

条苓与枯苓的指纹图谱建立、抗炎活性及谱效关系研究[△]

贾传青^{1,2*}, 郭兰萍³, 王 晓², 于宗渊^{4#a}, 陈 龙², 董红敬^{2#b}[1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心, 济南 250014; 3. 中国中医科学院中药资源中心/道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700; 4. 山东省中医药研究院, 济南 250014]

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)12-1430-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.12.04



摘要 目的 建立条苓与枯苓的指纹图谱, 考察两者的抗炎活性差异。方法 采用高效液相色谱法建立5批条苓和5批枯苓的指纹图谱; 采用SIMCA 14.1软件, 以变量重要性投影(VIP)值>1为标准筛选影响条苓和枯苓质量的差异标志物; 以其对脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7细胞)上清液中一氧化氮(NO)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 的抑制率为指标, 评价条苓和枯苓的抗炎活性并计算其抑制NO的半数有效浓度(EC₅₀); 采用灰色关联分析谱效关系; 以50 μ g/mL质量浓度下各组细胞的NO、IL-1 β 、IL-6抑制率为指标, 采用SPSS 26.0软件进行聚类分析。结果 5批条苓和5批枯苓共有15个共有峰, 相似度均大于0.990。共有8个峰的VIP值>1, 依次为峰14、12、15、6、10、13、11、4。在50 μ g/mL质量浓度下, 枯苓提取物对NO、IL-6、IL-1 β 的抑制率及平均EC₅₀分别为62.14%~71.13%、3.32%~18.38%、93.12%~95.47%、25.35 μ g/mL, 条苓提取物分别为39.52%~50.19%、6.21%~22.55%、94.10%~96.44%、58.63 μ g/mL; 枯苓提取物的平均NO抑制率显著高于条苓提取物, 平均EC₅₀、IL-6抑制率均显著低于条苓提取物(P <0.05); 两者平均IL-1 β 抑制率比较差异无统计学意义(P >0.05)。峰2~3、5~8、10~11与NO抑制率的关联度均大于0.8, 峰2、5、8~9与IL-1 β 抑制率的关联度均大于0.9, 15个共有峰与IL-6抑制率的关联度均小于0.8。10批样品可聚为2类, K1~K5为一类, T12~T16为一类。结论 在50 μ g/mL质量浓度下, 枯苓提取物对NO的抑制作用强于条苓提取物, 对IL-6的抑制作用弱于条苓提取物, 对IL-1 β 的抑制作用与条苓提取物相当; 初步确定峰6、10~11对应成分为条苓与枯苓抗炎活性差异的主要化学成分。

关键词 黄芩; 条苓提取物; 枯苓提取物; 指纹图谱; 抗炎活性; 谱效关系

Establishment of fingerprints, anti-inflammatory activities and spectrum-effect relationship study of pith-noddecayed and pith-decayed *Scutellaria baicalensis*

JIA Chuanqing^{1,2}, GUO Lanping³, WANG Xiao², YU Zongyuan⁴, CHEN Long², DONG Hongjing²[1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China; 3. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Material Science/State Key Laboratory of Genuine Medicinal Materials Breeding Base, Beijing 100700, China; 4. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the fingerprints of pith-noddecayed and pith-decayed *Scutellaria baicalensis*, and to investigate the difference of their anti-inflammatory activities. **METHODS** HPLC method was adopted to establish the fingerprints of 5 batches of pith-noddecayed *S. baicalensis* and 5 batches of pith-decayed *S. baicalensis*. SIMCA 14.1 software was adopted to screen the markers of weight difference between pith-decayed *S. baicalensis* and pith-noddecayed *S. baicalensis*, using variable importance in projection (VIP) >1 as standard. Using the inhibitory rates of NO, IL-6 and IL-1 β in supernatant of lipopolysaccharide (LPS)-induced monocyte macrophages (RAW264.7 cells) as indexes, the anti-inflammatory activities of pith-decayed and pith-noddecayed *S. baicalensis* were evaluated and median effective concentration (EC₅₀) of NO were calculated. The gray correlation method was used for spectrum-effect relationship analysis; SPSS 26.0 software was used for cluster analysis using the inhibitory rates of NO, IL-6 and IL-1 β in cells at the concentration of 50 μ g/mL. **RESULTS** There were 15 common peaks in 5

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81803662); 中央本级重大增减支项目(No.2060302); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(No.2021CXGC010508)

* 硕士研究生。研究方向: 中药新资源开发及质量控制。E-mail: jcqinge@163.com

#a 通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新资源开发及质量控制。E-mail: yuzys@sohu.com

#b 通信作者: 副研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药化学成分及质量控制。E-mail: donghongjing@sdsas.org

batches of pith-noddecayed *S. baicalensis* and 5 batches of pith-decayed *S. baicalensis*, and the similarity of them was greater than 0.990. There were total of 8 peaks with VIP > 1.0, they were peak 14, 12, 15, 6, 10, 13, 11 and 4. At the concentration of 50 μ g/mL, the inhibitory rates of pith-decayed *S. baicalensis* extract to NO, IL-6, IL-1 β and the average EC₅₀ were 62.14%-71.13%, 3.32%-18.38% and 93.12%-95.47% and 25.35 μ g/mL, respectively; those of pith-noddecayed *S. baicalensis* extract were 39.52% -50.19%,

6.21%-22.55%, 94.10%-96.44% and 58.63 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Average NO inhibition rate of pith-decayed *S. baicalensis* extract was significantly higher than that of pith-noddecayed *S. baicalensis* extract; average EC_{50} and average IL-6 inhibitory rate of pith-decayed *S. baicalensis* extract were significantly lower than those of pith-noddecayed *S. baicalensis* extract ($P < 0.05$). There was no statistical significance in average inhibitory rate of IL-1 β ($P > 0.05$). The correlation degrees of peaks 2-3, 5-8 and 10-11 with inhibitory rate of NO were all greater than 0.8. The correlation degrees of peaks 2, 5, 8-9 with inhibitory rate of IL-1 β were all greater than 0.9. The correlation degrees of 15 common peaks with inhibitory rate of IL-6 were all less than 0.8. Ten batches of samples could be grouped into two categories, K1-K5 were clustered into one category and T12-T16 were clustered into one category. **CONCLUSIONS** At the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, the inhibitory effect of pith-decayed *S. baicalensis* extract to NO is stronger than that of pith-noddecayed *S. baicalensis* extract, while the inhibitory effect on IL-6 is weaker than that of pith-noddecayed *S. baicalensis* extract; they have similar inhibitory effect on IL-1 β . The corresponding components of peak 6, 10-11 are preliminarily identified as main chemical components of the difference in anti-inflammatory activity between pith-decayed *S. baicalensis* and pith-noddecayed *S. baicalensis*.

KEYWORDS *Scutellaria baicalensis*; pith-noddecayed *Scutellaria baicalensis* extract; pith-decayed *Scutellaria baicalensis* extract; fingerprints; anti-inflammatory activity; spectrum-effect relationship

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,为临床常用中药,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]。黄芩生长至3年以上者,其根部上段(老根)木心出现中空、腐朽,但下段仍致密、坚实。由其坚实的下段根部所制饮片为条芩,由其中空、腐朽的上段根部所制饮片为枯芩。《本草经集注》记载:“圆者名条芩为胜,破者名宿芩,其腹中皆烂,故名腐肠,惟取深色坚实者为好”^[2];《药品化义》曰:“一品宜分两用,盖枯芩体轻主浮,专泻肺胃上焦之火,而条芩体重主降,专泻大小肠下焦之火”^[3];《本草易读》记载:“中枯而飘者名枯芩,泻肺利气,止嗽化痰,除风热,清肌表宜之。细实而坚者名条芩,泻大肠火,除湿止痢,养阴退阳”^[4]。由此可见,条芩与枯芩的划分是历代中医药学家的实践总结。然而,目前临床处方均为“黄芩”,并未对条芩和枯芩进行区分,这可能会影响黄芩临床应用的精准化。

现代研究表明,黄芩含有黄酮、挥发油、多糖等活性成分,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种药理活性,其抗炎活性尤为突出^[5-8]。炎症是导致多种疾病的关键因素,包括心脑血管疾病、肺疾病等^[9]。因此,从成分及抗炎活性角度探讨条芩与枯芩的区别,对两者的临床精准应用具有重要的意义。中药指纹图谱是中药谱效关系研究的基础,其能够整体、系统地表征中药主要化学成分的相似性;化学模式识别可体现样品间的差异,从而全面、准确地反映样品的内在质量^[10-11]。基于此,本研究拟采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法建立条芩和枯芩的指纹图谱,并进行化学模式识别分析;同时拟采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导RAW264.7细胞建立炎症模型,探讨条芩、枯芩抗炎活性的差异,并通过灰色关联分析法初步研究其谱效关系,旨在为条芩与枯芩的抗炎活性物质基础研究及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 ACCHROM-S6000 型 HPLC 仪[华谱科仪(北京)科技有限公司], Eclipse Ts2 型

倒置显微镜(日本 Nikon 公司), Spark 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司), BXM-50VE 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司), Scientz-10N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司), DZKW-C 型单列双孔电热恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司), TGL-16A 型医用离心机(湖南平凡科技有限公司), LAB DANCER S25 型微型涡旋振荡器(德国 IKA 公司), HFsafe-1200LC 型生物安全柜、HF90 型 CO_2 培养箱(上海力申科学仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

DMEM 高糖培养基(批号 GP21080140836)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 1928703)购自以色列 Biological Industries 公司;LPS(批号 059M4173V)购自美国 Sigma 公司;二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 1209M036)、MTT(批号 823L051)均购自北京索莱宝科技有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒(批号 032519190612)购自上海碧云天生物技术有限公司;小鼠白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号分别为 279559-002、267273-007)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

5 批条芩和 5 批枯芩药材分别购自各地药材市场、药房或自采,经山东中医药大学药学院李佳教授鉴定为唇形科黄芩属植物黄芩 *S. baicalensis* Georgi 的干燥根。购买或采收后,各药材样品按 2020 年版《中国药典》(一部)“黄芩”项下“黄芩片”的制备工艺制成相应饮片^[1], 备用。5 批条芩和 5 批枯芩药材样品的来源信息见表 1。

1.3 细胞

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购自中国医学科学院基础研究所。

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液的制备 称取各饮片粉末约 0.5 g, 加

表1 5批条芩和5批枯芩药材样品的来源信息

药材	编号	产地	购买/采集时间	来源
枯芩	K1	河北承德	2021年6月	安徽亳州药材市场
枯芩	K2	山西运城	2021年6月	安徽亳州药材市场
枯芩	K3	内蒙古赤峰	2021年6月	安徽亳州药材市场
枯芩	K4	内蒙古赤峰	2021年6月	磐安县经方集中药材有限公司
枯芩	K5	陕西商洛(自采)	2020年10月	陕西商洛农户
条芩	T12	河北承德	2021年3月	河北汉草堂药业有限公司
条芩	T13	陕西榆林	2021年3月	安国润德药业有限公司
条芩	T14	山东莱芜(自采)	2020年9月	莱芜紫光生态园有限公司
条芩	T15	山东日照	2020年6月	山东宏济堂饮片厂
条芩	T16	陕西渭南	2021年3月	济南漱玉平民大药房

入10倍量的70%乙醇,称定质量,加热回流提取2 h,放冷,再次称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,经0.45 μm微孔滤膜,滤过,即得。

2.1.2 色谱条件 以Symmetry® C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 10% A→20% A; 15~36 min, 20% A→25% A; 36~50 min, 25% A→38% A; 50~55 min, 38% A→45% A; 55~65 min, 45% A→65% A; 65~75 min, 65% A→80% A; 75~80 min, 80% A; 80~86 min, 80% A→10% A; 86~91 min, 10% A);流速为1.0 mL/min;检测波长为280 nm;柱温为25 ℃;进样量为5 μL。

2.1.3 精密度的试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号K1),按“2.1.2”项下色谱条件连续进样测定6次,以峰5为参照峰(由于峰5的保留时间适中、分离度良好、峰面积相对较大,故以其为参照峰),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.14%~0.58%(n=6),相对峰面积的RSD为0.46%~3.21%(n=6),表明方法精密度的良好。

2.1.4 稳定性试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号K1),分别于室温下放置0、3、6、9、15、24 h时按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,以峰5为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.17%~1.14%(n=6),相对峰面积的RSD为1.23%~4.66%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取饮片样品(编号K1)粉末,共6份,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,以峰5为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的RSD为0.14%~0.64%(n=6),相对峰面积的RSD为0.67%~3.76%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.6 指纹图谱的建立 分别取5批条芩、5批枯芩饮片样品粉末,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以色谱峰分离度好、信号强度相对较高的K1样品为参照,经多点校正后,采用中位数法生成条芩和枯芩的

HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱(R)。结果显示,5批条芩和5批枯芩饮片共有15个共有峰,详见图1。

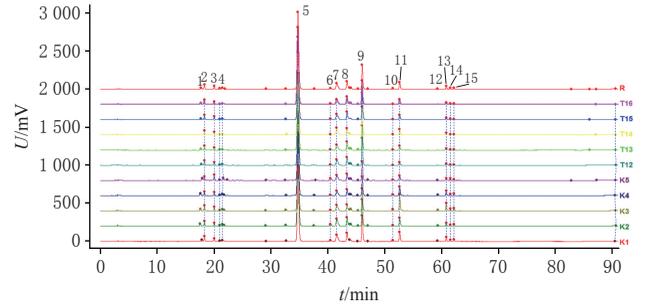


图1 5批条芩和5批枯芩的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱

2.1.7 相似度评价 以对照指纹图谱(R)为参照,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对5批条芩和5批枯芩的指纹图谱进行相似度评价。结果显示,5批条芩和5批枯芩指纹图谱与对照图谱的相似度均大于0.990,表明指纹图谱暂无法区分条芩与枯芩。结果见表2。

表2 5批条芩和5批枯芩的相似度评价结果

编号	K1	K2	K3	K4	K5	T12	T13	T14	T15	T16	R
K1	1.000	0.999	0.997	0.999	0.997	0.997	0.998	0.999	0.998	0.998	0.999
K2	0.999	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000
K3	0.997	0.995	1.000	0.998	0.992	0.989	0.991	0.992	0.991	0.992	0.995
K4	0.999	0.999	0.998	1.000	0.997	0.996	0.997	0.997	0.997	0.997	0.999
K5	0.997	0.999	0.992	0.997	1.000	0.998	0.998	0.997	0.998	0.999	0.999
T12	0.997	0.998	0.989	0.996	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999
T13	0.998	0.999	0.991	0.997	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999
T14	0.999	0.999	0.992	0.997	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999
T15	0.998	0.999	0.991	0.997	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000
T16	0.998	0.999	0.992	0.997	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000
R	0.999	1.000	0.995	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000

2.2 主成分分析

以15个共有峰的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。结果显示,所建PCA模型的解释能力参数(R^2X)为0.962,预测能力参数(Q^2)为0.613,均大于0.5,表明该模型拟合良好^[12]。条芩与枯芩分别位于PCA得分图(图2)的两侧,其中条芩的聚集程度较高,枯芩则较分散,提示该法可区分条芩与枯芩。载荷图中,变量离原点越远,表示其对主成分的影响权重越大^[13]。由共有峰的PCA载荷图(图3)可知,主成分1的主要信息来自于峰1、3~4、6、10~15,主成分2的主要信息来自于峰2、5、7~9,其中对主成分1影响权重较大的变量为峰12、14、15,对主成分2影响权重较大的变量为峰2、7。

2.3 正交偏最小二乘法-判别分析

以15个共有峰的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA)。变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)是评价变量对分类贡献的常用指标, VIP值>1表示该变

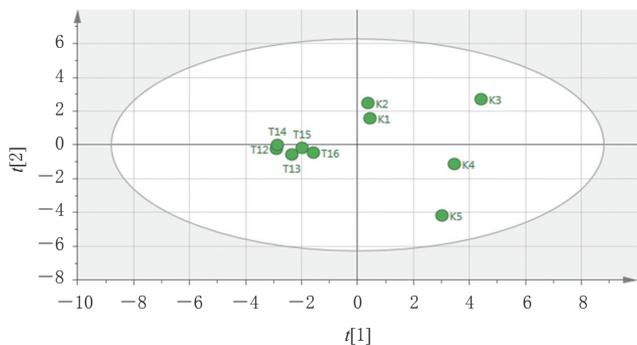


图2 5批条芩和5批枯芩的PCA得分图

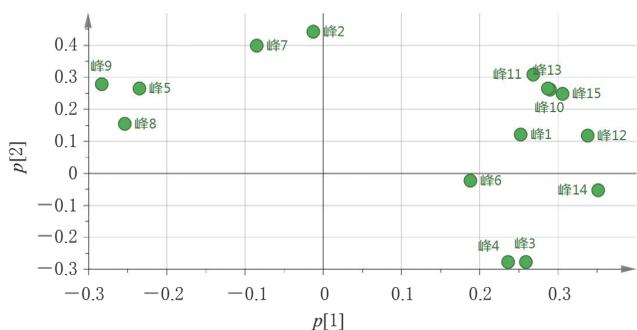


图3 15个共有峰的PCA载荷图

量对分类的贡献率较大,为组间特征性成分^[14]。本研究以VIP值>1为标准筛选影响条芩和枯芩质量的差异标志物。结果显示,共有8个峰的VIP值>1,依次为峰14、12、15、6、10、13、11、4,表明这8个峰对应的成分可能是影响条芩和枯芩质量的差异标志物。结果见图4。

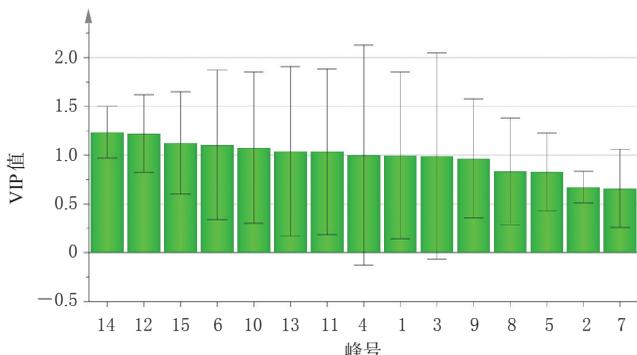


图4 15个共有峰的VIP值

2.4 抗炎活性的测定

2.4.1 提取物和样品母液的制备 取条芩、枯芩饮片各约30 g,加入10倍量的70%乙醇,加热回流提取2 h,滤过,取滤液,减压浓缩至无醇味,冷冻干燥,制得各饮片样品的提取物冻干粉(得率为47%~52%)。称取各冻干粉10 mg,加DMSO溶解,制成质量浓度均为200 mg/mL(以提取物质量计)的样品母液,备用。

2.4.2 细胞毒性评价 采用MTT法进行检测。取对数生长期的RAW264.7细胞,按 1.0×10^6 个/mL接种于96孔板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h(培养条件下同)后,弃去上清液。将细胞分为空白对照组和给药组,每组设置6个复孔。空白对照组加入含5%FBS的DMEM高糖培养基,给药组加入不同浓度的样品溶液

(质量浓度分别为25、50、100、200、400 μg/mL,取“2.4.1”项下样品母液,用含5%FBS的DMEM高糖培养基稀释而得,质量浓度参考前期预实验设置),每孔100 μL。继续培养24 h后,按50 μL/孔加入1 mg/mL的MTT溶液;继续培养4 h后,弃去上清液,每孔加入DMSO 100 μL,采用酶标仪于490 nm波长下检测各孔的吸光度(A)值,并按下式计算细胞存活率(%):细胞存活率(%)=(A_{给药组}/A_{空白对照组})×100%。结果显示,经25~400 μg/mL的提取物作用24 h后,各给药组细胞的平均存活率均大于97%,表明各质量浓度的条芩和枯芩提取物对细胞均无毒性,详见表3。

表3 不同质量浓度提取物对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, n=6, %)

编号	25 μg/mL	50 μg/mL	100 μg/mL	200 μg/mL	400 μg/mL
K1	113.72±5.02	117.75±4.28	129.27±1.14	140.65±1.96	132.10±4.07
K2	114.98±2.55	118.19±7.23	126.65±12.32	134.17±3.56	134.29±3.97
K3	131.53±2.78	126.19±5.11	117.66±9.75	127.74±2.12	99.98±5.77
K4	109.76±5.24	117.65±9.52	122.04±4.45	137.75±3.32	127.15±2.81
K5	117.12±2.32	118.58±3.98	121.99±6.89	124.20±4.73	115.27±9.03
T12	105.88±6.57	102.83±0.77	112.18±2.50	132.00±1.79	136.60±4.63
T13	118.30±4.16	116.23±3.07	117.49±5.59	126.98±2.51	127.08±9.61
T14	98.91±2.35	97.72±3.24	106.91±1.71	115.66±1.60	130.55±5.50
T15	108.39±3.08	108.45±2.14	113.36±2.46	127.67±4.28	130.51±2.01
T16	104.54±3.37	104.70±1.26	104.61±2.35	120.99±1.54	126.62±3.09

2.4.3 NO抑制率的测定 取对数生长期的RAW264.7细胞,按 1.0×10^6 个/mL接种于96孔板中,培养24 h后,弃去上清液。将细胞分为空白对照组、LPS模型组和给药组,每组设置4个复孔。空白对照组加入含5%FBS的DMEM高糖培养基,LPS模型组加入含500 ng/mL LPS、5%FBS的DMEM高糖培养基^[15],给药组加入50 μg/mL样品溶液(质量浓度根据前期预实验和“2.4.2”项下实验结果设置),每孔100 μL。继续培养24 h后,取每孔上清液50 μL,接种至新的96孔板中,根据NO检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪于540 nm波长下检测各孔的A值,采用格里斯法计算NO含量并根据标准曲线计算NO释放量,再按下式计算NO抑制率:NO抑制率(%)=(NO释放量_{LPS模型组}-NO释放量_{给药组})/NO释放量_{LPS模型组}×100%。采用GraphPad Prism 8.0软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用GraphPad Prism 8.0软件计算各样品的半数有效浓度(median effective concentration, EC₅₀)。

测定结果显示,50 μg/mL枯芩提取物的NO抑制率为62.14%~71.13%,条芩提取物为39.52%~50.19%,前者的平均值显著高于后者($P<0.05$);枯芩提取物的EC₅₀为18.81~34.10 μg/mL,条芩提取物为46.67~68.34 μg/mL,前者的平均值显著低于后者($P<0.05$)。结果见表4。

2.4.4 IL-6、IL-1β抑制率的测定 取对数生长期的RAW264.7细胞,按 1.0×10^6 个/mL接种于96孔板中,培养24 h后,弃去上清液。将细胞分为空白对照组、LPS模型组和给药组,每组设置4个复孔。空白对照组加入

表4 50 μg/mL 条芩与枯芩提取物的NO、IL-6、IL-1β抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

编号	NO		IL-6抑制率/%	IL-1β抑制率/%
	NO抑制率/%	EC ₅₀ /(μg/mL)		
K1	71.13±1.94	18.81	7.05±2.37	93.89±0.26
K2	64.94±4.06	25.95	18.38±0.13	93.12±0.32
K3	62.14±2.09	34.10	7.03±0.83	95.34±0.33
K4	63.56±4.57	28.53	3.32±0.56	95.47±0.39
K5	66.44±2.40	19.38	4.00±2.87	95.05±0.08
平均值	65.64±4.26 ^a	25.35 ^a	7.96±5.30 ^a	94.57±1.02
T12	48.57±4.95	46.67	6.21±0.08	95.81±0.45
T13	50.19±4.30	61.51	14.85±0.13	94.10±0.34
T14	48.01±9.45	50.13	17.45±0.07	94.77±0.30
T15	43.51±11.96	68.34	19.18±1.40	96.44±0.47
T16	39.52±1.90	66.49	22.55±0.78	95.15±0.22
平均值	45.96±7.75	58.63	16.05±5.64	95.26±0.90

a: 与条芩提取物平均值比较, $P < 0.05$

含5% FBS的DMEM高糖培养基, LPS模型组加入含500 ng/mL LPS、5% FBS的DMEM高糖培养基^[15], 给药组加入50 μg/mL的样品溶液(质量浓度根据前期预实验和“2.4.2”项下实验结果设置), 每孔100 μL。继续培养24 h后, 取每孔上清液30 μL, 根据ELISA试剂盒说明书进行操作, 采用酶标仪于470 nm波长下检测各孔的A值, 根据标准曲线计算IL-6、IL-1β的释放量, 并按下式计算IL-6或IL-1β的抑制率(%): 抑制率(%) = (IL-6或IL-1β释放量_{LPS模型组} - IL-6或IL-1β释放量_{给药组}) / IL-6或IL-1β释放量_{LPS模型组} × 100%。统计学方法同“2.4.3”项。

测定结果显示, 50 μg/mL 枯芩提取物对IL-6、IL-1β的抑制率分别为3.32%~18.38%、93.12%~95.47%, 条芩提取物分别为6.21%~22.55%、94.10%~96.44%; 其中枯芩提取物的平均IL-6抑制率显著低于条芩提取物($P < 0.05$), 而枯芩与条芩提取物的平均IL-1β抑制率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表4。

2.5 灰色关联分析

2.5.1 原始数据的无量纲化处理

由于原始数据数列单位或量纲不同, 不便于比较, 因此在进行灰色关联分析前需要对数据进行无量纲化处理。本研究采用均值变换法, 即用各序列元素分别除以相应序列平均值。将NO、IL-6、IL-1β抑制率均值化处理后的数据设为参考序列 $Y_{(k)}$ ($k=1, 2, 3 \dots 10$, 为样品编号), 15个共有峰峰面积均值化处理后的数据设为比较序列 $X_{i(k)}$ ($i=1, 2, 3 \dots 15$, 为共有峰峰号), 按下式计算绝对差序列 $\Delta_{i(k)}$: $\Delta_{i(k)} = |Y_{(k)} - X_{i(k)}|$ ^[16]。

2.5.2 关联系数的计算

对于参考序列 $Y_{(k)}$ 有若干个比较序列 $X_{i(k)}$, 绝对差序列中的最小值与最大值分别记为 $\Delta_{(\min)}$ 、 $\Delta_{(\max)}$; ρ 为分辨系数, 一般为0~1, 通常取0.5; 按下式计算关联系数 $\zeta_{i(k)}$: $\zeta_{i(k)} = [\Delta_{(\min)} + \rho \times \Delta_{(\max)}] / [\Delta_{i(k)} + \rho \times \Delta_{(\max)}]$ 。本研究中, 参考序列为NO抑制率时, $\Delta_{(\min)} = 0.0013$, $\Delta_{(\max)} = 1.7825$; 参考序列为IL-6抑制率时, $\Delta_{(\min)} = 0.0338$, $\Delta_{(\max)} = 2.6398$; 参考序列为IL-1β抑制率时, $\Delta_{(\min)} = 0.0013$, $\Delta_{(\max)} = 1.9717$ 。

2.5.3 关联度的计算

关联度(r)为各类关联系数的平

均值, 按下式计算: $r = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \zeta_{i(k)}$ (式中, n 表示比较序列的数据个数)^[16-17]; 当 $r \geq 0.9$ 时, 表示子序列对母序列有显著影响; 当 $0.8 \leq r < 0.9$ 时, 表示有相对显著影响; 当 $0.7 \leq r < 0.8$ 时, 表示有明显影响; 当 $0.6 \leq r < 0.7$ 时, 表示有较小影响^[18]。结果显示, 条芩与枯芩提取物中15个共有峰与各炎症因子抑制率的关联度均大于0.6; 与NO抑制率的关联度由大到小依次为峰3 > 峰2 > 峰7 > 峰6 > 峰10 > 峰5 > 峰11 > 峰8 > 峰14 > 峰9 > 峰4 > 峰1 > 峰15 > 峰13 > 峰12, 与IL-6抑制率的关联度由大到小依次为峰9 > 峰8 > 峰5 > 峰7 > 峰2 > 峰6 > 峰1 > 峰3 > 峰10 > 峰11 > 峰14 > 峰4 > 峰15 > 峰13 > 峰12, 与IL-1β抑制率的关联度由大到小依次为峰5 > 峰9 > 峰2 > 峰8 > 峰7 > 峰3 > 峰6 > 峰1 > 峰10 > 峰14 > 峰11 > 峰4 > 峰13 > 峰15 > 峰12。其中, 峰2~3、5~8、10~11与NO抑制率的关联度均大于0.8; 峰2、5、8~9与IL-1β抑制率的关联度均大于0.9; 各峰与IL-6抑制率的关联度均小于0.8。由于条芩和枯芩提取物对IL-6的抑制率均较低, 对NO、IL-1β的抑制率均较高, 初步确定峰2~3、5~11为黄芩抗炎活性的主要成分; 同时, 结合“2.3”项下结果, 初步确定峰6、10~11为造成条芩与枯芩抗炎活性差异的主要化学成分。结果见表5。

表5 条芩与枯芩提取物中各共有峰与各炎症因子抑制率的关联度结果

峰号	与NO抑制率的关联度	与IL-6抑制率的关联度	与IL-1β抑制率的关联度
1	0.7505	0.6937	0.7617
2	0.8408	0.7376	0.9087
3	0.8480	0.6904	0.8504
4	0.7758	0.6639	0.7144
5	0.8149	0.7553	0.9409
6	0.8174	0.7068	0.7939
7	0.8370	0.7548	0.8888
8	0.8058	0.7599	0.9065
9	0.7913	0.7616	0.9101
10	0.8161	0.6812	0.7488
11	0.8117	0.6774	0.7253
12	0.7106	0.6371	0.6453
13	0.7236	0.6469	0.6828
14	0.7997	0.6647	0.7459
15	0.7405	0.6537	0.6826

2.6 聚类分析

以50 μg/mL浓度下各组细胞的NO、IL-1β、IL-6抑制率为指标, 利用平方欧氏距离为测度, 采用SPSS 26.0软件进行聚类分析。结果显示, 当平方欧氏距离为25时, 10批样品可聚为2类, K1~K5为一类, T12~T16为一类, 表明可将NO、IL-1β、IL-6抑制率作为区分条芩与枯芩的指标。结果见图5。

3 讨论

本研究建立了5批条芩和5批枯芩的HPLC指纹图谱, 确定了15个共有峰, 相似度均大于0.990, 表明指纹图谱不能区分条芩和枯芩。PCA结果显示, 条芩与枯芩分别位于得分图的两侧, 其中条芩的聚集程度较高, 枯

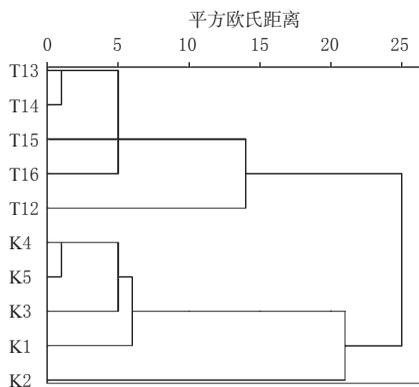


图5 10批样品的聚类分析树状图

芩则较分散,提示该法可区分条芩和枯芩。同时,推测枯芩较为分散的原因可能与采收年限的不同有关。OPLS-DA结果显示,有8个峰的VIP值>1,表明这8个峰对应的成分可能是影响条芩和枯芩质量的差异标志物。

由于NO是氧化应激反应的主要介质,而氧化应激能参与并加剧炎症反应;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、IL-6是由巨噬细胞产生的促炎性细胞因子,可介导炎症反应的发生;NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6是学者们关注较多的炎症因子^[19],加之本课题组前期研究发现,在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,条芩和枯芩提取物对TNF- α 无明显的抑制作用,但对IL-1 β 的抑制作用显著,虽然条芩和枯芩提取物对IL-6的抑制作用较弱,但组间比较仍有显著的差异性,故综合考虑,选择NO、IL-1 β 、IL-6作为评价条芩和枯芩抗炎活性差异的指标。本研究结果显示,各给药组的NO抑制率、IL-6抑制率差异显著,两种提取物对IL-1 β 的抑制率均较高。为在相同质量浓度下比较提取物对各炎症因子的抑制率,故仅对50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提取物对应的数据进行比较。结果显示,在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,枯芩提取物的平均NO抑制率显著高于条芩提取物,平均 EC_{50} 、平均IL-6抑制率均显著低于条芩提取物;两种提取物对IL-1 β 的抑制率均大于90%。这表明在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,枯芩提取物对NO的抑制作用较强,但对IL-6的抑制作用较弱,对IL-1 β 的抑制作用与条芩提取物相当。

灰色关联分析结果显示,峰2~3、5~8、10~11与NO抑制率的关联度均大于0.8;峰2、5、8~9与IL-1 β 抑制率的关联度均大于0.9;各峰与IL-6抑制率的关联度均小于0.8。聚类分析结果显示,当平方欧氏距离为25时,10批样品可聚为2类,K1~K5为一类,T12~T16为一类,表明可将NO、IL-1 β 、IL-6抑制率作为区分条芩与枯芩的指标。结合灰色关联分析和OPLS-DA结果,初步确定峰6、10~11为条芩和枯芩抗炎活性差异的主要化学成分。这表明黄芩的抗炎活性是多种成分共同作用的结果,该结果可为条芩和枯芩功效差异的进一步研究提供依据。

综上所述,在50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下,枯芩提取物对NO的抑制作用较强,但对IL-6的抑制作用较弱,对IL-1 β 的抑制作用与条芩提取物相当;初步确定峰6、10~11对

应成分是条芩和枯芩抗炎活性差异的主要化学成分。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:314-315.
- [2] 陶弘景.本草经集注:辑校本[M].尚志钧,尚元胜,辑校.北京:人民卫生出版社,1994:264.
- [3] 贾所学.药品化义[M].陆拯,王咪咪,陈明显,校点.北京:中国中医药出版社,2015:86.
- [4] 汪切庵.本草易读[M].吕广振,陶振岗,点校.北京:人民卫生出版社,1987:28.
- [5] 胡江慧,刘艳菊,张方蕾,等.枯芩与子芩醇提物对LPS诱导的急性肺损伤保护作用比较研究[J].中成药,2020,42(10):2756-2759.
- [6] 郝翠,翟立海,董红敬,等.Box-Behnken响应面法优化超声波辅助离子液体提取黄芩化学成分方法及抗炎活性评价[J].中国新药杂志,2021,30(11):1031-1037.
- [7] GAO Y, YANG L F, DING X Y, et al. The comprehensive quality evaluation of Scutellariae Radix based on HPLC fingerprint and antibacterial activity[J]. MATEC Web Conf, 2021, 336:06025.
- [8] 房佳敏,曾伟民,张彦龙.不同产地黄芩主要化学成分含量及抗肿瘤活性比较研究[J].中国农学通报,2022,38(4):120-126.
- [9] HOWARD M D, HOOD E D, ZERN B, et al. Nanocarriers for vascular delivery of anti-inflammatory agents[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2014, 54:205-226.
- [10] 张小艺,刘久石,高石曼,等.中药谱效关系的研究方法及应用进展[J].中国中药杂志,2019,44(20):4405-4411.
- [11] 郑振佳,朱文卿,梁浩,等.指纹图谱在食品分析中的应用研究进展[J].食品工业科技,2021,42(12):413-421.
- [12] 吕渭升,位翠杰,潘晓君,等.UPLC-MS/MS法分析旋覆花蜜炙后化学成分的变化[J].中国药房,2021,32(20):2478-2484.
- [13] 李振雨,何嘉莹,童培珍,等.基于UPLC指纹图谱和多成分定量的辛夷药材产地差异性研究[J].中草药,2021,52(1):234-240.
- [14] 赵秋龙,杨沛文,钱大玮,等.不同加工干燥方法对白芍药材中化学成分的影响研究[J].中国中药杂志,2021,46(22):5839-5847.
- [15] 郝翠,段文娟,赵恒强,等.黄芩配方颗粒与标准汤剂体外抗炎活性的比较[J].中国新药杂志,2018,27(11):1309-1314.
- [16] 冯月,段飞鹏,李一圣,等.不同产地金钗石斛醇提物HPLC指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究[J].中国药房,2021,32(15):1825-1830.
- [17] 王增珍,李君荣.关联度分析及其与相关分析的比较[J].中国卫生统计,1991,8(6):22-25.
- [18] 高樱.基于谱-效相关银黄颗粒生产过程质量评价的研究[D].济南:山东中医药大学,2019.
- [19] 汤韵秋,全云云,余琳媛,等.连翘脂素对LPS诱导RAW264.7细胞炎症反应的影响[J].天然产物研究与开发,2019,31(7):1117-1123.

(收稿日期:2021-11-23 修回日期:2022-04-17)

(编辑:陈宏)