

基于 MTT 法的波棱瓜子抗肝纤维化用量初步研究

徐和 戴领 沈成英 韩晋 袁海龙

【摘要】 目的 制定波棱瓜子质量控制标准含量上下限,以此确定波棱瓜子用于肝纤维化治疗的合理用量范围。**方法** 本文采用中压制备色谱收集不含波棱甲素(herpetrine, PEDX)的阴性样品,加入不同剂量的 PEDX,制备不同浓度梯度的 PEDX 系列样品溶液,建立 PEDX 系列样品 HPLC 指纹图谱,四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)比色法观察 PEDX 系列样品溶液对人肝星状细胞系 LX-2 细胞增殖的影响,并比较 PEDX 系列样品溶液与波棱瓜子提取物溶液的抑制率差异。**结果** (1)指纹图谱结果显示,不同浓度梯度的 PEDX 系列样品相似度良好;(2) PEDX 系列样品能抑制 LX-2 细胞增殖,加入样品的剂量 M 与细胞抑制率 I 值呈现一定的“量—效”关系,确定了波棱瓜子中药效成分 PEDX 的最小有效用量为 0.68 mg,最大有效用量为 8.2 mg。**结论** 波棱瓜子用于肝纤维化治疗的合理用量范围为 3.27 ~ 39.42 mg。

【关键词】 中药; 波棱瓜子; 波棱甲素; 四甲基偶氮唑盐比色法; 量—效关系; 质量控制

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.08.008

Research on the administration dosage for anti-hepatic fibrosis of *Herpetospermum caudigerum* based on MTT assay XU He, DAI Ling, SHEN Cheng-ying, et al. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China

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

【Abstract】 Objective To develop the quality standards of *Herpetospermum caudigerum*, and determine the rational administration dosage range for treatment of liver fibrosis. **Methods** Negative samples without herpetrine were collected using medium voltage preparation apparatus. Different amounts of herpetrine were added in the negative sample solution, anti-proliferative effects of series of herpetrine sample solution against LX-2 cells were evaluated by MTT assay in vitro, and a comparison of difference between series of herpetrine and extracts was performed. **Results** There were great similarity among the series of herpetrine samples from the HPLC fingerprint. The samples showed remarkable anti-proliferative effects against LX-2 cells, and it showed a certain dosage-effect relationship between dosage of herpetrine samples and cell inhibition rate value. Therefore, we defined the minimum effective dosage of herpetrine in the *Herpetospermum caudigerum* was 0.68 mg, the maximum effective dosage was 8.2 mg. **Conclusion** The rational administration dosage range of *Herpetospermum caudigerum* for treatment of liver fibrosis was 3.27 ~ 39.42 mg.

【Key words】 TCM; *Herpetospermum caudigerum*; Herpetrine; MTT assay; Dosage-effect relationship; Quality control

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

作者单位:100039 北京,中国人民解放军第三〇二医院药学部[徐和(硕士研究生)、戴领、沈成英、韩晋、袁海龙];成都中医药大学药学院[徐和(硕士研究生)、戴领、沈成英]

作者简介:徐和(1989 -),2011 级在读硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型的研究。E-mail: xhyffs@163.com

通讯作者:韩晋(1959 -),硕士,主任药师,硕士生导师。研究方向:中药制剂分析。E-mail: hanjin302emba@163.com;袁海龙(1970 -),博士,研究员,博士生导师。研究方向:中药制剂分析。E-mail: yhlpharm@126.com。韩晋、袁海龙并列为通讯作者

长期以来,中药临床功用与质量评控模式不相适宜,临床应用上中药的品质含量与临床用量(质一量)也是分离的,无论药材中药效成分量的高低,临床用量却未作出调整,导致临床疗效不确切或不稳定。然而事实上,中药质一量是密不可分、相互依存的。中药的用量不同于化学药,化学药用量与其含量是直接相关的。中医临床潜方用药,面对品质含量相差甚远的中药,而临床用量设置却未有区别^[1-3]。

波棱瓜子是葫芦科波棱瓜属波棱瓜(*Herpetospermum caudigerum* Wall.)的干燥成熟种子^[4],为藏医常用药,用于治疗赤巴病、肝病、胆病以及消化不良^[5]。波棱瓜子具有保肝降酶、抗肝炎病毒等功效^[6],在各大藏医院广泛应用,在用于治疗肝病的藏药成方制剂中,有一半以上以波棱瓜子入药。波棱瓜子药材中主要药效成分为木脂素类成分^[7]。前期通过对波棱瓜子的研究发现,波棱甲素(herperton, PEDX)为波棱瓜子保肝降酶的关键药效组分^[8]。然而临床上,波棱瓜子用于肝病治疗时用量多凭经验总结,为了制定其科学合理的用量范围,本文以 PEDX 的量效关系为核心进行研究^[9],通过含量比例进行转换,制定波棱瓜子质量控制标准含量上下限,将此模式示范应用于中药抗肝纤维化质量控制方法研究,为实现“中药质量标准更加贴近临床,临床用量更加科学有据”提供新思路和方法,深化中医药的量效关系理论^[10]。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

波棱瓜子提取物(自制, PEDX 含量为 20.8%); PEDX 对照品(自制,纯度超过 98%)。人肝星状细胞系 LX-2 细胞,购自北京协和细胞库; DMEM 培养液(美国 Gbico 公司,批号:1255136);胎牛血清(美国 HyClone 公司,批号:DPE0166);四甲基偶氮唑盐(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT,批号:1324B37)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号:20120305224)均购自美国 Amresco 公司;乙腈(色谱纯,加拿大 Promptar 公司),其他试剂均为分析纯。

LC-20AT 高效液相色谱仪 SPD-M20A 检测器(日本 Shimadzu 公司); BSA124S 型精密电子天平(德国 Sartorius 公司); XDS-1B 型倒置生物显微镜(北京京瑞天下科技有限公司); Forma Series II 水

套 CO₂ 培养箱(3110 Series II 水套, Thermo Fisher 公司); 全波长酶标仪(Multiskan GO 型, Thermo Scientific 公司)。

1.2 PEDX 系列样品 HPLC 指纹图谱的建立

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-2% 冰醋酸水溶液(24:76), 流速: 1.0 ml·min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 柱温: 25℃, 进样量: 10 μl。

1.2.2 PEDX 阴性样品的制备 称取波棱瓜子提取物 35 g 用 8 倍量溶剂溶解, 上中压硅胶柱制备, 其中溶剂由质量比为 3:2 的石油醚和丙酮组成, 中压硅胶柱由三支粒度为 200~300 目的 120 g 硅胶柱串联组成, 流动相由石油醚: 乙酸乙酯: 丙酮按 2:7:1 的质量比组成, 检测波长为 240 nm, 流速为 120 ml·min⁻¹, 收集不含 PEDX 的馏分, 回收干燥, 即得 PEDX 阴性样品^[11]。

1.2.3 PEDX 对照品溶液的制备 精密称取 PEDX 对照品 8.0 mg, 置 50 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得浓度为 160 μg·ml⁻¹ 的 PEDX 对照品储备液。

1.2.4 PEDX 系列样品溶液的制备 按表 1 将不同剂量的 PEDX 对照品加入到不含该成分的阴性样品溶液(以下称阴性样品溶液)中, 制备不同浓度梯度的 PEDX 系列样品。溶解, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进高效液相色谱仪。

表 1 PEDX 样品的加入量

样品	不同组成(mg)		质量(mg)
	PEDX	PEDX 阴性	
阴性样品	0	2.50	2.50
样品 I	0.52	2.50	3.02
样品 II	1.04	2.50	3.54
样品 III	2.08	2.50	4.58
样品 IV	4.16	2.50	6.66
样品 V	5.20	2.50	7.70
样品 VI	8.32	2.50	10.82

1.3 PEDX 系列样品对 LX-2 增殖的影响

各系列样品先用 DMSO 溶解, 再用培养基稀释到各个不同的浓度, 并使 DMSO 的浓度低于 1.0%^[12], 不含药物的空白溶剂作阴性对照。取对数生长期的 LX-2 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化, 按 1 × 10⁴/ml 的浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μl, 细胞培养 24 小时后,

弃去上清,温育 48 小时。弃去上清,按 1.2.4 项下制备方法加入 PEDX 系列样品溶液,每组设 6 个平行孔,作用 6 小时,吸去上清液,每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 MTT 液 $20 \mu\text{l}$,继续孵育 4 小时,终止培养,弃去上清液,加入 DMSO $200 \mu\text{l}$,振荡 10 分钟后,在 492 nm 波长下,用全波长酶标仪测定各孔吸光值(OD_{492})。根据下面的公式计算各系列样品的抑制率。

$$\text{抑制率 } IR(\%) = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_1}{\text{OD}_0} \times 100\%$$

OD_1 : 系列样品吸光值; OD_0 : 空白溶剂吸光值

1.4 观察项目

按 1.2.1 项下色谱条件记录系列样品在 60 分钟内的色谱图,并进行指纹图谱分析。在进行 MTT 实验之前,倒置显微镜观察培养细胞的形态,选取生长、形态良好的细胞用于 MTT 实验。

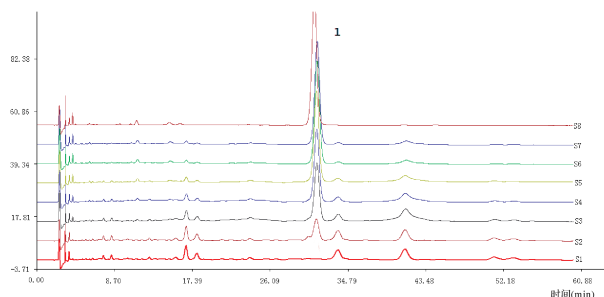
1.5 统计学方法

数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析处理,细胞抑制率数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间的均数检验采用方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEDX 系列样品 HPLC 指纹图谱

按照 1.2.1 项下色谱条件记录 60 分钟内的色谱图,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版进行分析,指纹图谱如图 1 所示。相似度计算得到 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 之间的相似度均为 1.0,结果表明样品 I ~ VI 相似度良好,最终得到了不同浓度梯度的 PEDX 系列样品。阴性样品在 PEDX 保留时间处无吸收,在其余特征峰保留时间处均有吸收,说明 PEDX 与阴性样品各特征峰间无相互干扰,最终得到不含 PEDX 的阴性样品。



S1 为阴性样品; S2 ~ S7 依次为样品 I ~ VI;

S8 为 PEDX 对照品; 1 波峰为 PEDX

图 1 PEDX 系列样品指纹图谱

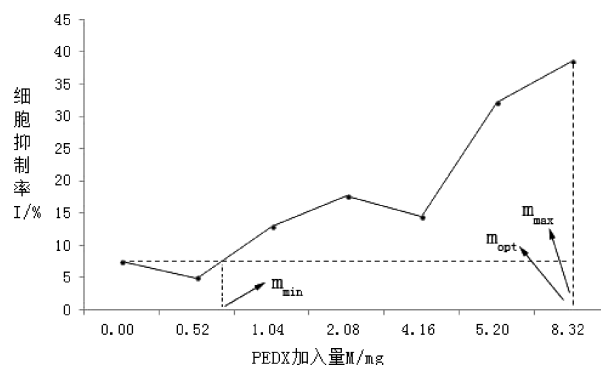
2.2 LX-2 细胞抑制率的测定

PEDX 系列样品作用于 LX-2 细胞 6 小时后的 OD492 值如表 2, 根据抑制率计算公式得到各样品抑制率。建立各系列样品的量 M 与细胞抑制率 I 值的“量—效”关系曲线, 如图 2。由 PEDX 组分的“量—效”关系可知, 当“量”增加到一定程度时, 相应的“效”增加的幅度减缓, 甚至减弱。进一步说明波棱瓜子中 PEDX 的“量”对其“效”起着至关重要的作用, 并不是“量”越大越好, 也不是越小就不好。据图 2 中的“量—效”关系曲线图, 确定波棱瓜子中药效组分 PEDX 的最小有效用量为 0.68 mg , 这一阈值可作为中药质量标准含量控制的下限, 最大有效用量为 8.2 mg , 此用量即是方药安全有效“治疗窗”的最大用量, 可作为方药质量标准含量控制的上限。通过含量关系转换, 可知波棱瓜子的最小有效用量为 3.27 mg , 最大有效用量为 39.42 mg 。

表 2 PEDX 系列样品对 LX-2 细胞增殖的影响

样品	OD_{492}	抑制率/%
空白溶剂	0.7870 ± 0.0408	—
阴性样品	0.7285 ± 0.0230	7.43
样品 I	0.7483 ± 0.0547	4.92
样品 II	0.6853 ± 0.0197	12.93
样品 III	0.6485 ± 0.0393^b	17.60
样品 IV	0.6730 ± 0.0280^a	14.49
样品 V	0.5337 ± 0.0345^b	32.18
样品 VI	0.4840 ± 0.0174^b	38.50

注: 与阴性样品比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$



m_{\min} 为最小用量点 (minimal dosage); m_{\max} 为最大用量点 (maximal dosage); m_{opt} 为最优用量点 (optimal dosage)

图 2 PEDX 系列样品的“量—效”关系曲线

3 讨论

本研究在前期目标成分研究的基础上, 确定了 PEDX 为抗肝纤维化的药效关键组分。通过不

同剂量 PEDX 组分的加入,采用体外 LX-2 细胞增殖实验进行药效学评价,阐明“量—效”关系,进而通过“量—效”关系曲线的变化,找到加入的 PEDX 的最低含量点、最高含量点,再转换为人用剂量,以此可以制定药物的“治疗窗”或推荐临床用量范围,为波棱瓜子抗肝纤维化作用“含量”标准的制定提供了方法^[13]。以此阐明中药的组分含量与临床用量的相关性,建立面向临床、关乎药效的质量控制方法。

该研究模式的关键技术在于如何制备阴性样品,为保障目标成分及其阴性样品的完整性,分离手段和方法是关键。要有高提取率、高回收率、无损、无残留的成分快速分离技术,即一方面要多快好省地获得目标成分,同时对剩余阴性样品要尽可能地保持无损和完整,目前薄层色谱技术和制备型、中压柱层析系统是较好的解决手段。

该研究结果的获得及“量”的标准的制定,为实现中药药效物质质量控制“找得准、测得准、定得准”目标提供了方法和思路,也为解决目前中药质控格局“量而不准”的症结提供参考,有望成为中药药效物质质量控制的新模式。

进行面向临床的中药质—量一体化研究,建立质量与用量之间换算机制,使临床用量科学、合理、有据。以点代面,以药带方,逐步将此模式推广应用到其他方药,从而实现中药质量控制从质—量分离向质—量—量—量一体转变,为中医药临床合理用药特别是为实现中药用量标准从无据可依到有据可依提供有力的科技支撑。

参 考 文 献

- [1] 鄢丹,熊吟,马丽娜,等.建立以临床功用为导向的中药质量评控格局与适宜模式的设想[J].中草药,2013,44(1):1-5.
- [2] 黄璐琦,唐仕欢,杨洪军.论中药用量的特点及研究的关键点

- [J]. 中医杂志,2009,50(3):203-205.
- [3] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2010,41(4):505-508.
- [4] 丛龙波,王琪,李仙义,等.藏药波棱瓜子抗肝炎药效物质基础研究[J].医学研究杂志,2007,36(8):75-76.
- [5] Li LY,Deji LM,Wei YF,et al. Literature data investigation in semen of *Herpetospermum pedunculatum* [J]. China J Chin Mat Med,2005 Jun,30(12):893-895.
- [6] 韩玉梅,李正明,袁海龙,等.肝能滴丸在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗效果[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(4):43-44.
- [7] YUAN Hai-long, LIU Yi, ZHAO Yan-ling, et al. Herpetin, a new bioactive lignan isolated from *Herpetospermum caudigerum* [J]. J Chin Pharm Sci,2005,14(3):140-143.
- [8] YUAN H L, YANG M, LI X Y, et al. Hepatitis B virus inhibiting constituents from *Herpetospermum caudigerum* [J]. Chem Pharm Bull(Tokyo),2006,54(11):1592-1594.
- [9] 肖小河,鄢丹,袁海龙,等.基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建[J].中草药,2009,40(9):1345-1348,1488.
- [10] YUAN Hai-long, ZHANG Tian-tian, XIAO Xiao-he. Knock-out & knock-in: A novel approach for Herbal medicine research [C]. BIT's 8th Annual Congress of IDST,2010, Beijing, China.
- [11] 袁海龙,郭静静,李仙义,等.一种制备 Herperione 的方法及其应用、其胶囊剂及胶囊剂的制备方法和应用:中国,201110072191.9 [P]. 2011-08-03. [http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110072191.9&leixin=fmzl&title=一种制备 Herperione 的方法及其应用、其胶囊剂及胶囊剂的制备方法和应用&ipc=C07D493/04\(2006.01\)I](http://211.157.104.87:8080/sipo/zljs/hyjs-yx-new.jsp?recid=CN201110072191.9&leixin=fmzl&title=一种制备 Herperione 的方法及其应用、其胶囊剂及胶囊剂的制备方法和应用&ipc=C07D493/04(2006.01)I).
- [12] 赵庆兵,黄文,吴文芳,等.盾叶薯蓣难溶性甾体皂苷的提取及其抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的研究[J].华西药理学杂志,2010,25(5):527-529.
- [13] 孔维军.基于成分敲出/敲入的中药(牛黄)药效物质辨识和质量控制模式的初步研究[D].成都:成都中医药大学,2011.

(收稿日期:2013-05-01)

(本文编辑:黄凡)

· 信息之窗 ·

本刊对来稿中图、表的有关要求

凡能用文字说明者,尽量不用图表。图表均应有简要的图题和表题。图、表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文出现的先后次序连续编码,并在正文相应位置标示。

图 在 WORD 文档中出现的图,印刷效果不好,要求另附图片原始文件。

表 一律采用“三线表”,其内容不可与文字和图重复。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 *P* 值等),以简炼文字写在表的下方,表内依次用 ^a、^b、^c、^d 号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内,(均值±标准差)用($\bar{x} \pm s$),置于表的右上方。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多一位。统计学处理结果统一用 ^a、^b、^c、^d 表示 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。