

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910141969. X

[51] Int. Cl.

A61K 36/734 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 2 日

[11] 公开号 CN 101590128A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 30/36 (2006.01)

[22] 申请日 2009.6.12

[21] 申请号 200910141969. X

[71] 申请人 刘 斌

地址 100102 北京市朝阳区望京中环南路 6 号

[72] 发明人 刘 斌 王 伟 石任兵 杨 英

权利要求书 4 页 说明书 23 页

[54] 发明名称

一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法

[57] 摘要

本发明公开了一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。该评价方法主要包括药效组分制备、供试品制备、调脂抗氧化生物效应测定、供试品生物效价比计算及统计学分析、供试品质量评价等。药效组分包括 2, 3, 5, 4' - 四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚和槲皮素, 其质量比为 7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5。质量评价指标包括: (1) 抗氧化指标: Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力, Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 培养液 NO、ET-1 含量, Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力; (2) 代谢物含量指标: Bel-7402 肝细胞内胆固醇含量, Bel-7402 肝细胞内外 TBA 含量。质量评价标准为: 生物效价比在 80%~120% 之间, 且经统计

学检验与效应标准无显著性差异, 为合格品; 生物效价比 < 80%, 或经统计学检验与效应标准有显著性差异, 为不合格品; 生物效价比 > 120%, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为优质品。

1、一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于该评价方法建立的基本程序为：

(1) 降脂宁组方药材（山楂、荷叶、何首乌、决明子）→ 制备工艺 → 降脂宁提取物 → 分离纯化，活性筛选 → 降脂宁有效部位 → 成分分析，活性评价 → 降脂宁药效组分；

(2) 待检样品 → 分离纯化 → 供试品；

(3) 降脂宁药效组分生物效应测定、供试品生物效应测定（平行操作）；

(4) 降脂宁药效组分生物效价比计算及统计学分析，确定药效组分效应标准及标准生物效应；

(5) 供试品效应与药效组分标准效应比较，供试品生物效价比计算及统计学分析（生物效价比 = 供试品效应/药效组分标准效应 × 100%）；

(6) 供试品质量评价。

2、一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于该方法包括药效组分制备、供试品制备、调脂抗氧化生物效应测定、供试品生物效价比计算及统计学分析、供试品质量评价等。

3、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于药效组分制备的方法为：精密称取2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚、槲皮素，按质量比7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5的比例混匀，用蒸馏水溶解（可加入少量二甲基亚砷助溶），配成相应浓度的储备液，用0.22 μm微孔滤膜过滤，4℃冰箱保存。

4、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于供试品制备的方法为：取待检样品，加水溶解分散，通过AB-8型或D-101型或HPD-300型大孔吸附树脂柱（树脂柱径高比为1:6~10），树脂体积（mL）与药量（g）之比为1:0.5~1.5。待吸附完成，水液全部通过树脂柱后，树脂柱先用3~6倍树脂体积水洗脱，水洗脱液弃去，树脂柱再用3~6倍树脂体积的40~70%乙醇洗脱。收集40~70%乙醇洗脱液，减压回收溶剂，50℃减压干燥，得供试品。取供试品用蒸馏水溶解后，配成相应浓度储备液，用0.22 μm微孔滤膜过滤，4℃冰箱保存。

5、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于抗氧化生物效应测定的方法为：

（1）细胞模型制备：选择人脐静脉血管内皮细胞株（HUVEC）EAHY926，用氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）制备HUVEC细胞损伤模型，Ox-LDL原始浓度为1~1.5mg/mL，临用时稀释至80~100 μg/mL；

（2）分组：包括空白对照组（仅加入无血清培养基），模型对照组（仅加入Ox-LDL100 μg/mL于无血清培养基），阿托伐他汀对照组（无血清培养基中含阿托伐他汀 1×10^{-7} mg/mL），供试品低、中、高剂量组（无血清培养基分别含供

试品 2×10^{-4} mg/mL、 2×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-2} mg/mL), 药效组分低、中、高剂量组(无血清培养基中分别含药效组分 1×10^{-4} mg/mL、 1×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-2} mg/mL);

(3) Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定: 选择人脐静脉血管内皮细胞株, 常规细胞培养, 用Ox-LDL进行氧化损伤造模, 经供试品及药效组分干预后, 噻唑蓝(MTT)比色法检测内皮细胞活力;

(4) Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)含量测定: 选择人脐静脉血管内皮细胞株, 常规细胞培养, 用Ox-LDL进行氧化损伤造模, 经供试品及药效组分干预后, 取培养上清液, 依法处理, 分光光度法检测NO含量、放射免疫分析法检测ET-1含量;

(5) Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力测定: 选择人脐静脉血管内皮细胞株, 常规细胞培养, 用Ox-LDL进行氧化损伤造模, 经供试品及药效组分干预后, 移除培养液, 依法处理, 分光光度法测定MDA含量、SOD活力。

6、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法, 其特征在于代谢物含量测定的方法为:

(1) 分组: 空白对照组(含2g/L牛血清白蛋白的1640培养液), 阿托伐他汀组(含2g/L牛血清白蛋白的1640培养液加 10^{-7} mg/mL阿托伐他汀), 供试品高、中、低剂量组(含2g/L牛血清白蛋白的1640培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 2×10^{-3} mg/mL、 2×10^{-4} mg/mL的供试品), 药效组分高、中、低剂量组(含2g/L牛血清白蛋白的1640培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 1×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-4} mg/mL的药效组分);

(2) Bel-7402肝细胞内胆固醇含量测定: Bel-7402细胞培养24h, 每孔加入1mL含有药物的无血清培养基, 培养24h, 移除培养基, 细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次, 每孔加入正己烷-异丙醇(3:2, V/V) 1mL, 室温下放置30min, 分取有机溶剂, 重复操作一次, 合并2次收集的有机溶剂, 置玻璃管内吹干, 用

200 μ L 甲醇复溶，依法测定胆固醇含量，提取了脂质的细胞加入0.1mol/L NaOH裂解，用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度；胆固醇含量采用HPLC法测定，色谱条件为：色谱柱：Hypersil APS2 C₁₈ (150mm \times 4.6mm, 5 μ m)；流动相：乙腈-异丙醇 (90:10)，流速：1.0mL/min，柱温：25 $^{\circ}$ C，检测波长：216nm；峰面积外标法定量，以mg/g细胞蛋白为单位；

(3) Bel-7402肝细胞内外总胆汁酸 (TBA) 含量测定：Bel-7402细胞在6孔板中培养24h，每孔加入1mL含有药物的无血清培养基，培养24h后，收集培养基，分装于EP管中，采用酶法TBA试剂盒测定TBA含量；将移除培养基的细胞，用PBS洗涤2次，每孔加入300 μ L含1%Triton-X100的双蒸水裂解后，收集液体，离心 (3000rpm, 10min)，分装于EP管中，采用酶法TBA试剂盒测定TBA含量，并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度，细胞内TBA含量用每克细胞蛋白所含TBA的 μ mol数表示。

7、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于其质量评价指标包括：(1) 抗氧化指标：Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力，Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量，Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力；(2) 代谢物含量指标：Bel-7402肝细胞内胆固醇含量，Bel-7402肝细胞内外TBA含量。

8、如权利要求2所述的一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法，其特征在于其质量评价标准为：生物效价比在80%~120%之间，且经统计学检验与效应标准无显著性差异，为合格品；生物效价比<80%，或经统计学检验与效应标准有显著性差异，为不合格品；生物效价比>120%，且经统计学检验与效应标准无显著性差异，为优质品。

一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法

技术领域

本发明涉及一种中药复方的生物效应质量评价方法，特别是涉及一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。

背景技术

降脂宁始载于《千金方》，现载于《中华人民共和国卫生部药品标准》（中药）第十三册，由山楂、制首乌、决明子、荷叶4味中药组成，具有温通经脉、扶正疏风、通经活络的功效。现代药理研究表明降脂宁具有降血脂、软化血管作用，临床使用广泛，疗效显著。但目前有关降脂宁的质量控制和评价方法，非常简单，仅有鉴别项（采用化学反应鉴别生物碱、蒽醌和黄酮）收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》（中药）第十三册降脂宁项下，水平很低，导致临床疗效不稳定，安全性存在隐患。因此，迫切需要建立降脂宁合理的质量评价体系，以改进药品生产工艺、提升药品质量、促进药品二次开发、实现药品的现代化，最终保证临床用药的安全有效。目前亦未见有关降脂宁质量评价方法的相关专利。

技术方案

本发明的目的在于提供一种中药复方的生物效应质量评价方法；本发明的目的还在于提供一种基于调脂抗氧化生物效应的中药复方质量评价方法；本发明的目的还在于提供一种基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价方法。

本发明基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价方法建立的基本程序如下：

(1) 降脂宁组方药材(山楂、荷叶、何首乌、决明子) → 制备工艺 → 降脂宁提取物 → 分离纯化, 活性筛选 → 降脂宁有效部位 → 成分分析, 活性评价 → 降脂宁药效组分。

(2) 待检样品 → 分离纯化 → 供试品。

(3) 降脂宁药效组分生物效应测定、供试品生物效应测定(平行操作)。

(4) 降脂宁药效组分生物效价比计算及统计学分析, 确定药效组分效应标准及标准生物效应。

(5) 供试品效应与药效组分标准效应比较, 供试品生物效价比计算及统计学分析(生物效价比 = 供试品效应/药效组分标准效应 × 100%)。

(6) 供试品质量评价。

质量评价标准: 生物效价比在80%~120%之间, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为合格品; 生物效价比<80%, 或经统计学检验与效应标准有显著性差异, 为不合格品; 生物效价比>120%, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为优质品。

本发明基于调脂抗氧化生物效应的降脂宁质量评价指标包括:

(1) 抗氧化指标: 氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)诱导损伤的人脐静脉血

管内皮细胞株 (HUVEC) 细胞活力; Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液一氧化氮 (NO)、内皮素-1(ET-1)含量; Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力。

(2) 代谢物含量指标: Bel-7402肝细胞内胆固醇含量; Bel-7402肝细胞内外总胆汁酸 (TBA) 含量。

本发明基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法为:

1. 药效组分制备

精密称取2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚、槲皮素, 按质量比7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5的比例混匀, 用蒸馏水溶解 (可加入少量二甲基亚砷助溶), 配成相应浓度的储备液, 用0.22μm微孔滤膜过滤, 4℃冰箱保存, 备用。

2. 供试品制备

取待检样品, 加水溶解分散, 通过AB-8型或D-101型或HPD-300型大孔吸附树脂柱 (树脂柱径高比为1:6~10), 树脂体积 (mL) 与药量 (g) 之比为1:0.5~1.5。待吸附完成, 水液全部通过树脂柱后, 树脂柱先用3~6倍树脂体积水洗脱, 水洗脱液弃去, 树脂柱再用3~6倍树脂体积的40~70%乙醇洗脱。收集40~70%乙醇洗脱液, 减压回收溶剂, 50℃减压干燥, 得供试品。取供试品用蒸馏水溶解后, 配成相应浓度储备液, 用0.22μm微孔滤膜过滤, 4℃冰箱保存, 备用。

3. 细胞培养

将冻存的人脐静脉血管内皮细胞株EAHY926置37℃水浴中复苏, 接种至培养皿中, 置37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养。待细胞长成致密单层后, 传代培养, 传代时弃去原培养基, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤两次, 加入胰酶-EDTA消化液 (0.125%/0.02%, 1:1) 消化5min左右, 在倒置显微镜下观察, 当出现细胞回缩或细胞间隙增大, 且有少量细胞悬浮时, 立即弃去消化液, 加入2倍于胰酶的完全培养基终止消化, 轻轻吹打细胞使成均匀的细胞悬液, 吸入离心管中离心 (1000rpm, 5min), 上清液弃去, 用完全培养基重悬细胞后进行细胞计数, 以1~2×10⁶个细胞/mL的密度接种于新的培养皿中培养。每2~3d换液一次, 长满后即可

再次传代。

将冻存的人肝细胞株Bel-7402置37℃水浴中复苏，按 2×10^5 /mL接种于25cm²培养瓶中，培养基为RPMI-1640完全培养基，其中含10%胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素。置37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养，每2~3d换液一次。待细胞铺满培养瓶80%以上时，用胰酶-EDTA（0.125%/0.02%，1:1）消化传代。选择对数生长期细胞用于实验。

4. 调脂抗氧化生物效应测定

分别取药效组分及供试品储备液配成相应剂量，按照下列测定指标平行进行调脂抗氧化效应测定。

4.1 抗氧化指标

4.1.1 细胞模型制备

用氧化型低密度脂蛋白（Ox-LDL）制备HUVEC细胞损伤模型。Ox-LDL原始浓度为1~1.5mg/mL，4℃冰箱保存，备用。临用时稀释至80~100μg/mL。

4.1.2 分组

空白对照组：仅加入无血清培养基；模型对照组：仅加入Ox-LDL100μg/mL于无血清培养基；阿托伐他汀对照组：无血清培养基中含阿托伐他汀 1×10^{-7} mg/mL；供试品低、中、高剂量组：无血清培养基分别含供试品 2×10^{-4} ， 2×10^{-3} ， 1×10^{-2} mg/mL；药效组分低、中、高剂量组：无血清培养基中分别含药效组分 1×10^{-4} ， 1×10^{-3} ， 1×10^{-2} mg/mL。

4.1.3 Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定

选择人脐静脉血管内皮细胞株（HUVEC）常规细胞培养，用Ox-LDL进行氧化损伤造模，用供试品及药效组分进行干预后，噻唑蓝（MTT）比色法检测内皮细胞活力。具体方法为：取培养后细胞，按100μL/孔（约 1×10^4 ）接种于96孔培养板中，按“4.1.2 分组”项下方法分为9组，每组6个平行孔。药物作用于细胞24h后，加入5mg/mL MTT 50μL继续培养4h，吸弃上清液，各孔加二甲基亚砜（DMSO）150μL，室温避光微振荡10min，使结晶充分溶解，用酶标仪在570nm处测定OD值。由下列公式计算内皮细胞活力：内皮细胞活力% = 实验组OD值/空白对照组OD值

×100%。

4.1.4 Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定

选择人脐静脉血管内皮细胞株（HUVEC），常规细胞培养，用Ox-LDL进行氧化损伤造模，用供试品及药效组分进行干预后，取培养上清液，按试剂盒说明书检测NO、ET-1含量。具体方法为：取培养后细胞，按 1×10^6 /mL接种于6孔板，置37℃、5%CO₂培养箱培养24h，弃去原培养基，按“4.1.2 分组”项下方法分为9组，每组3个平行孔，加入各药液，再置37℃、5%CO₂培养箱培养24h后，取各孔细胞培养上清液，2000rpm离心10min，取上清液分装于EP管中，4℃冰箱保存，备用。分别按试剂盒说明书用分光光度法检测NO含量、用放射免疫分析法检测ET-1含量。

4.1.5 Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定

选择人脐静脉血管内皮细胞株（HUVEC），常规细胞培养，用Ox-LDL进行氧化损伤造模，用供试品及药效组分进行干预后，移除培养液，按试剂盒说明书检测MDA含量、SOD活力。具体方法为：将移去培养基的细胞用胰酶-EDTA消化液消化，用PBS洗下细胞，1000rpm离心5min收集细胞。每孔收集的细胞，加入0.5mL双蒸水，用超声波粉碎仪粉碎细胞，3000rpm离心10min，取上清液分装于EP管中，4℃冰箱保存，备用。按试剂盒说明书用分光光度法分别测定MDA含量、SOD活力。

4.2 代谢物含量指标

4.2.1 分组

空白对照组：含2g/L牛血清白蛋白（BSA）的1640培养液；阿托伐他汀组：含2g/L BSA的1640培养液加 10^{-7} mg/mL阿托伐他汀；供试品高、中、低剂量组：含2g/L BSA的1640培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 2×10^{-3} mg/mL、 2×10^{-4} mg/mL的供试品；药效组分高、中、低剂量组：含2g/L BSA的1640培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 1×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-4} mg/mL的药效组分。每组做3个平行孔。

4.2.2 Bel-7402 肝细胞内胆固醇含量测定

Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h，将每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，移除培养基，细胞用 PBS 洗 2 次，每孔加入正己烷-异丙醇（3:2，V/V）1mL，室温下放置 30min，分取有机溶剂，重复操作一次。合并 2 次收集的有机溶剂，置玻璃管内吹干，用 200 μ L 甲醇复溶，测定胆固醇含量。提取了脂质的细胞加入 0.1mol/L NaOH 裂解后，用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。胆固醇含量采用 HPLC 法测定，色谱条件为：色谱柱：Hypersil APS2 C₁₈（150 mm \times 4.6mm，5 μ m）；流动相：乙腈-异丙醇（90:10），流速：1.0 mL \cdot min⁻¹，柱温：25 $^{\circ}$ C，检测波长：216nm；峰面积外标法定量，以 mg/g 细胞蛋白为单位。

4.2.3 Bel-7402肝细胞内外TBA含量测定

采用酶法TBA试剂盒测定。Bel-7402细胞在6孔板中培养24h后，每孔加入1mL含有各组药物的无血清培养基，培养24h后，收集培养基，分装于EP管中，测定培养基中TBA；将移除培养基的细胞，用PBS洗2次，每孔加入300 μ L含1%Triton-X100的双蒸水裂解后，收集液体，离心（3000rpm，10min），分装于EP管中，测定细胞内TBA，并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。细胞内TBA含量用每克细胞蛋白所含TBA的 μ mol数表示。

5 供试品生物效价比计算和统计学分析

将供试品经过与药效组分所确立的标准生物效应指标进行检测后，计算该供试品的生物效价比并进行统计学分析。

6 供试品质量评价

根据生物效价比及统计学分析结果进行供试品的质量评价。生物效价比范围及标准：效价比 $<$ 80%，或经统计学检验与效应标准有显著性差异，为不合格品；效价比在80%~120%之间，且经统计学检验与效应标准无显著性差异，为合格品；效价比 $>$ 120%，且经统计学检验与效应标准无显著性差异，为优质品。

实施例 1

1. 药效组分制备

精密称取 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡

荆素、大黄素甲醚、槲皮素，按质量比 7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5 的比例混匀，用蒸馏水溶解（可加入少量 DMSO 助溶），配成相应浓度的储备液，用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。

2. 供试品制备

取待检样品，加水溶解分散，通过 AB-8 型或 D-101 型或 HPD-300 型大孔吸附树脂柱（树脂柱径高比为 1:6~10），树脂体积（mL）与药量（g）之比为 1:0.5~1.5。待吸附完成，水液全部通过树脂柱后，树脂柱先用 3~6 倍树脂体积水洗脱，水洗脱液弃去，树脂柱再用 3~6 倍树脂体积的 40~70%乙醇洗脱。收集 40~70%乙醇洗脱液，减压回收溶剂，50 $^{\circ}$ C 减压干燥，得供试品。取供试品用蒸馏水溶解（可加入少量 DMSO 助溶），配成相应浓度储备液，用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。

3. 细胞培养及模型制备

常规培养 HUVEC 细胞和 Bel-7402 细胞。用 Ox-LDL 制备 HUVEC 细胞损伤模型，Ox-LDL 原始浓度为 1mg/mL，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。临用时稀释至 80 μ g/mL。

4. 分组

4.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞影响

细胞共分为9组。空白对照组：仅加入无血清培养基；模型对照组：仅加入 Ox-LDL 100 μ g/mL 于无血清培养基；阿托伐他汀对照组：无血清培养基中含阿托伐他汀 1×10^{-7} mg/mL；供试品低、中、高剂量组：无血清培养基分别含供试品 2×10^{-4} ， 2×10^{-3} ， 1×10^{-2} mg/mL；药效组分低、中、高剂量组：无血清培养基中分别含药效组分 1×10^{-4} ， 1×10^{-3} ， 1×10^{-2} mg/mL。

4.2 对 Bel-7402 细胞胆固醇代谢影响

细胞共分为8组。空白对照组：含 2g/L 牛血清白蛋白（BSA）的 1640 培养液；阿托伐他汀组：含 2g/L BSA 的 1640 培养液加 10^{-7} mg/mL 阿托伐他汀；供试品高、中、低剂量组：含 2g/L BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 2×10^{-3} mg/mL、 2×10^{-4} mg/mL 的供试品；药效组分高、中、低剂量组：含 2g/L BSA 的 1640 培养液分别加入终浓度为 1×10^{-2} mg/mL、 1×10^{-3} mg/mL、 1×10^{-4} mg/mL 的药效

组分。

5. 实验方法

5.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

MTT 比色法测定内皮细胞活力：取培养后细胞，按 100 μ L/孔（约 1×10^4 ）接种于 96 孔培养板中，按“4. 分组”项下方法分为 9 组，每组 4 个平行孔。药物作用于细胞 24h 后，加入 5mg/mL 的 MTT 50 μ L 继续培养 4h，吸弃上清液，各孔加 DMSO 150 μ L，室温避光微振荡 10min，使结晶充分溶解，用酶标仪在 570nm 处测定吸光度（OD）值。由下列公式计算内皮细胞活力：内皮细胞活力% = 实验组 OD 值/空白对照组 OD 值 \times 100%。

5.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 的 NO 及 ET-1 含量的影响

取培养后细胞，按 1×10^6 /mL 接种于 6 孔板，置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养 24h，弃去原培养基，按“4. 分组”项下方法分为 9 组，每组 3 个平行孔，加入各药液，再置 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养 24h 后，取各孔细胞培养上清液，离心（2000rpm，10min），取上清液分装于 EP 管中，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。按试剂盒说明书用分光光度法检测 NO 含量，用放射免疫分析法检测 ET-1 含量。

5.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 的 MDA 含量、SOD 活力的影响

将移去培养基的细胞用胰酶-EDTA 消化液消化，用 PBS 洗下细胞，1000rpm 离心 5min，收集细胞。每孔收集的细胞，加入 0.5mL 双蒸水，用超声波粉碎仪粉碎细胞，3000rpm 离心 10min，取上清液分装于 EP 管中，4 $^{\circ}$ C 冰箱保存，备用。按试剂盒说明书用分光光度法分别测定 MDA 含量和 SOD 活力。

5.4 对 Bel-7402 细胞内胆固醇（CHO）含量的影响

Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h，将每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基，培养 24h 后，移除培养基，细胞用 PBS 洗 2 次，每孔加入正己烷-异丙醇（3:2，V/V）1mL，室温下放置 30min，分取有机溶剂，重复操作一次。合并 2 次收集的有机溶剂，置玻璃管内吹干，用 200 μ L 甲醇复溶，测定胆固醇含量。提取了脂质的细胞加入 0.1mol/L NaOH 裂解后，用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。胆固醇含量采用 HPLC 法测定，色谱条件为：色谱柱：Hypersil APS2 C₁₈

(150 mm ×4.6mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-异丙醇 (90:10), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 25℃, 检测波长: 216nm; 峰面积外标法定量, 以 mg/g 细胞蛋白为单位。

5.5 对 Bel-7402 细胞内 TBA 含量的影响

采用酶法 TBA 试剂盒测定。Bel-7402 细胞在 6 孔板中培养 24h 后, 每孔加入 1mL 含有各组药物的无血清培养基, 培养 24h 后, 收集培养基, 分装于 EP 管中, 测定培养基中 TBA; 将移除培养基的细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 300 μ L 含 1%Triton-X100 的双蒸水裂解后, 收集液体, 3000rpm 离心 10min, 分装于 EP 管中, 测定细胞内 TBA, 并用蛋白定量试剂盒测定细胞总蛋白浓度。细胞内 TBA 含量用每克细胞蛋白所含 TBA 的 μ mol 数表示。

5.6 统计学分析及生物效价比计算

所有药效学实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

供试品的生物效价比 (简称效价比) = 供试品效应/药效组分效应 $\times 100\%$; 其中效价比1、2、3分别代表低、中、高三个剂量组的效价比; 统计学分析使用单因素方差分析, 以 $P > 0.05$ 表示无显著性差异。

6. 结果

6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

表1 供试品1对内皮细胞活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638 \pm 0.03	-
Ox-LDL组	0.281 \pm 0.02 ^{**}	44.04%
阿托伐他汀组	0.435 \pm 0.02 ^{***}	68.18%
药效组分低剂量组	0.415 \pm 0.02 ^{***}	65.05%
药效组分中剂量组	0.472 \pm 0.04 ^{***}	73.98%
药效组分高剂量组	0.513 \pm 0.06 ^{***}	80.41%
供试品1低剂量组	0.375 \pm 0.06 ^{**}	58.77%
供试品1中剂量组	0.475 \pm 0.03 ^{***}	74.45%
供试品1高剂量组	0.522 \pm 0.04 ^{***}	81.82%

注: VS对照组: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; VS Ox-LDL组: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; VS阿托伐他汀组: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; VS低剂量组: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; VS中剂量组: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。下表同。

6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

表2 供试品1对内皮细胞NO、ET-1含量的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}
药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{****▲}	5.20±1.07 ^{****}
供试品1低剂量组	3.52±0.26 ^{#ΔΔ}	12.34±0.85 ^Δ
供试品1中剂量组	4.26±0.26 ^{##}	10.67±1.37
供试品1高剂量组	5.19±0.26 ^{****}	7.75±1.12 ^{****}

6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

表3 供试品1对内皮细胞MDA含量、SOD活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15**	15.69±1.53**
阿托伐他汀组	1.15±0.04 ^{##}	21.53±0.35 ^{##}
药效组分低剂量组	1.85±0.24 ^{###ΔΔ}	18.9±0.47 ^{###}
药效组分中剂量组	1.64±0.07 ^{###ΔΔ}	22.12±0.21 ^{###}
药效组分高剂量组	1.37±0.08 ^{****}	23.07±0.9 ^{****}
供试品1低剂量组	1.73±0.07 ^{###ΔΔ}	18.68±0.48 ^{###Δ}
供试品1中剂量组	1.55±0.07 ^{###Δ}	21.58±0.92 ^{###}
供试品1高剂量组	1.34±0.05 ^{###}	23.45±0.69 ^{****}

6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

表4 供试品1对肝细胞内TBA、CHO含量的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 ^{ΔΔ}	255.6±4.65 ^{****ΔΔ}
药效组分中剂量组	6.41±0.13 ^{****}	228.7±24 ^{****ΔΔ}
药效组分高剂量组	6.86±0.04 ^{****}	178.2±3.65 ^{****ΔΔ}
供试品1低剂量组	6.01±0.23 ^Δ	460.9±50.35**
供试品1中剂量组	6.24±0.03**	391.7±2.8**

供试品1高剂量组	6.82±0.03 ^{****▲}	278.2±25 ^{**Δ▲▲}
----------	----------------------------	---------------------------

6.5 统计分析及生物效价比计算

(1) 抗氧化指标

① Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品1均可以提高损伤的HUVEC细胞活力。三个剂量组的细胞活力A值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比1 = $0.375/0.415 \times 100\% = 90.36\%$ 、效价比2 = $0.475/0.472 \times 100\% = 100.64\%$ 、效价比3 = $0.522/0.513 \times 100\% = 101.75\%$ 。

② Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定：中、高剂量组的供试品1可以增加损伤的HUVEC的NO的分泌，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $4.26/4.82 \times 100\% = 88.38\%$ 、效价比3 = $5.19/5.93 \times 100\% = 87.52\%$ 。高剂量组的供试品1可以降低损伤的HUVEC的ET-1含量，与降脂宁药效组分中剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比3 = $7.75/7.87 \times 100\% = 98.48\%$ 。

③ Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定：低、中、高剂量组的供试品1均可以减少损伤的HUVEC的MDA含量，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $1.73/1.85 \times 100\% = 93.51\%$ 、效价比2 = $1.55/1.64 \times 100\% = 94.51\%$ 、效价比3 = $1.34/1.37 \times 100\% = 97.81\%$ 。三个剂量组的供试品1均可以提高损伤的HUVEC的SOD活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $18.68/18.9 \times 100\% = 98.84\%$ 、效价比2 = $21.58/22.12 \times 100\% = 97.56\%$ 、效价比3 = $23.45/23.07 \times 100\% = 101.65\%$ 。

(2) 代谢物含量指标

① Bel-7402肝细胞内CHO含量测定：低、中、高剂量组的供试品1均可以降低细胞内CHO含量，其中高剂量组与降脂宁药效组分低剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比3 = $278.2/255.6 \times 100\% = 108.84\%$ 。

② Bel-7402肝细胞内TBA含量测定：中、高剂量组的供试品1可以升高细胞内

TBC含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $6.24/6.41 \times 100\% = 97.35\%$ 、效价比3 = $6.82/6.86 \times 100\% = 99.42\%$ 。

实施例 2

1. 药效组分制备：同实施例 1。
2. 供试品制备：同实施例 1。
3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。
4. 实验分组：同实施例 1。
5. 实验方法：同实施例 1。

6. 结果

6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

表5 供试品2对内皮细胞活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06****	80.41%
供试品2低剂量组	0.463±0.02***	72.57%
供试品2中剂量组	0.492±0.02***	77.12%
供试品2高剂量组	0.512±0.04***	80.25%

注：VS对照组：*P<0.05, **P<0.01；VS Ox-LDL组：[#]P<0.05, ^{##}P<0.01；VS阿托伐他汀组：[△]P<0.05, ^{△△}P<0.01；VS低剂量组：*P<0.05, **P<0.01；VS中剂量组：[▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。下表同。

6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

表6 供试品2对内皮细胞NO、ET-1含量的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}

药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{***★▲}	5.20±1.07 ^{***★}
供试品2低剂量组	3.71±0.26 ^{##△△}	10.15±0.56 [#]
供试品2中剂量组	4.08±0.26 ^{##}	8.42±0.86 ^{##}
供试品2高剂量组	4.63±0.26 ^{##}	6.17±0.30 ^{##★}

6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

表7 供试品2对内皮细胞MDA含量、SOD活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15 ^{**}	15.69±1.53 ^{**}
阿托伐他汀组	1.15±0.04 ^{##}	21.53±0.35 ^{##}
药效组分低剂量组	1.85±0.24 ^{##△△}	18.9±0.47 ^{***}
药效组分中剂量组	1.64±0.07 ^{##△}	22.12±0.21 ^{##★}
药效组分高剂量组	1.37±0.08 ^{##★}	23.07±0.9 ^{##★}
供试品2低剂量组	1.76±0.08 ^{##△△}	19.04±0.76 ^{***}
供试品2中剂量组	1.49±0.04 ^{##}	20.9±0.5 ^{***}
供试品2高剂量组	1.48±0.15 ^{##}	22.65±0.85 ^{##★}

6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

表8 供试品2对肝细胞内TBA、CHO含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	TBA (μmol/g.pr)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26 ^{**}	479.1±45.59 ^{**}
药效组分低剂量组	5.81±0.1 ^{△△}	255.6±4.65 ^{**△△}
药效组分中剂量组	6.41±0.13 ^{*★}	228.7±24 ^{**△△}
药效组分高剂量组	6.86±0.04 ^{***}	178.2±3.65 ^{**△△}
供试品2低剂量组	6.12±0.46	463.9±25.35 ^{**}
供试品2中剂量组	6.55±0.03 [*]	364.2±15.1 ^{**△△★}
供试品2高剂量组	6.63±0.46 ^{***★▲}	180.7±23.65 ^{**△△★▲▲}

6.5 统计分析及生物效价比计算

(1) 抗氧化指标

① Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品2均可以提高损伤的HUVEC细胞活力。三个剂量组的细胞活力A值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比1 = 0.463/0.415×100% =

111.57%、效价比2 = $0.492/0.472 \times 100\% = 104.24\%$ 、效价比3 = $0.512/0.513 \times 100\% = 99.81\%$ 。

② Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定：低、中、高剂量组的供试品2均可以增加损伤的HUVEC细胞NO的分泌，其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $3.71/4.63 \times 100\% = 80.13\%$ 、效价比2 = $4.08/4.82 \times 100\% = 84.65\%$ 。低、中、高剂量组的供试品2可以降低损伤的HUVEC细胞ET-1含量，其中中、高剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $8.42/7.87 \times 100\% = 106.99\%$ 、效价比3 = $6.17/5.2 \times 100\% = 118.65\%$ 。

③ Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定：低、中、高剂量组的供试品2均可以减少损伤的HUVEC的MDA含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $1.76/1.85 \times 100\% = 95.14\%$ 、效价比2 = $1.49/1.64 \times 100\% = 90.85\%$ 、效价比3 = $1.48/1.37 \times 100\% = 108.03\%$ 。三个剂量组的供试品2均可以提高损伤的HUVEC的SOD活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $19.04/18.9 \times 100\% = 100.74\%$ 、效价比2 = $20.9/22.12 \times 100\% = 94.48\%$ 、效价比3 = $22.65/23.07 \times 100\% = 98.18\%$ 。

(2) 代谢物含量指标

① Bel-7402肝细胞内CHO含量测定：低、中、高剂量组的供试品2均可以降低细胞内CHO含量，其中高剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比3 = $180.7/178.2 \times 100\% = 101.4\%$ 。

② Bel-7402肝细胞内TBA含量测定：中、高剂量组的供试品2可以升高细胞内TBC含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $6.55/6.41 \times 100\% = 102.18\%$ 、效价比3 = $6.63/6.86 \times 100\% = 96.65\%$ 。

实施例 3

1. 药效组分制备：同实施例 1。
2. 供试品制备：同实施例 1。
3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。

4. 实验分组：同实施例 1。

5. 实验方法：同实施例 1。

6. 结果

6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

表9 供试品3对内皮细胞活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***★	80.41%
供试品3低剂量组	0.441±0.02***	69.12%
供试品3中剂量组	0.468±0.01***	73.35%
供试品3高剂量组	0.535±0.03***Δ★	83.86%

注：VS对照组：*P<0.05, **P<0.01；VS Ox-LDL组：[#]P<0.05, ^{##}P<0.01；VS阿托伐他汀组：^ΔP<0.05, ^{ΔΔ}P<0.01；VS低剂量组：*P<0.05, **P<0.01；VS中剂量组：[▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。下表同。

6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

表10 供试品3对内皮细胞NO、ET-1含量的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}
药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{***★▲}	5.20±1.07 ^{***★}
供试品3低剂量组	4.08±0.26 ^{##}	11.1±0.99
供试品3中剂量组	4.63±0.26 ^{##}	9.21±0.94 ^{##}
供试品3高剂量组	5.00±0.00 ^{##}	5.45±0.94 ^{***★}

6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

表 11 供试品 3 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
----	---------------	------------

空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15**	15.69±1.53**
阿托伐他汀组	1.15±0.04##	21.53±0.35##
药效组分低剂量组	1.85±0.24## $\Delta\Delta$	18.9±0.47**
药效组分中剂量组	1.64±0.07## Δ	22.12±0.21##
药效组分高剂量组	1.37±0.08##*	23.07±0.9##**
供试品3低剂量组	1.70±0.15## $\Delta\Delta$	18.77±1.14**
供试品3中剂量组	1.67±0.11## Δ	21.13±0.86##
供试品3高剂量组	1.52±0.08##	23.94±1.59##**

6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

表12 供试品3对肝细胞内TBA、CHO含量的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=3)

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 $\Delta\Delta$	255.6±4.65** $\Delta\Delta$
药效组分中剂量组	6.41±0.13***	228.7±24** $\Delta\Delta$
药效组分高剂量组	6.86±0.04****	178.2±3.65** $\Delta\Delta$ *
供试品3低剂量组	6.16±0.02*	269.6±4.25** $\Delta\Delta$
供试品3中剂量组	6.43±0.07**	196.1±26.85** $\Delta\Delta$
供试品3高剂量组	7.89±0.21** $\Delta\Delta$ ** $\blacktriangle\blacktriangle$	135.8±1.8** $\Delta\Delta$ **

6.5 统计分析及生物效价比计算

(1) 抗氧化指标

① Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品3均可以提高损伤的HUVEC细胞活力。三个剂量组的细胞活力A值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比1 = $0.441/0.415 \times 100\% = 106.27\%$ 、效价比2 = $0.468/0.472 \times 100\% = 99.15\%$ 、效价比3 = $0.535/0.513 \times 100\% = 104.29\%$ 。

② Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定：低、中、高剂量组的供试品3均可以增加损伤的HUVEC细胞NO的分泌，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $4.08/4.63 \times 100\% = 88.12\%$ 、效价比2 = $4.63/4.82 \times 100\% = 96.06\%$ 、效价比3 = $5.00/5.93 \times 100\% =$

84.32%。中、高剂量组的供试品3可以降低损伤的HUVEC细胞ET-1含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $9.21/7.87 \times 100\% = 117.03\%$ 、效价比3 = $5.45/5.2 \times 100\% = 104.81\%$ 。

③ Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定：低、中、高剂量组的供试品3均可以减少损伤的HUVEC的MDA含量，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $1.7/1.85 \times 100\% = 91.89\%$ 、效价比2 = $1.67/1.64 \times 100\% = 101.83\%$ 、效价比3 = $1.52/1.37 \times 100\% = 110.95\%$ 。中、高剂量组的供试品3可以提高损伤的HUVEC的SOD活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $21.13/22.12 \times 100\% = 95.52\%$ 、效价比3 = $23.94/23.07 \times 100\% = 103.77\%$ 。

(2) 代谢物含量指标

① Bel-7402肝细胞内CHO含量测定：低、中、高剂量组的供试品3均可以降低细胞内CHO含量，其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $269.6/255.6 \times 100\% = 105.48\%$ 、效价比2 = $196.1/228.7 \times 100\% = 85.75\%$ 。

② Bel-7402肝细胞内TBA含量测定：中、高剂量组的供试品3可以升高细胞内TBC含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $6.43/6.41 \times 100\% = 100.31\%$ 、效价比3 = $7.89/6.86 \times 100\% = 115.01\%$ 。

实施例 4

1. 药效组分制备：同实施例 1。
2. 供试品制备：同实施例 1。
3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。
4. 实验分组：同实施例 1。
5. 实验方法：同实施例 1。

6. 结果

6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

表13 供试品4对内皮细胞活力的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=4)

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06**	80.41%
供试品4低剂量组	0.413±0.05***	64.73%
供试品4中剂量组	0.447±0.05***	70.06%
供试品4高剂量组	0.544±0.04***	85.27%

注: VS对照组: *P<0.05, **P<0.01; VS Ox-LDL组: [#]P<0.05, ^{##}P<0.01; VS阿托伐他汀组: ^ΔP<0.05, ^{ΔΔ}P<0.01; VS低剂量组: *P<0.05, **P<0.01; VS中剂量组: [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。下表同。

6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

表14 供试品4对内皮细胞NO、ET-1含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	NO (μmol/L)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26**	14.80±1.68**
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}
药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{***▲}	5.20±1.07 ^{***}
供试品4低剂量组	3.71±0.26 ^{#Δ}	12.51±2.56 ^Δ
供试品4中剂量组	4.45±0.45 ^{##}	9.29±1.21 [#]
供试品4高剂量组	5.19±0.26 ^{***}	5.83±0.86 ^{***}

6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

表15 供试品4对内皮细胞MDA含量、SOD活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15**	15.69±1.53**
阿托伐他汀组	1.15±0.04 ^{##}	21.53±0.35 ^{##}
药效组分低剂量组	1.85±0.24 ^{##ΔΔ}	18.9±0.47 ^{***Δ}
药效组分中剂量组	1.64±0.07 ^{##ΔΔ}	22.12±0.21 ^{##*}
药效组分高剂量组	1.37±0.08 ^{***}	23.07±0.9 ^{***}
供试品4低剂量组	1.73±0.07 ^{##ΔΔ}	19.76±0.38 ^{***}
供试品4中剂量组	1.37±0.08 ^{##}	21.56±0.73 ^{##}

供试品4高剂量组	1.30±0.05 ^{##*}	23.12±0.34 ^{##**}
----------	--------------------------	----------------------------

6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

表16 供试品4对肝细胞内TBA、CHO含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26 [*]	479.1±45.59 ^{**}
药效组分低剂量组	5.81±0.1	255.6±4.65 ^{**Δ}
药效组分中剂量组	6.41±0.13 [*]	228.7±24 ^{**Δ}
药效组分高剂量组	6.86±0.04 ^{**[*]}	178.2±3.65 ^{**Δ}
供试品4低剂量组	6.22±0.53	271.8±6.55 ^{**Δ}
供试品4中剂量组	6.26±0.18	192.9±32.1 ^{**Δ*}
供试品4高剂量组	6.66±0.58 [*]	120.8±8.1 ^{**Δ**}

6.5 统计分析及生物效价比计算

(1) 抗氧化指标

① Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品4均可以提高损伤的HUVEC细胞活力。三个剂量组的细胞活力A值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比1 = $0.413/0.415 \times 100\% = 99.52\%$ 、效价比2 = $0.447/0.472 \times 100\% = 94.7\%$ 、效价比3 = $0.544/0.513 \times 100\% = 106.04\%$ 。

② Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定：低、中、高剂量组的供试品4均可以增加损伤的HUVEC细胞NO的分泌，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $3.71/4.63 \times 100\% = 80.13\%$ 、效价比2 = $4.45/4.82 \times 100\% = 92.32\%$ 、效价比3 = $5.19/5.93 \times 100\% = 87.52\%$ 。中、高剂量组的供试品4可以降低损伤的HUVEC细胞ET-1含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $9.29/7.87 \times 100\% = 118.04\%$ 、效价比3 = $5.83/5.2 \times 100\% = 112.12\%$ 。

③ Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定：低、中、高剂量组的供试品4均可以减少损伤的HUVEC的MDA含量，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $1.73/1.85 \times 100\%$

= 93.51%、效价比2 = $1.37/1.64 \times 100\% = 83.54\%$ 、效价比3 = $1.39/1.37 \times 100\% = 101.46\%$ 。三个剂量组的供试品4均可以提高损伤的HUVEC的SOD活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $19.76/18.9 \times 100\% = 104.55\%$ 、效价比2 = $21.56/22.12 \times 100\% = 97.47\%$ 、效价比3 = $23.12/23.07 \times 100\% = 100.22\%$ 。

(2) 代谢物含量指标

① Bel-7402肝细胞内CHO含量测定：低、中、高剂量组的供试品4均可以降低细胞内CHO含量，其中低、中剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $271.8/255.6 \times 100\% = 106.34\%$ 、效价比2 = $192.9/228.7 \times 100\% = 84.35\%$ 。

② Bel-7402肝细胞内TBA含量测定：中、高剂量组的供试品4可以升高细胞内TBC含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $6.26/6.41 \times 100\% = 97.66\%$ 、效价比3 = $6.66/6.86 \times 100\% = 97.08\%$ 。

实施例 5

1. 药效组分制备：同实施例 1。
2. 供试品制备：同实施例 1。
3. 细胞培养及模型制备：同实施例 1。
4. 实验分组：同实施例 1。
5. 实验方法：同实施例 1。

6. 结果

6.1 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞活力的影响

表17 供试品5对内皮细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***	80.41%

供试品5低剂量组	0.409±0.02 ^{***}	64.1%
供试品5中剂量组	0.466±0.03 ^{***}	73.04%
供试品5高剂量组	0.527±0.02 ^{***Δ**}	82.52%

注: VS对照组: *P<0.05, **P<0.01; VS Ox-LDL组: [#]P<0.05, ^{##}P<0.01; VS阿托伐他汀组: ^ΔP<0.05, ^{ΔΔ}P<0.01; VS低剂量组: *P<0.05, **P<0.01; VS中剂量组: [▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01。下表同。

6.2 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 NO、ET-1 含量的影响

表18 供试品5对内皮细胞NO、ET-1含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (pg/mL)
空白对照组	4.08±0.32	8.22±1.19
Ox-LDL组	2.41±0.26 ^{**}	14.80±1.68 ^{**}
阿托伐他汀组	5.00±0.45 ^{##}	7.21±0.88 ^{##}
药效组分低剂量组	4.63±0.26 ^{##}	10.99±1.78
药效组分中剂量组	4.82±0.26 ^{##}	7.87±0.84 ^{##}
药效组分高剂量组	5.93±0.26 ^{***★▲}	5.20±1.07 ^{***★}
供试品5低剂量组	3.77±0.26 ^{#Δ}	10.99±1.46
供试品5中剂量组	4.08±0.26 ^{##}	9.03±1.36 ^{##}
供试品5高剂量组	5.09±0.45 ^{##★}	5.75±0.66 ^{##★}

6.3 对 Ox-LDL 诱导损伤的 HUVEC 细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响

表 19 供试品 5 对内皮细胞 MDA 含量、SOD 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
空白对照组	1.46±0.07	24.21±0.47
Ox-LDL组	2.49±0.15 ^{**}	15.69±1.53 ^{**}
阿托伐他汀组	1.15±0.04 ^{##}	21.53±0.35 ^{##}
药效组分低剂量组	1.85±0.24 ^{##ΔΔ}	18.9±0.47 ^{***Δ}
药效组分中剂量组	1.64±0.07 ^{##Δ}	22.12±0.21 ^{##★}
药效组分高剂量组	1.37±0.08 ^{##★}	23.07±0.9 ^{##★}
供试品5低剂量组	1.85±0.24 ^{##ΔΔ}	19.67±0.3 ^{***}
供试品5中剂量组	1.58±0.04 ^{##}	22.55±0.34 ^{##★}
供试品5高剂量组	1.37±0.08 ^{##★}	24.24±0.6 ^{##ΔΔ★}

6.4 对 Bel-7402 肝细胞内 CHO、TBA 含量的影响

表20 供试品5对肝细胞内TBA、CHO含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	TBA ($\mu\text{mol/g.pr}$)	CHO (mg/g.pr)
----	------------------------------	---------------

空白对照组	5.58±0.23	683.1±29.54
阿托伐他汀组	6.6±0.26**	479.1±45.59**
药效组分低剂量组	5.81±0.1 [△]	255.6±4.65** ^{△△}
药效组分中剂量组	6.41±0.13**	228.7±24** ^{△△}
药效组分高剂量组	6.86±0.04***	178.2±3.65** ^{△△}
供试品5低剂量组	6.23±0.07	262.9±1.1** ^{△△}
供试品5中剂量组	7.17±0.21***	143±3.55** ^{△△*}
供试品5高剂量组	7.27±0.57***	120.3±1.85** ^{△△**}

6.5 统计分析及生物效价比计算

(1) 抗氧化指标

① Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力测定：低、中、高剂量组的供试品5均可以提高损伤的HUVEC细胞活力。三个剂量组的细胞活力A值分别与降脂宁药效组分相应剂量组的效应值相比无显著性差异，效价比1 = $0.409/0.415 \times 100\% = 98.55\%$ 、效价比2 = $0.466/0.472 \times 100\% = 98.73\%$ 、效价比3 = $0.527/0.513 \times 100\% = 102.73\%$ 。

② Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量测定：低、中、高剂量组的供试品5均可以增加损伤的HUVEC细胞NO的分泌，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $3.77/4.63 \times 100\% = 81.43\%$ 、效价比2 = $4.08/4.82 \times 100\% = 84.65\%$ 、效价比3 = $5.09/5.93 \times 100\% = 85.83\%$ 。中、高剂量组的供试品5可以降低损伤的HUVEC细胞ET-1含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $9.03/7.87 \times 100\% = 114.74\%$ 、效价比3 = $5.75/5.2 \times 100\% = 110.58\%$ 。

③ Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力测定：低、中、高剂量组的供试品5均可以减少损伤的HUVEC的MDA含量，三个剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $1.85/1.85 \times 100\% = 100\%$ 、效价比2 = $1.58/1.64 \times 100\% = 96.34\%$ 、效价比3 = $1.37/1.37 \times 100\% = 100\%$ 。三个剂量组的供试品5均可以提高损伤的HUVEC的SOD活力，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $19.67/18.9 \times 100\% = 104.07\%$ 、效价比2 = $22.55/22.12 \times 100\% = 101.94\%$ 、效价比3 = $24.24/23.07 \times 100\% =$

105.07%。

(2) 代谢物含量指标

① Bel-7402肝细胞内CHO含量测定：低、中、高三个剂量组的供试品5均可以降低细胞内CHO含量，其中低剂量组与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比1 = $262.9/228.7 \times 100\% = 114.95\%$ 。

② Bel-7402肝细胞内TBA含量测定：中、高剂量组的供试品5可以升高细胞内TBC含量，与降脂宁药效组分相应剂量组的生物效应值相比无显著性差异，效价比2 = $7.17/6.41 \times 100\% = 111.86\%$ 、效价比3 = $7.27/6.86 \times 100\% = 105.98\%$ 。

专利名称(译)	一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法		
公开(公告)号	CN101590128A	公开(公告)日	2009-12-02
申请号	CN200910141969.X	申请日	2009-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	刘斌		
申请(专利权)人(译)	刘斌		
当前申请(专利权)人(译)	刘斌		
[标]发明人	刘斌 王伟 石任兵 杨英		
发明人	刘斌 王伟 石任兵 杨英		
IPC分类号	A61K36/734 A61P39/06 A61P3/06 G01N1/28 G01N21/31 G01N33/53 G01N30/36		
其他公开文献	CN101590128B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于调脂抗氧化效应的降脂宁质量评价方法。该评价方法主要包括药效组分制备、供试品制备、调脂抗氧化生物效应测定、供试品生物效价比计算及统计学分析、供试品质量评价等。药效组分包括2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、金丝桃苷、荷叶碱、牡荆素、大黄素甲醚和槲皮素, 其质量比为7~8:2~3:0.5~1:0.2~0.5:0.5~1:0.5~1.5。质量评价指标包括:(1)抗氧化指标: Ox-LDL诱导损伤的HUVEC细胞活力, Ox-LDL诱导损伤的HUVEC培养液NO、ET-1含量, Ox-LDL诱导损伤的HUVEC内皮细胞MDA含量、SOD活力;(2)代谢物含量指标: Bel-7402肝细胞内胆固醇含量, Bel-7402肝细胞内外TBA含量。质量评价标准为: 生物效价比在80%~120%之间, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为合格品; 生物效价比<80%, 或经统计学检验与效应标准有显著性差异, 为不合格品; 生物效价比>120%, 且经统计学检验与效应标准无显著性差异, 为优质品。

组别	OD值	细胞活力 (%)
空白对照组	0.638±0.03	-
Ox-LDL组	0.281±0.02**	44.04%
阿托伐他汀组	0.435±0.02***	68.18%
药效组分低剂量组	0.415±0.02***	65.05%
药效组分中剂量组	0.472±0.04***	73.98%
药效组分高剂量组	0.513±0.06***	80.41%
供试品1低剂量组	0.375±0.06**	58.77%
供试品1中剂量组	0.475±0.03***	74.45%
供试品1高剂量组	0.522±0.04***	81.82%