

不同粒度赤芍药材抗肝纤维化作用的谱效关系研究

陈红鸽 肖云芝 刘朝勇 韩晋 袁海龙

【摘要】 目的 研究不同粉碎粒度赤芍药材的高效液相指纹图谱与其抗纤维化作用的谱效关系,揭示赤芍药材抗肝纤维化作用的“药效成分组”。**方法** 对赤芍药材进行不同程度的粉碎,用高效液相色谱法测定各粉碎粒度赤芍提取液的指纹图谱,确定特征共有峰。以肝星状细胞 LX-2 为模型研究其对肝纤维细胞的抑制效果,采用 SPSS 软件对数据进行相关分析研究谱效相关性。**结果** 300 目与 200 目赤芍提取液对肝星状细胞 LX-2 的抑制效果无差异($P>0.05$),但与 100 目、150 目赤芍提取液抑制效果比较具有显著性差异($P<0.01$)。各粉碎粒度赤芍药材高效液相指纹图谱中共有 19 个特征共有峰,其中峰 16、峰 9 与肝星状细胞 LX-2 抑制效果(OD 值)的相关性分别呈极弱相关、弱相关,峰 7、峰 17 呈强相关,其余各峰均呈极强相关。**结论** 200 目为赤芍药材较优粉碎粒度。

【关键词】 赤芍; 指纹图谱; 抗肝纤维化作用; 谱效关系; 粒度

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.011

Spectrum-activity relationship on anti-hepatic fibrosis efficacy of Radix Paeoniae Alba with different particle sizes CHEN Hong-ge, XIAO Yun-zhi, LIU Chao-yong, et al. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 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 spectrum-activity relationship between HPLC fingerprints of Radix Paeoniae Alba with different particle sizes and anti-hepatic fibrosis efficacy and to explore the “active components group” for anti-hepatic fibrosis efficacy of Radix Paeoniae Rubra. **Methods** Radix Paeoniae Alba with different particle sizes were determined by the HPLC method. The representative standard fingerprint was calculated using the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A). The LX-2 hepatic stellate cells was used as a hepatic fibrosis model to study the inhibitory effect of Radix Paeoniae Alba on hepatic fibrosis cells. The spectrum-effect relationship was established by SPSS 19.0 software. **Results** Compared with 300 mesh, 200 mesh showed no significant difference ($P>0.05$), but 100 mesh and 150 mesh exhibited significant difference ($P<0.01$) in the inhibition effect of Radix Paeoniae Alba on hepatic fibrosis cells. 19 common peaks in the HPLC-fingerprint of Radix Paeoniae Alba were obtained. It was tentatively concluded that peak 16, peak 9 showed a very weak correlation, weak correlation with LX-2 cells inhibitory effect-OD value in 19 characteristic peaks. Peak 7 and peak 17 have better correlation. Other peaks have the strongest correlation. **Conclusion** 200 mesh is the optimum particle size for Radix Paeoniae Rubra.

【Key words】 Radix Paeoniae Alba; Chromatographic fingerprint; Anti-hepatic fibrosis efficacy; Spectrum-activity relationship; Particle size

基金项目:国家重大科研专项新药创制重大专项(2011ZX09201-201-14);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(陈红鸽、肖云芝、刘朝勇、韩晋、袁海龙);成都中医药大学药学院(肖云芝、刘朝勇)

作者简介:陈红鸽(1974-),硕士,主管药师。研究方向:中药新型给药系统研究。E-mail:destiney7@163.com

通讯作者:袁海龙(1970-),博士,研究员,博士生导师。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-),女,硕士,主任药师,博士生导师。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

2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)规定赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根^[1],具有清热凉血、散瘀止痛之功效。赤芍在心血管系统方面的药理作用显著^[2-3],但也有相关药理实验^[4-5]表明赤芍具有一定的抗肝纤维化作用。

中药材经粉碎后^[6],可以使细胞破壁,粉体比表面积增大,具有良好的溶解性、化学活性和生物活性,有助于提高中药有效物质的溶出和吸收,提高生物利用度,从而增强临床疗效。因此,可看出中药材的不同粉碎粒度对其质量势必会产生重要影响。中药材的质量长期以来多以单一指标进行控制和评价质量,难以真正体现中药的多效性和整体性^[7]。因此指纹图谱与中药药效评价相结合的评价模式应运而生,从而更有针对性地控制中药质量^[8-9]。

本研究以赤芍为模型药,采用四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide,MTT)法研究不同粉碎度对赤芍抑制肝星状细胞 LX-2 增殖的影响,同时考察不同粉碎度赤芍药材的谱效关系,一方面为中药材质量控制建立有效的方法,另一方面为阐明粉碎度对中药材质量的影响提供客观和实证参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 所购买的赤芍药材经解放军三〇二医院袁海龙研究员鉴定,为毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根;肝星状细胞 LX-2(北京协和细胞资源中心)。

1.1.2 仪器 精密电子天平(BT-25S 型,赛多利斯科学仪器有限公司);岛津高效液相色谱仪(LC-20AT 型,含在线脱气机,四元梯度泵,自动进样器,DAD 检测器);电子调温电热套(MYB 型,天津市中环实验电炉有限公司);旋转蒸发仪(RE52 型,上海亚荣生化仪器厂);XDS-1B 倒置生物显微镜(北京京瑞天下科技有限公司);Multiskan GO 全波长酶标仪(Thermo Scientific)。

1.1.3 试剂 芍药苷对照品(批号 110736-200422,中国药品生物制品检定所);胎牛血清(批号 DPEO166,美国 HyClone 公司)。四甲基偶氮唑盐(MTT,批号 1324B37)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO,批号 20120305224)均购于美国 Amresco

公司;色谱乙腈,重蒸水,其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 取赤芍药材于 40℃ 干燥 30 分钟,经粉碎后,分别过 100 目(S1)、150 目(S2)、200 目(S3)、300 目(S4)筛,制成不同粒度的赤芍粉末样品,备用。

1.2.2 HPLC 测定赤芍药材指纹图谱方法建立 色谱条件:色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱程序为:0~10 分钟,5.0%~9.0% A,10~16 分钟,9.0% A,16~22 分钟,9%~10.0% A,22~23 分钟,10%~11.0% A,32~42 分钟,11.0%~12.0% A,42~60 分钟,14.0%~15% A,60~70 分钟,15.0%~22.0% A,70~85 分钟,22.0% A;体积流量为 1.0 mL/min;室温,检测波长为 242 nm,进样量为 10 μL。

对照品溶液制备:取芍药苷对照品适量,精密称定,置量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含芍药苷 40.26 μg 的对照品溶液,即得。

供试品溶液制备:分别精密称取不同粉碎粒度赤芍药材各 2.0 g,分别置于 50 mL 锥形瓶中,加入 50% (v/v) 乙醇 25 mL,称重,超声提取 50 分钟,取出放冷,补足重量,摇匀,取续滤液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。部分冷冻干燥,供抗肝纤维化试验。

1.2.3 细胞培养 复苏后的肝星状细胞 LX-2 均匀接种于 DMEM 培养液中(含 20% 胎牛血清;1 × 10⁵ U/L 青霉素;100 mg/L 链霉素以及所需氨基酸和葡萄糖等营养物质),于培养箱(37℃,5% CO₂)中培养,当细胞处于对数生长期时,用胰酶消化,培养液悬浮细胞。调整细胞浓度后,每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板培养 24 小时^[10],细胞单层铺满孔底后,备用。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行 One-Way ANOVA 分析及 Pearson 相关性分析, $P < 0.01$ 时认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 共有峰的标定

采用相对保留时间标定共有指纹峰,结果赤芍 HPLC 指纹图谱标定了 19 个共有峰,峰 11 为芍药苷,见图 1。

表 1 不同浓度提取液对肝星状细胞 LX-2 的增值作用的比较((OD/490nm) $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度			
	10%	20%	30%	40%
空白对照组	0.9975 \pm 0.0161	0.9945 \pm 0.0151	0.9881 \pm 0.0101	0.9851 \pm 0.0210
提取液组	0.988 \pm 0.01010	0.7974 \pm 0.0132 ^a	0.7565 \pm 0.0135 ^a	0.6632 \pm 0.0114 ^a

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.01$

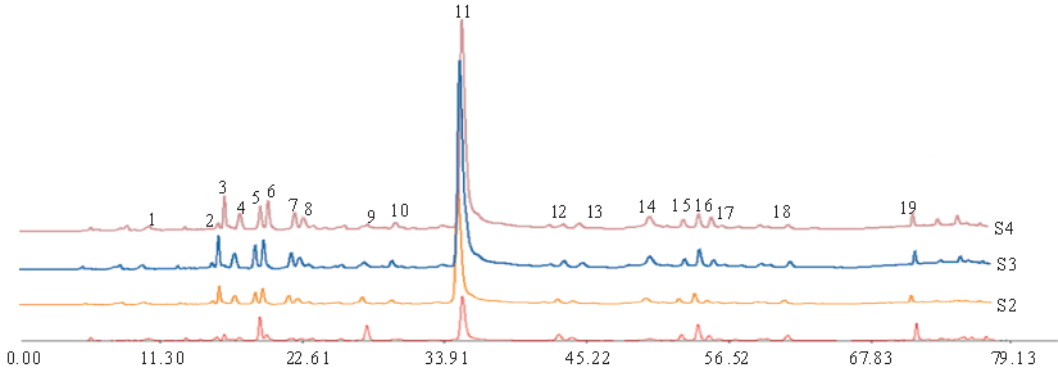


图 1 不同粒度赤芍的 HPLC 指纹图谱

2.2 抗肝纤维化作用研究

2.2.1 样品添加量考察结果 按照 1.3 操作将复苏后的肝星状细胞 LX-2 均匀接种 96 孔板,随机分成 8 组(10%、20%、30%、40% 空白对照组及 10%、20%、30%、40% 赤芍药材提取液的提取液组),每组设 6 个平行孔。空白对照组加入含相应浓度生理盐水的 DMEM 培养基,赤芍药材提取液的提取液组加入含相应浓度提取液的 DMEM 培养基,作用 24 小时,吸除 96 孔板的上清液,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L,继续孵育 4 小时,加入 DMSO 200 μ L,振荡 10 分钟后,使结晶物充分溶解。在 490 nm 波长下,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光值(OD₄₉₀),结果见表 1。由表 1 可知,肝星状细胞 LX-2 增殖受生理盐水浓度的影响不大,赤芍提取溶液组 4 种浓度对肝星状细胞 LX-2 增殖有抑制作用,采用单因素方差分析,20%、30%、40% 提取液组与相应浓度的空白对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。40% 赤芍药材提取液组抑制效果最好。

2.2.2 不同粒度赤芍药材提取液对肝星状细胞 LX-2 增殖的影响 按照 1.3 操作将复苏后的肝星状细胞 LX-2 均匀接种 96 孔板,调整细胞浓度后,接种于 96 孔(每孔 200 μ L)培养板培养 24 小时,加入 40% 赤芍药材提取液,每组设 6 个平行孔,作用 24 小时,吸除 96 孔板的上清液,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L,继续孵育 4 小时,加入 DMSO 200 μ L,振荡 10 分钟后,使结晶物充分溶解^[10]。在

490 nm 波长下,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光值(OD₄₉₀),计算各样品提取液的细胞抑制率,抑制率(%) = (OD₀ - OD₁) / OD₀ \times 100%,其中 OD₁ 为给药组 OD₄₉₀ 值,OD₀ 为空白对照组 OD₄₉₀ 值,结果见表 2。由结果可知,不同粉碎粒度的赤芍药材提取液对肝星状细胞 LX-2 增殖均有影响($P < 0.01$),200 目与 300 目赤芍药材提取液对肝星状细胞 LX-2 的抑制效果接近($P > 0.05$)。

表 2 不同粒度赤芍药材提取液对肝星状细胞 LX-2 增殖作用

编号	OD 值	抑制率
空白对照组	0.9880 \pm 0.0192	-
S1	0.7991 \pm 0.0281 ^{ab}	19.12%
S2	0.7228 \pm 0.0288 ^{ab}	25.64%
S3	0.6772 \pm 0.0145 ^a	30.26%
S4	0.6729 \pm 0.0116 ^a	30.69%

注:与空白对照组比较:^a $P < 0.01$;与 300 目组比较:^b $P < 0.01$

2.2.3 赤芍药材谱效关系分析 供试品溶液色谱图中以峰 11(芍药苷)为参比峰,其相对峰面积为 1,计算指纹图谱共有峰的相对峰面积比值,同时,计算各供试品溶液 OD 值与空白对照组 OD 值的差值 R,样品 S1、S2、S3、S4 的 R 值分别为 0.1889、0.2652、0.3108、0.3151。采用 SPSS 19.0 软件对数据进行 Pearson 相关性分析,计算各特征共有峰与各粉碎粒度的赤芍药材提取液对肝星状细胞 LX-2 抑制的 OD 值的 Pearson 相关系数,结果见表 3。其

中 300 目赤芍提取液的抑制效果最好,19 个特征峰中峰 13 与肝星状细胞 LX-2 抑制效果(OD 值)成负相关,其余各峰成正相关;峰 16 相关系极低,呈极弱相关;峰 9 相关性较峰 16 高,呈弱相关;峰 7、峰 17 相关性较高,呈强相关;其余各峰均呈极强相关。

表 3 不同粒度赤芍药材指纹图谱共有峰的相对峰面积、R 及相关系数

编号	S1	S2	S3	S4	相关系数
峰 1	0.00593	0.00140	0.00033	0.00029	0.896
峰 2	0.01122	0.00264	0.00062	0.00054	0.989
峰 3	0.05822	0.00320	0.00320	0.00281	0.937
峰 4	0.00913	0.00215	0.00050	0.00044	0.932
峰 5	0.04849	0.01143	0.00266	0.00234	0.936
峰 6	0.00147	0.00035	0.00008	0.00008	0.854
峰 7	0.05189	0.01223	0.00285	0.00251	0.799
峰 8	0.07363	0.01735	0.00404	0.00356	0.969
峰 9	0.04236	0.00998	0.00233	0.00205	0.392
峰 10	0.00243	0.00573	0.00117	0.00117	0.909
峰 11	1	1	1	1	0.895
峰 12	0.00611	0.00144	0.00033	0.0003	0.895
峰 13	0.54313	0.12801	0.29834	0.26225	-0.951
峰 14	0.0293	0.00691	0.00161	0.00142	0.931
峰 15	0.01809	0.00426	0.0001	0.00087	0.993
峰 16	0.70523	0.01662	0.00387	0.00341	0.110
峰 17	0.04661	0.011	0.00256	0.00225	0.689
峰 18	0.01381	0.00325	0.00076	0.00067	0.881
峰 19	0.03942	0.00929	0.00217	0.0019	0.969

3 讨论

赤芍主要含萜及苷类成分,本实验分别对提取溶剂(甲醇、50%乙醇、70%丙酮)、溶媒体积(10、25、50 mL)、提取方法(加热回流、冷浸、超声)与提取时间(30、40、50 分钟)进行了单因素考察,确定了 50%乙醇 25 mL、超声提取 50 分钟的提取方法。同时,本实验采用二极管阵列检测器做全波长扫描,考察了不同吸收波长图谱。结果表明,242 nm 处各色谱峰之间分离度良好,色谱信息较为全面,而且避免了溶剂末端吸收的影响。肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的必经阶段,有效地预防、逆转肝纤维化可以延缓或防止肝硬化发生。目前尚缺乏理想的治疗药物和方法,近年来研究表明,活血化瘀、益气健脾为主中药可以逆转肝纤维化过程^[5,11]。本实验研究了活血化瘀中药—赤芍体外抗肝纤维化的效应,结果表明,不同粉碎粒度赤芍药材均能抑制 LX-2 细胞增殖,但

抑制效果不尽相同。鉴于此,本实验进一步对不同粉碎粒度赤芍药材的谱效关系进行研究,发现共有特征峰的比值有一定差异,但共有特征峰与抗肝纤维化作用的相关性大多较强,进一步表明,粉碎粒度对中药材的药效具有一定的影响。在本实验中,200 目与 300 目赤芍抗肝纤维化作用无差异($P>0.05$),考虑工厂设备及成本因素,选择 200 目作为赤芍较优的粉碎粒度。赤芍具有良好的抗肝纤维化作用,临床上用于肝纤维化的治疗越来越受到重视。赤芍抗纤维化的谱效关系分析可知其抗肝纤维化作用是多种成分的协同作用的结果。谱效关系不仅能揭示中药所含化学成分与药效之间的相互关系,更有针对性的控制中药质量,也能用于筛选中药材的粉碎粒度,客观地反映中药材的药效及质量,从而为临床应用提供一定的科学依据。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:147-148.

[2] Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, et al. Angiotensin induces p67pho mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts [J]. Hypertension, 1998,32(2):331-337.

[3] 奥·乌力吉,王青虎,王秀兰,等. 蒙药赤芍防治心血管系统疾病的有效物质群的提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2014,25(3):562-564.

[4] 高世乐,胡宗涛,董六一. 赤芍总苷对大鼠放射性肝纤维化的保护作用及机制[J]. 中国药理与临床,2012,28(2):65-68.

[5] 李延昌,孙玉凤,冯志杰,等. 赤芍抗肝纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(10):767-768.

[6] 刘云海,杜光. 超微粉技术对中药活性成分提取率的影响[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(1):66-69.

[7] 姜延良,霍海如. 重视中药多组分整合作用的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2003,5(2):1-4.

[8] 秦昆明,郑礼娟,沈保家,等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考[J]. 中国中药杂志,2013,28(1):26-31.

[9] 戚进,余伯阳. 中药质量评价新模式——“谱效整合指纹谱”研究进展[J]. 中国天然药物,2010,8(3):171.

[10] 徐宏平,何航. 水飞蓟宾对人肝星状细胞 LX-2 凋亡及 $\alpha 1(I)$ 胶原 mRNA 表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2009,44(3):597-599.

[11] 杨大国,王林杰,宋为云,等. 重用赤芍治疗慢性肝炎纤维化前后肝穿组织学的比较[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(1):207-209.

(收稿日期:2014-09-12)
(本文编辑:董历华)