

· 论著 ·

冬虫夏草及人工虫草抗肝纤维化作用谱效关系研究

吴素体 白金霞 王冶 戴领 吕青远 于超 韩晋 袁海龙

【摘要】 目的 研究冬虫夏草及人工虫草的高效液相色谱指纹图谱与其抗肝纤维化药效的相关性,以揭示其抗肝纤维化作用的“药效成分组”。**方法** 考察虫草高效液相色谱指纹图谱较优的测定分析方法,通过该 HPLC 测定分析法得到冬虫夏草、发酵虫草菌粉、百令胶囊及蛹虫草菌粉胶囊的指纹图谱,找出特征共有峰,以 LX-2 肝星状细胞系为模型研究其对肝纤维细胞的抑制效果,用 Pearson 相关分析研究谱效相关性。**结果** 冬虫夏草、发酵虫草菌粉、百令胶囊及蛹虫草菌粉胶囊的高效液相色谱指纹图谱中共有 10 个特征共有峰,其中 4、5、10 号峰与肝星状细胞(LX-2)细胞抑制效果(OD 值)相关性最好。**结论** 冬虫夏草、发酵虫草菌粉及蛹虫草菌粉胶囊对 LX-2 细胞均有抑制效果,冬虫夏草及人工虫草 HPLC 指纹图谱与其抗肝纤维化作用之间有一定对应关系,可以作为目前冬虫夏草及人工虫草抗肝纤维化作用的质量控制的有效方法。

【关键词】 冬虫夏草; 人工虫草; 指纹图谱; 抗肝纤维作用; 相关分析; 谱效关系

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.11.001

Spectrum-effect relationship on anti-hepatic fibrosis efficacy of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia WU Su-ti, BAI Jin-xia, WANG Ye, et al. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China.

Corresponding author: YUAN Hai-long, E-mail: yhlpharm@126.com. HAN Jin, E-mail: hanjin302emba@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between HPLC of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia and anti-hepatic fibrosis efficacy, in order to establish “active component group for reducing phlegm”. **Methods** HPLC was adopted to determine and analyze HPLC fingerprints of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia, then identify the characteristic peaks. Use the LX-2 hepatic stellate cells as a hepatic fibrosis model of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia on the inhibitory effect. Then the correlation analysis was used to study the spectrum-effect relationship. **Results** The anti-hepatic fibrosis efficacy of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia were resulted from the combined effect of a variety of ingredients. it was tentatively concluded that peaks 4、5、10 related best to LX-2 cells inhibitory effect-OD value in 10 characteristic peaks. **Conclusion** Cordyceps sinensis and its cultured mycelia can inhibit LX-2 hepatic stellate cell proliferation in some extent. There may be certain relationship between their HPLC fingerprint and anti-hepatic fibrosis efficacy. This research can be used as the quality control method of Cordyceps sinensis and its cultured mycelia when they were used for liver fibrosis.

【Key words】 Cordyceps sinensis; Cultured mycelia; Fingerprint; Anti-hepatic fibrosis efficacy; Correlation analysis; Spectrum-activity relationship

基金项目:国家科技重大专项“重大新药创制”专项(2011ZX09201-201-14)(2011ZX09201-201-35);国家自然科学基金(81073069)

作者单位:100039 北京,中国人民解放军第三〇二医院药学部(吴素体、白金霞、王冶、戴领、吕青远、于超、韩晋、袁海龙);成都中医药大学药学院(白金霞、戴领)

作者简介:吴素体(1972-),女,本科,主管药师。研究方向:中药制剂制备工艺研究。E-mail:jxbaitree@163.com

通讯作者:袁海龙(1970-),博士,中华中医药学会方药全效研究分会常委,中药上市再评价专业委员会理事。研究方向:中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail:yhlpharm@126.com;韩晋(1959-),硕士,主任药师,中国药学会(感染专业委员会)副主任委员。研究方向:新药制剂与新技术研究。E-mail:hanjin302emba@163.com。袁海龙与韩晋并列为本文通讯作者。

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 为麦角科真菌寄生在鳞翅目蝙蝠蛾科昆虫蝙蝠蛾幼虫上的干燥子座和虫体,具“保肺益肾,止血化痰,已劳嗽”之功,主产于我国青海、西藏、四川、云南等省海拔 3500 ~ 5000 米的高原高寒草甸,药理研究表明冬虫夏草具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗氧化等多种药理作用^[1],近年来的研究发现冬虫夏草单用或配伍应用具有良好的抗肝纤维化作用^[2-4],冬虫夏草资源奇缺,近年来人工培养冬虫夏草菌丝体获得成功,冬虫夏草人工培养物制剂已广泛应用于临床。但是有关冬虫夏草及人工虫草的质量控制,目前国内外没有统一的方法可循。

冬虫夏草具有较好的抗肝纤维化作用,但其作用的物质基础尚不明确,中药指纹图谱能够反映中药“多组分多靶点的整合调节作用”的特点,但其反映的化学信息可能并不包含中药的有效成分,因此这种质控方法与中药疗效相关性不强,实现中药的现代化、国际化,必须重视中药质量的控制与疗效评价标准的研究,即中药的谱效关系研究^[5-6]。本实验开展了冬虫夏草及人工虫草抗肝纤维化的谱效关系研究,并通过成分分析,得到了与冬虫夏草及人工虫草纤维化作用相关的主要特征峰。该方法可以作为目前冬虫夏草及人工虫草内在质量控制的有效方法之一。

1 仪器与材料

LC-20AT 高效液相色谱仪 SPD-M20A 检测器(日本岛津公司);BAS-I24S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);XDS-1B 倒置生物显微镜(北京京瑞天下科技有限公司);Forma Series II 水套 CO2 培养箱(Thermo Fisher);Multiskan GO 全波长酶标仪(Thermo Scientific)。

LX-2 肝星状细胞(北京协和细胞资源中心);腺

苷对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号 110879-200202);冬虫夏草(经解放军第三〇二医院袁海龙研究员鉴定为冬虫夏草);发酵虫草菌粉(江西国药有限责任公司);百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司);蛹虫草菌粉胶囊(吉林省健今药业股份有限公司),见表 1。甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 虫草 HPLC 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima™ C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.05% 磷酸溶液(A)—甲醇(B)进行梯度洗脱,洗脱程序为:0 分钟,98% A;15 分钟,98% A;20 分钟,92% A;30 分钟,92% A;38 分钟,80% A;47 分钟,65% A;60 分钟,65% A。进样量 10 μl;流速:1.0 ml/min;检测波长:260 nm;柱温:25 ℃。

2.1.2 对照品贮备液的制备 取腺苷对照品适量,精密称定,加 90% 甲醇制成每 1 ml 含 23 μg 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的配制 分别精密称取不同批号的样品各 0.2 g(冬虫夏草粉碎,过 80 目筛),分别置于 50 ml 具塞锥形瓶中,加水 25 ml,称重,超声提取 40 分钟,取出放冷,再称重,补足减少的重量,摇匀,离心 10 分钟(8000 r·min⁻¹),过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液,部分 5℃ 冷藏,供抗肝纤药效实验用。

2.1.4 样品测定 取各供试品溶液 10 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2004A 版)对样品色谱图进行分析,色谱指纹图谱中有 10 个特征共有峰,见图 1。

表 1 样品来源及批号

编号	样品	编号	样品
S1	西藏虫草—A	S7	百令胶囊(20121001)
S2	西藏虫草—B	S8	百令胶囊(20121208)
S3	西藏虫草—C	S9	百令胶囊(20130301)
S4	发酵虫草菌粉(20110512)	S10	蛹虫草菌粉胶囊(20120708)
S5	发酵虫草菌粉(20110827)	S11	蛹虫草菌粉胶囊(20120925)
S6	发酵虫草菌粉(20111210)	S12	蛹虫草菌粉胶囊(20121017)

注:S4 ~ S12 括号内为药品批号

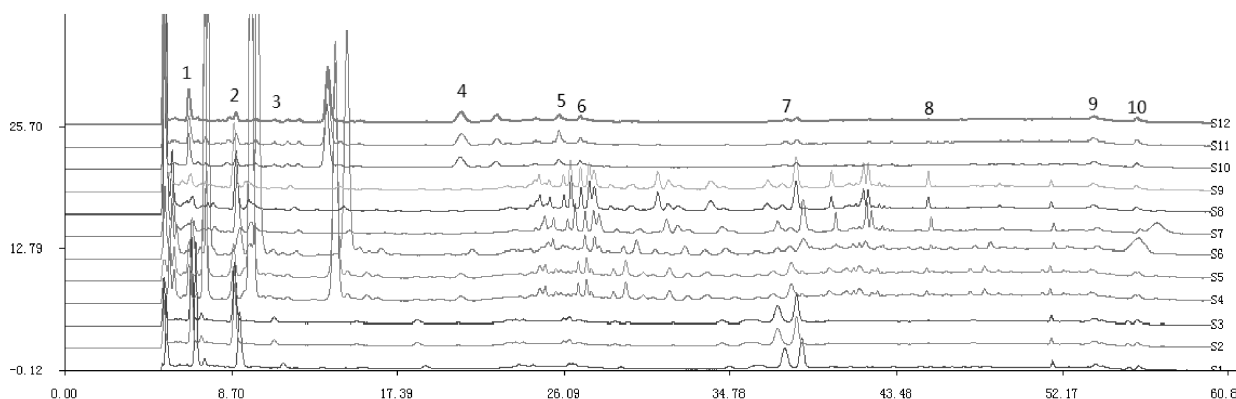


图 1 冬虫夏草及人工虫草的高效液相色谱指纹图谱

表 2 不同浓度的冬虫夏草提取液对 LX-2 的增殖作用的比较((OD/490nm) $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度(%)			
	10	20	30	40
空白对照组	1.3278 \pm 0.0089	1.2825 \pm 0.0098	1.2504 \pm 0.0095	1.2347 \pm 0.0105
冬虫夏草提取液组	1.3195 \pm 0.0157	1.2740 \pm 0.0236	1.1698 \pm 0.0258	1.1302 \pm 0.0202 ^a

注:与空白对照组比较:^a $P < 0.01$

2.2 抗肝纤维化作用研究

2.2.1 样品添加量考察 复苏后的 LX-2 细胞以含体积分数 20% 胎牛血清、 $1 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM (含各种氨基酸和葡萄糖的细胞营养液) 培养液均匀接种于培养瓶, 于 37°C , 体积分数 5% CO_2 培养箱培养, 当细胞处于对数生长期时, 用胰酶消化, 培养液悬浮细胞。细胞浓度为 4.5×10^4 个/ml, 每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板培养 24 小时, 细胞单层铺满孔底后, 随机分成 8 组 (分别含 10%、20%、30%、40% 生理盐水的空白对照组, 及含 10%、20%、30%、40% 冬虫夏草提取液的冬虫夏草提取液组), 每组设 6 个平行孔。空白对照组加入含相应水的 DMEM 培养基, 冬虫夏草提取液组加入含相应浓度提取液的 DMEM 培养基, 作用 48 小时, 吸除上清液, 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 MTT 液 20 μl , 继续孵育 4 小时, 加入 DMSO 200 μl , 振荡 10 分钟后, 在 490 nm 波长下, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光值 (OD)。

10%、20%、30%、40% 冬虫夏草提取液组均能有效抑制 LX-2 细胞的增殖, 冬虫夏草提取液浓度为 40% 时, 对 LX-2 细胞增殖的抑制效果最好, 采用单因素方差分析, 与空白对照组比较具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 实验结果见表 2。

2.2.2 对 LX-2 肝纤维细胞的抑制作用研究 LX-2 接种于 96 孔板操作同 3.1, 调整细胞浓度为 4.5×10^4

个/ml, 每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板培养 24 小时, 加入 40% 虫草提取液, 每组设 6 个平行孔, 作用 48 小时, 按 2.2.1 项下方法处理, 测定 490 nm 波长处的吸光值。吸除 96 孔板的上清液, 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 MTT 液 20 μl , 继续孵育 4 小时, 加入 DMSO 200 μl , 振荡 10 分钟后, 在 490 nm 波长下, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光值 (OD)。各冬虫夏草及人工虫草提取液均能有效抑制 LX-2 肝纤维细胞的增殖, 其中发酵虫草菌粉的抑制效果最好, 三批发酵虫草菌粉提取液对 LX-2 肝纤维细胞增殖的抑制作用与空白对照组比较均具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 百令胶囊对 LX-2 肝纤维细胞的抑制效果较差, 结果见表 3。

表 3 冬虫夏草及人工虫草提取液对 LX-2 的增殖作用

编号	OD 值	编号	OD 值
S1	1.1332 \pm 0.0266	S7	1.2952 \pm 0.0683
S2	1.1104 \pm 0.0217 ^a	S8	1.3092 \pm 0.0364
S3	1.1407 \pm 0.0171 ^a	S9	1.265 \pm 0.0221
S4	0.7080 \pm 0.0268 ^a	S10	1.1684 \pm 0.0339
S5	0.6544 \pm 0.0097 ^a	S11	1.1684 \pm 0.0075
S6	0.6122 \pm 0.0141 ^a	S12	1.0898 \pm 0.0304 ^a
空白对照组	1.2328 \pm 0.0094		

注:与空白对照组比较:^a $P < 0.01$

表 4 冬虫夏草及人工虫草物 HPLC-DAD 的共有峰、药效 OD 值及相关系数

样品	HPLC 共有峰面积										R
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S1	115020	75710	7684	3521	3659	1687	46298	1648	6789	6291	0.0996
S2	82876	75007	8098	3573	3936	2980	46252	1703	7894	6323	0.1348
S3	80425	74420	7993	3426	3748	2450	45772	1689	7243	6366	0.1224
S4	41569	47892	4409	12720	2605	15925	28224	3866	6810	5984	0.5248
S5	42362	49771	4655	11458	2674	16800	22935	3625	6881	65283	0.5784
S6	44217	54888	4998	10123	2755	18282	8475	3417	6719	6321	0.6206
S7	11764	82852	4746	1426	11124	16653	10350	11718	6483	6278	-0.0624
S8	22557	77218	5560	2535	15397	12057	8792	9492	6416	6359	-0.0764
S9	15570	83098	7270	3898	10380	16231	8893	12217	6263	6218	-0.0322
S10	38102	12644	3124	30399	9036	5900	3231	1088	5697	6948	0.0644
S11	34455	12167	6041	31249	15780	5659	4313	1134	7463	7226	0.0644
S12	36940	12707	5255	30529	8809	7213	3666	1121	7074	4804	0.143
相关系数	0.124	-0.198	-0.310	0.075	-0.719	0.422	0.126	-0.37	0.162	0.497	

2.3 谱效关系分析

12 批药材指纹图谱中各特征共有峰的峰面积见表 4, 并分别计算各供试品溶液的 OD 值与空白对照组的差值 R, 采用 SPSS 17.0 软件中双变量相关分析方法处理, 计算各色谱峰与 12 个样品对 LX-2 细胞抑制的 OD 值的 pearson 相关系数。10 个特征共有峰中 1、4、6、7、9、10 号色谱峰与 LX-2 细胞抑制效果(OD 值)呈正相关, 且 4、10 号峰相关性较高, 呈中等程度相关; 2、3、5、8 号色谱峰与 LX-2 细胞抑制效果(OD 值)呈负相关, 且 5 号峰与 LX-2 细胞抑制效果(OD 值)强相关。

3 讨论

虫草所含成分复杂, 各色谱峰很难达到指纹图谱的分离效果, 本实验考察了不同比例甲醇-水、甲醇-0.05% 磷酸溶液、甲醇-0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液等梯度洗脱效果^[7-8], 以本实验使用的流动相体系总体分离度较好, 在 60 分钟内可使色谱峰完全洗出, 且方法的重复性好。在 260、270、280 nm 波长下进行扫描, 样品在 260 nm 波长下具有较多吸收峰, 且各峰的分离度好, 故选 260 nm 作为检测波长。

虫草具有良好的抗肝纤维化作用, 临床用于肝纤维化的治疗越来越受到重视。然而虫草化学成分复杂, 抗肝纤维化起效成分并不十分明确, 因虫草资源奇缺, 其替代品虫草菌丝体被广泛应用, 其

抗肝纤维化疗效是否与天然虫草是否存在差异无从得知, 本实验将中药指纹图谱中化学成分的含量变化与其药效变化联系起来, 建立冬虫夏草及人工虫草抗肝纤维化作用的谱效关系, 可有效反应其内在质量。

虫草抗肝纤维化作用研究, 采用 LX-2 肝星状细胞系为模型的细胞抑制效果能够较好反应其药效^[9], MTT 比色法是一种细胞活性检测方法, 广泛应用于新药筛选、细胞毒性实验、肿瘤放射敏感性实验^[10-11]。大量的研究表明 MTT 法克服了传统细胞计数法的缺点, 具有工作量小, 操作简单、快速、重复性好, 能区分死活菌等优点, 具有良好的重现性和明显的特征性, 双变量相关分析是研究两变量间密切程度的一种常用统计方法, 本实验用相关分析研究冬虫夏草及虫草菌丝体抗肝纤维化作用的谱效关系, 结果表明冬虫夏草、发酵虫草菌粉及蛹虫草菌粉胶囊对 LX-2 细胞均有抑制效果, 以发酵虫草菌粉效果最好, 10 个特征共有峰中, 1、4、6、7、9、10 号色谱峰与 LX-2 细胞抑制效果(OD 值)呈正相关, 其余色谱峰呈负相关, 4、5、10 号峰与 LX-2 细胞抑制效果(OD 值)的 pearson 相关系数较大。综上所述, 冬虫夏草及人工虫草抗肝纤维化作用是多种成分共同作用的结果, 4、5、10 号峰与抗肝纤维化作用相关性最大, 本课题组将基于本次研究继续深入探究其抗肝纤维化作用成分的结构, 为今后合理开

发应用虫草提供依据。

参 考 文 献

- [1] 李凤荣. 冬虫夏草的化学成分及药理学研究概况[J]. 内蒙古中医药, 2010, 29(17): 102-105.
- [2] 吴建良, 刘成海. 冬虫夏草对肝纤维化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(6): 382-384.
- [3] 朱家漩, 王宝恩, 王泰龄. 冬虫夏草对实验性免疫损伤肝纤维化的预防和治疗作用[J]. 中华消化杂志, 1994, 14(6): 333-336.
- [4] 吴建良, 薛惠明, 刘成海, 等. 冬虫夏草对肝纤维化小鼠白细胞介素 4 与 Y. 干扰素表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 6(24): 106-109.
- [5] 陶金华, 狄留庆, 文红梅, 等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(17): 31-34.
- [6] Wei Junkong, Yan Lingzhao, Li Meishan, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from Radix Isatidis based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 871(1): 109-144.
- [7] 王瑞华. 人工蛹虫草质量标准及指纹图谱研究[D]. 华中科技大学, 2008.
- [8] 王春云. 冬虫夏草等中药材的指纹图谱研究[D]. 河北大学, 2009.
- [9] 徐宏平, 何航. 水飞蓟宾对人肝星状细胞 LX-2 凋亡及 $\alpha 1(1)$ 胶原 mRNA 表达的影响[J]. 郑州大学学报, 2009, 44(3): 597-599.
- [10] Li J, Liu P, Zhang R, et al. Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1): 714-723.
- [11] bechmann LP, Zahn D, Gieseler RK, et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells[J]. Hepatol Res, 2009, 39(6): 601-608.

(收稿日期: 2013-08-29)

(本文编辑: 蒲晓田)

RT-PCR 法分析两种解表法中药对 FM₁ 感染小鼠肺中炎性细胞因子的影响

徐红日 王成祥 王兰 王惠芳 张靖 殷人易 姜良铎 周平安

【摘要】 目的 动态观察益气清瘟解毒剂所含辛温解表法和辛凉解表法中药对流感病毒亚洲甲型鼠肺适应株(FM₁)感染小鼠肺中炎性细胞因子表达的影响, 探讨上述两种解表法抗流感免疫炎性损伤及其修复方面的作用机制。**方法** 建立 FM₁ 感染小鼠模型, 将小鼠随机分为 4 组, 分别为正常空白组、病毒感染模型组、辛温解表法组(炙麻黄 6 g、羌活 12 g、紫苏叶 10 g)、辛凉解表法组(柴胡 10 g、金银花 10 g、薄荷 6 g), 各组按病毒感染后第 1、3、5、7 天不同时相各分为 4 个小组, 每小组 8 只小鼠。采用反转录酶-聚合酶链式反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)法, 在流感病毒感染后不同时相, 动态观察辛温、辛凉解表法中药对小鼠肺中 TNF- α 、IL-6、IL-1、IL-10、IFN- γ 5 种炎性细胞因子 RNA 表达的影响。**结果** (1) 辛温解表法中药在 FM₁ 感染小鼠后 1~5 天显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后 3~5 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 1 天及第 7 天显著降低肺组织中 IL-6 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 3 天及第 7 天, 显著增加肺组织中抗炎性细胞因子 IL-10 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后 1~3 天显著增加抗病毒因子 IFN- γ 的 RNA 表达。(2) 辛凉解表法中药在 FM₁ 感染小鼠后 3~5 天显著降低肺组织中 TNF- α 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后第 7 天显著降低肺组织中 IL-1 的 RNA 表达, 在 FM₁ 感染后

基金项目: 国家自然科学基金(30873254)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院急诊科(徐红日、王兰), 内科(王成祥、姜良铎); 中国人民解放军防化研究院(王惠芳、张靖); 武汉市第一医院呼吸科(殷人易); 北京中医药大学东方医院内科(周平安)。

作者简介: 徐红日(1976-), 博士, 副主任医师。中华中医药学会急诊分会、肺系病分会会员, 世界中医药学会联合会内科分会会员。研究方向: 中医药防治呼吸系统感染性疾病的临床与实验研究。E-mail: soohongil@sina.com

通讯作者: 王成祥(1963-), 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。中华中医药学会肺系病分会副主任委员。研究方向: 中医药防治呼吸系统感染性疾病的研究。E-mail: wang601@vip.sina.com