进行了探讨。上述各评价方法中都包括两点:评价参数和数学模型。评价参数指的是我们以什么来衡量药效,从以上几个研究组提出的方法来看,主要是有效率或抑制率和半数有效量。这两类参数应该说是各有优缺点,并且各自在表现药效的细微差别上分别使用了统计结果和量效曲线的相关参数,比较科学和严密。数学模型的作用在于综合各药效参数值,把样品的综合药效客观真实地体现出来。陶佳林的层次分析法采用 EC_{50} 作为评价参数,而在数学模型上采用了矩阵理论。从目前初步的研究来看,矩阵法由于使用了公认的数学模型,因此比那些加减乘除显得更有说服力。

从上面数学模型处理后的最后结果可以看出,如果不考虑各个单体成分在石榴叶总鞣质中含量,各个单体成分对脂肪细胞脂质代谢影响程度为:SY1 > SY3 > SY2。SY1 为药理活性最强的单体物质;如果考虑到 SY1 在总鞣质中含量约为 10%,其数学模型拟合之后的得分约是总鞣质得分的 10 倍,证明了 SY1 是总鞣质中的主要活性成分,其他鞣酸类成分起到较弱的辅助作用。此结论和我们通过其他实验所得到的结果相一致,佐证了本法的科学性。

参考文献

- 1 陶佳林,赵玉男,王笑,等.利用“分层法”评价中药复杂体系药效时有关权重设立的讨论.世界科学技术-中医药现代化,2005,7(1):33~37.
- 2 孟甄,孙立红,陈芸芸,等.石榴叶鞣质对高血脂高血糖模型动物脂代谢的影响.中国实验方剂学杂志,2005,11(1):22~24.
- 3 朱晓海,何清廉,林子豪.人前脂肪细胞培养及增殖与分化模型的建立.中华整形烧伤外科杂志,1999,15(3):199~201.
- 4 Iverius PH, Brunzell JD. Human adipose tissue lipoprotein lipase: changes with feeding and relation to postheparin plasma enzyme. *Am J Physiol*, 1985, 249(1 Pt 1): E107~E114.
- 5 Sottile V, Seuwen K. A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal Biochem*, 2001, 293(1): 124~128.
- 6 王智民,杜力军,毕开顺.中药药效评价的“水闸门”法.世界科学技术-中医药现代化,2000,2(5):34~38.
- 7 杜力军,刑东明.当前中药新药研制中药理学应用基础研究的几个命题及其对策.世界科技研究与发展,2000,22(2):62~65.
- 8 李敏,孙虹,林佳,等.用聚类-矩阵和法评价不同产地丹参提取物相关活性.世界科学技术-中医药现代化,2002,4(1):33~35.
- 9 赵筱萍,范晓辉,余杰,等.一类基于组效关系神经网络模型的中药药效预测方法.中国中药杂志,2004,29(11):1082~1085.
- 10 王睿,商洪才,王永炎,等.三联法对丹参三七配比的多目标优化研究.天津中医药,2006,23(3):242~247.

An Evaluation of Anti-Obesity and Anti-hyperlipidemia of Pomegranate Tannins Using Hierarchy Program

Lei Fan, Tao Jialin, Su Hui, Xing Dongming, Lin Han, Du Lijun

(Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Using Hierarchy Evaluation Calculating Program (HECP) as a tool, a comprehensive pharmacological evaluation was made in vitro of the anti-obesity and anti-hyperlipidemia effects of total tannins and other medicinal elements in pomegranate leaves, based on EC_{50} as candidate data. Results showed that SY1 was a most important ingredient in the total tannins. The study also showed that the program was easy for operation with a clearly defined procedure and reliable results.

Keywords: hierarchy evaluation; pomegranate leaf; anti-obesity; pharmacological effects

(责任编辑:张述庆,责任译审:邹春申)