

• 药理与临床 •

基于组效关系的壮药岩黄连抑制 HSC-T6 细胞增殖活性成分辨识研究

陆世银¹, 郑 华², 程 邦¹, 吴 方¹, 吴金霞¹, 刘旭文¹, 唐超玲¹, 梁永红¹, 张洪也¹, 阮俊翔¹, 宋 慧^{1*}, 苏志恒^{1*}

1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

2. 广西医科大学 医学科学实验中心, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 建立岩黄连提取物的化学成分与其抑制大鼠肝星状细胞(HSC-T6)作用的组效关系模型, 寻找与药效显著的活性成分。方法 采用正交设计法提取得到 9 个岩黄连提取物, 通过 HPLC 法对岩黄连提取物进行成分表征, 以共有峰的相对峰面积来表征其相对质量分数; MTT 法测定岩黄连提取物抑制 HSC-T6 细胞增殖活性, 以抑制率为评价指标; 利用 SIMCA-P 11.5 软件的正交投影偏最小二乘法(OPLS)分析, 研究共有峰与药效的相关性, 根据 S-载荷图与变异权重参数(VIP)值辨识显著活性成分; 通过 MTT 法及流式细胞仪验证所筛选成分的活性。采用细胞乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒观察所筛选成分对人正常肝细胞(HL-7702) LDH 活性的影响。结果 HPLC 法对 9 个岩黄连提取物进行表征分析结果确定了 21 个共有峰, 其中 19、18、13、20、14 和 16 号共有峰(VIP>1)与岩黄连抑制 HSC-T6 细胞增殖活性显著相关, 并鉴定 18、19 和 20 号共有峰代表的化合物分别为脱氢卡维丁、巴马汀和小檗碱。MTT 结果显示不同质量浓度脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱对 HSC-T6 细胞增殖具有明显抑制作用; 流式细胞术检测结果也与 MTT 结果一致, 脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱(0.10 mg/mL)处理 HSC-T6 细胞后的凋亡率分别为 42.12%、42.22%、36.73%, 明显高于对照组的 1.69% ($P<0.01$)。细胞毒性实验发现当脱氢卡维丁终质量浓度低于 0.15 mg/mL, 巴马汀与小檗碱终质量浓度低于 0.10 mg/mL 时, 对 HL-7702 细胞不具有明显的细胞毒作用。结论 通过组效关系研究首次发现岩黄连提取物中脱氢卡维丁、巴马汀与小檗碱在体外能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖并诱导其凋亡, 且在有效质量浓度下不具有明显的细胞毒作用, 表明这 3 种化学成分极有可能是岩黄连抗肝纤维化作用的潜在活性成分且在实际应用中具备一定的安全性; 同时也提示基于组效关系的研究思路可为天然植物药活性成分的辨识提供行之有效的方法。

关键词: 岩黄连; 组效关系; 大鼠肝星状细胞(HSC-T6); 抗纤维化; 脱氢卡维丁; 巴马汀; 小檗碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)07-1354-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.016

Discrimination of proliferation inhibiting ingredients in *Corydalis soxicala* on rat hepatic stellate cell-T6 based on composition-activity relationship

LU Shi-yin¹, ZHENG Hua², CHENG Bang¹, WU Fang¹, WU Jin-xia¹, LIU Xu-wen¹, TANG Chao-ling¹, LIANG Yong-hong¹, ZHANG Hong-ye¹, RUAN Jun-xiang¹, SONG Hui¹, SU Zhi-heng¹

1. School of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Medical Scientific Research Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To establish the composition-activity relationship (CAR) model based on study of chemical composition and relating proliferation inhibitory rate of *Corydalis soxicala* and recognize the anti-hepatic fibrosis active compounds of *C. soxicala*. **Methods** Nine orthogonal *C. soxicala* extract were analyzed by HPLC, and 21 characteristic peaks were profiled. Anti-hepatic fibrosis activity was investigated by MTT assays on HSC-T6, and the potential active components were identified by scores plot and variable importance in projection (VIP) values by means of orthogonal partial least squares (OPLS) analysis, and the activities of identified components were verified by MTT and flow cytometry. LDH kit was used to detect the effect of dehydrocavidine, palmatine,

收稿日期: 2016-10-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81560626); 广西自然科学基金面上项目(2013GXNSFAA019161)

作者简介: 陆世银(1989—), 男, 壮族, 硕士研究生, 主要从事民族药药理学研究。Tel: (0771)5327162 E-mail: 1175463199@qq.com

*通信作者 苏志恒, 男, 副教授。Tel: (0771)5327162 E-mail: suzhiheng1981@126.com

宋 慧, 女, 副教授。Tel: (0771)5358272 E-mail: gxsonghui@163.com

and berberine on LDH activity. **Results** The results showed that six peaks including peaks 13, 14, 16, 18, 19, and 20 were significantly related to anti-hepatic fibrosis activity among nine orthogonal extract from *C. soxicola*. Peaks 18, 19, and 20 were characterized as dehydrocavidine, palmatine, and berberine, respectively. MTT assay showed that dehydrocavidine, palmatine, and berberine with various concentration significantly inhibited the proliferation of HSC-T6 cells. It was also found in flow cytometry that the apoptotic rates of dehydrocavidine, palmatine, and berberine (0.10 mg/mL) on HSC-T6 were 42.12%, 42.22%, and 36.73%, respectively, which were obviously higher than that of control (1.69%, $P < 0.01$). No obvious cytotoxic effect was found when the final concentration of dehydrocavidine, palmatine, and berberine were less than 0.15, 0.10, and 0.10 mg/mL, respectively. **Conclusion** In this study, it was for the first time found that dehydrocavidine, palmatine, and berberine in *C. soxicola* extract can effectively inhibit the proliferation and induce apoptosis of HSC-T6 based on composition-activity relationship, and there was no obvious cytotoxic effect of the effective concentration, which showed that they may be the active components with potential anti-hepatic fibrosis effect and have a certain security in the application in *C. soxicola*. At the same time, it also suggests that the research ideas based on CAR can provide an effective method for the identification of active components in natural plants.

Key words: *Corydalis soxicola* Bunting; composition-activity relationship; HSC-T6; anti-hepatic fibrosis; dehydrocavidine; palmatine; berberine

岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 为罂粟科紫堇属多年生草本植物, 被收载于《广西中药材标准》, 主要生长在桂西北以及云贵南部山区, 其性凉、味苦, 具有清热解毒、消肿、利湿、止痛、止血等功效^[1-3]。在壮族民间, 其已成为用于治疗肝炎、肝硬化和肝癌等疾病的常用药材。目前已研制有注射液和片剂等中成药制剂, 是临床治疗肝炎特别是乙型肝炎、肝硬化、肝癌等的特效药^[4-6]。肝纤维化是多种慢性肝病病情发展的共同病理基础, 是各种致病因素导致肝内结缔组织异常增生的肝内弥散性细胞外基质 (ECM) 过度沉积的病理过程, 是机体对慢性损伤的主动性修复反应, 与肝硬化、肝癌的发生密切相关^[7-8], 通过研究发现岩黄连生物总碱对慢性肝纤维化大鼠具有肝保护及抗肝纤维化作用^[9-10]。然而, 目前岩黄连抗肝纤维化的活性成分仍未明确。

近年来, 组效关系的研究思路通过数学方法关联中药化学成分组成和药效作用之间的变化, 为有效辨识中药的活性成分群, 阐明中药发挥药效的物质基础和作用机制提供可借鉴的方法^[11-13]。本研究采用 HPLC 的分析技术, 结合大鼠肝星状细胞 (HSC-T6) 模型评价, 采用正交投影的偏最小二乘法 (OPLS), 通过共有峰变化与 HSC-T6 细胞增殖抑制率之间的相关性进行活性成分的筛选, 以揭示岩黄连抗肝纤维化药效物质基础, 为相关药物的研究和开发提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱质谱联用仪 (日本岛津公司); XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美

国安捷伦公司); XS205DU 型分析天平 (百万分之一, 瑞士梅特勒公司); RE-52 型旋转蒸发器 (上海亚荣公司); Coulter Epics XL 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); MULTISKAN MK3 酶联免疫检测仪、CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); CKX-41 倒置荧光显微镜 (德国奥林巴斯公司); 无菌操作台 (长沙米淇仪器设备有限公司); TDL-5A 台式离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司); CD-UPH-II-20L 超纯水器 (成都越纯科技有限公司)。

1.2 细胞与试剂

HSC-T6 和正常人肝 HL-7702 细胞株购自中国科学院上海细胞研究所; 改良型 RPMI 1640 培养基、胎牛血清购于美国 Invitrogen 公司; PBS 磷酸盐缓冲溶液、0.25% 胰酶溶液、青霉素和链霉素混合液为北京索莱宝科技有限公司产品; Annexin V-FITC/PI (批号 20160607) 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH, 批号 20160705) 试剂盒购于南京建成生物工程公司; 对照品脱氢卡维丁 (批号 111667-200401) 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; 巴马汀 (批号 MUST-14022707)、小檗碱 (批号 MUST-14082410) 为成都曼思特生物有限公司产品, 质量分数均大于 98%; 噻唑蓝 (MTT)、阳性药 TGF-1 抑制剂 SB431542 购自美国 Sigma 公司; 乙腈、甲醇 (色谱纯, 成都科龙化工试剂厂); 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

岩黄连药材购自云南 (产地为云南), 由广西药用植物园莫长明副研究员鉴定为罂粟科紫堇属植物岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 全草。

2 方法

2.1 岩黄连提取物的制备

选择浸泡时间(A)、提取次数(B)、提取时间(C)和提取倍量(D)4个因素,并确定3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,见表1。根据表1正交试验表的设计进行提取实验,提取完毕后所得提取液经200目滤布滤过,合并滤液,真空浓缩(真空度 $-0.085\sim-0.095$ MPa,温度 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$)并定容至 1 g/mL , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱分装保存备用。

表1 岩黄连提取物的正交试验

Table 1 Orthogonal experiment of *C. soxicola* extract

试验号	浸泡时间/h (A)	提取次数 (B)	提取时间/h (C)	提取倍量/倍 (D)
1	0	1	1	8
2	0	2	2	10
3	0	3	3	14
4	1	1	2	14
5	1	2	3	8
6	1	3	1	10
7	3	1	3	10
8	3	2	1	14
9	3	3	2	8

2.2 岩黄连提取物 HPLC 分析

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品脱氢卡维丁、巴马汀和小檗碱适量置于量瓶中,分别加入1%盐酸甲醇溶液配制成终质量浓度分别为36、35、12 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 岩黄连水提物在室温下解冻,精密量取0.4 mL提取液于50 mL量瓶中,加入1%盐酸甲醇溶液定容,称定质量,超声处理(功率250 W,频率50 kHz)20 min,取出,放冷,再称定质量,用1%盐酸甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱 Agilent XDB- C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);检测波长为347 nm;流动相为乙腈(A)-1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~5 min, 20%~30% A; 5~25 min, 30%~31% A; 25~35 min, 31%~50% A;柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;体积流量0.5 mL/min;进样量5 μL 。

2.3 岩黄连提取物对 HSC-T6 细胞活性的影响

取对数生长期状态良好的 HSC-T6 细胞,调整浓度为 $8\times 10^3/\text{mL}$,接种于96孔板,每孔100 μL ,24 h后弃去培养液。分别加入含9组正交试验所得

的岩黄连提取物所配制的培养基100 μL [岩黄连提取物的终质量浓度为0.35 mg/mL ^[14],阳性对照组加入等体积的含0.04 mg/mL SB431542的培养液,对照组(不加药)和空白调零组(只有培养基)]加入相同体积的培养液,每组3个复孔。置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 及饱和湿度条件下培养24 h,每孔加入0.5 mg/mL MTT溶液100 μL ,继续孵育4 h后,弃去上清液,每孔加入100 μL 的DMSO,轻度振荡10 min至彻底溶解,在490 nm波长下测定各孔吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 岩黄连活性成分的辨识

将岩黄连9个正交样品的HPLC图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2004A版),将输出的数据矩阵导入SIMCA-P软件(瑞典Umetrics公司,version11.5)中,进行OPLS分析,寻找岩黄连提取物中抑制HSC-T6细胞增殖的活性成分。

2.5 活性成分对 HSC-T6 细胞的活性验证

取对数生长期 HSC-T6 细胞,按 1.2×10^5 细胞数接种于6孔板中培养24 h待细胞贴壁后,吸去孔中培养基,分别加入终质量浓度为0.1 mg/mL 的脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱药液1 mL,对照组加入等体积的培养液。继续培养24 h,胰酶消化细胞,PBS液洗涤2次,用500 μL 的Binding Buffer重悬,加5 μL Annex V-FITC染料混匀染色20~30 min,加5 μL PI避光室温反应10 min,1 h内上流式细胞仪检测。

2.6 活性成分对 HL-7702 细胞毒性实验

取对数生长期的 HL-7702 细胞,按 6×10^3 细胞数接种于96孔培养板中,分为对照组、脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱组,静置培养24 h后,分别换含有空白溶剂以及脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱(0.01、0.02、0.03、0.05、0.08、0.10、0.15、0.20 mg/mL)的含药培养液,复种3孔,培养箱中培养24 h后轻轻吸取细胞上清液按LDH试剂盒说明书操作。

3 结果

3.1 岩黄连提取物 HPLC 分析结果

采用“2.2”项方法采集岩黄连提取物9个正交样品的HPLC图,经中药色谱指纹图谱相似度评价系统分析确定了岩黄连提取物色谱轮廓中的21个共有峰,标注为1~21号(图1);虽然21个峰均在不同提取条件制备的提取物中出现,然而这21个峰在不

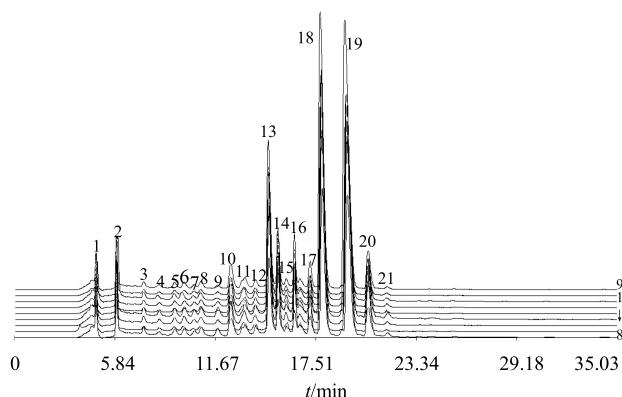


图 1 岩黄连提取物 9 个正交样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of nine orthogonal samples of *C. soxicola* extract

同提取条件中的峰面积存在不同程度的差异。

3.2 岩黄连提取物抑制 HSC-T6 细胞增殖活性

采用“2.3”项下 MTT 法测定, 检测得到了岩黄连提取物 9 个正交样品在 0.35 mg/mL 下对 HSC-T6 细胞的增殖抑制率分别为 5.6%、30.1%、90.1%、24.2%、47.1%、52.0%、5.3%、51.6%、79.4%。可以看出, 岩黄连提取物对 HSC-T6 细胞具有明显的增殖抑制作用, 但由于提取的条件不同, 岩黄连提取物对 HSC-T6 细胞的增殖抑制活性存在较大的差异, 抑制率最高为岩黄连提取物正交 3 号样品, 抑制率达到 90.1%; 抑制率最低为岩黄连提取物正交 7 号样品, 抑制率为 5.3%。

3.3 活性成分的辨识

将岩黄连提取物 9 个正交样品的 HPLC 色谱峰面积数据和 HSC-T6 细胞的增殖抑制率分别作为自变量 (X) 和因变量 (Y), 导入 SIMCA-P 软件中进行 OPLS 回归分析, 根据 S-载荷图、变异权重系数 (VIP) 信息来判断 X 对 Y 的贡献大小, 一般认为 S-载荷图中距原点越远的变量贡献越大, VIP 值越大的变量贡献也越大。提取 1 个主成分后, 模型的参数为 $R^2_X=0.983$, $R^2_Y=0.941$, $Q^2=0.871$, 表明构建的模型具有很强的解释能力及预测能力。从 S-载荷图 (图 2-A) 和 VIP 图 (图 2-B, 选取 VIP 大于 1 的变量) 可见, 对增殖抑制率有较大贡献的共有峰峰号依次为 $19>18>13>20>14>16$ 。

为了验证所选 6 个色谱峰对药物活性贡献的大小, 以这 6 个色谱峰的峰面积数据为 X , 重新进行 OPLS 分析, 提取 1 个主成分后, 模型的参数为 $R^2_X=0.995$, $R^2_Y=0.93$, $Q^2=0.858$, 表明新的模型对 HSC-T6 细胞的增殖抑制率 (Y) 依然具有很好的解释能力, 同时模型具有较好的预测能力。因此, 推测这 6 个共有峰对应的化学物质构成了岩黄连提取物抑制 HSC-T6 细胞增殖活性的主要药效成分群。

3.4 对 VIP 值贡献较大变量的鉴定

通过与对照品保留时间及紫外吸收光谱 (图 3) 的比对, 初步鉴定出岩黄连提取物共有峰中的 18、19 和 20 号峰对应的成分分别为脱氢卡维丁、巴马汀和小檗碱。

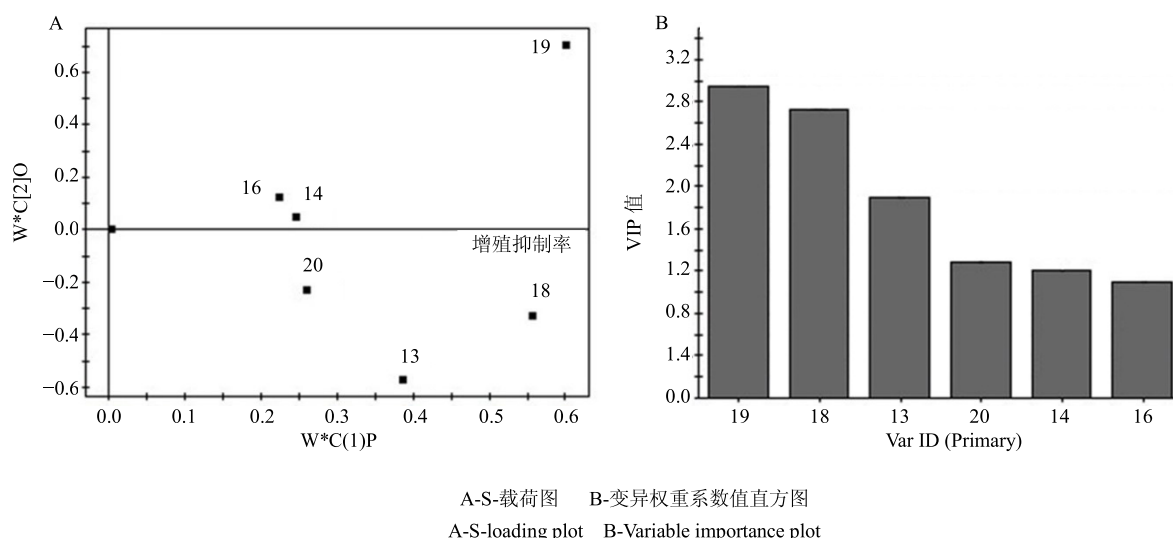


图 2 岩黄连提取物 6 个共有峰峰面积与增殖抑制率的 OPLS 分析结果
Fig. 2 OPLS model of six characteristic peaks and inhibitory rates of *C. soxicola* extract

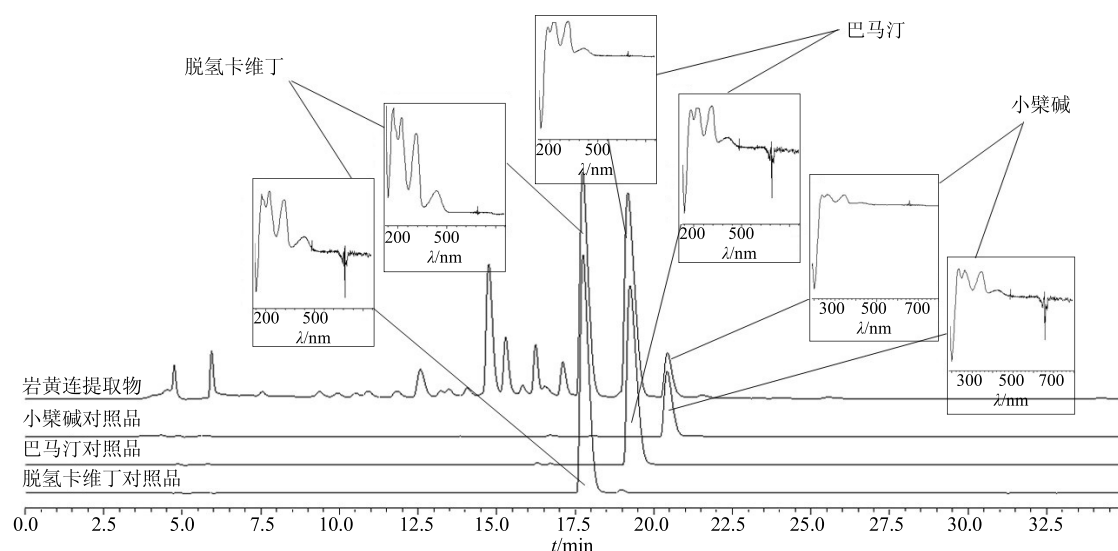


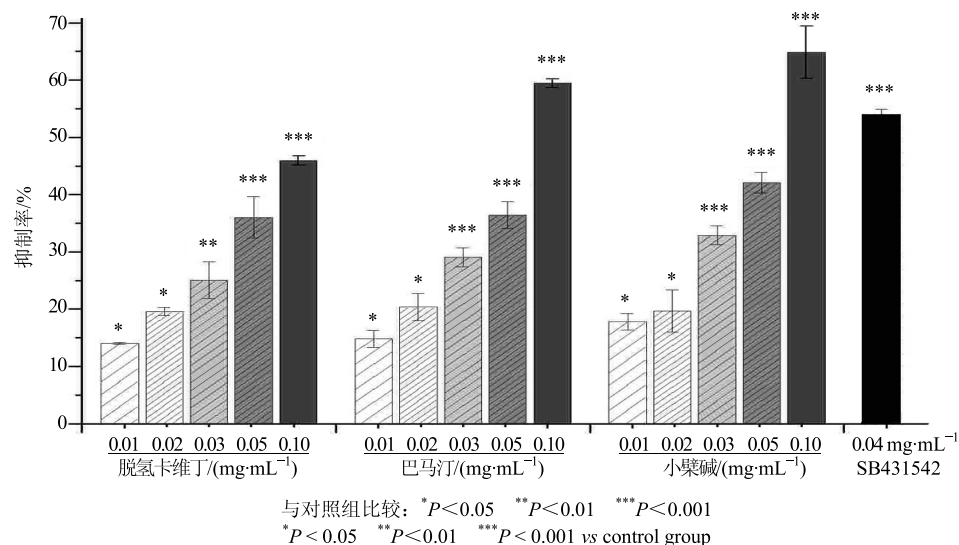
图 3 岩黄连提取物 HPLC 图和紫外光谱图

Fig. 3 HPLC of *C. soxicola* extract and ultraviolet spectra of corresponding constituents

3.5 脱氢卡维丁、巴马汀与小檗碱对 HSC-T6 细胞的活性验证

采用“2.3”项下 MTT 法, HSC-T6 细胞经脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱处理 24 h 后测定细胞增殖抑制率, 结果显示 0.01、0.02、0.03、0.05、0.10 mg/mL 的脱氢卡维丁组细胞增殖抑制率分别为 $(14.0 \pm 0.2) \%$ 、 $(19.6 \pm 0.7) \%$ 、 $(25.0 \pm 3.2) \%$ 、 $(36.0 \pm 3.6) \%$ 、 $(46.0 \pm 0.8) \%$ ($P < 0.05$); 0.01、0.02、0.03、0.05、0.10 mg/mL 巴马汀组细胞增殖抑制率分别为 $(14.8 \pm 1.5) \%$ 、 $(20.4 \pm 2.4) \%$ 、 $(29.1 \pm 1.6) \%$ 、 $(36.4 \pm 2.3) \%$ 、 $(59.4 \pm 0.8) \%$ ($P < 0.001$); 0.01、0.02、0.03、0.05、0.10 mg/mL 小檗碱组细胞增殖抑

制率分别为 $(17.8 \pm 1.5) \%$ 、 $(19.7 \pm 3.7) \%$ 、 $(32.9 \pm 1.7) \%$ 、 $(42.1 \pm 1.8) \%$ 、 $(64.9 \pm 4.6) \%$ ($P < 0.001$), 均呈浓度依赖性; 阳性药 0.04 mg/mL SB431542 组细胞增殖抑制率为 $(54.0 \pm 0.9) \%$ ($P < 0.001$), 结果见图 4。为了证实脱氢卡维丁、巴马汀与小檗碱可以诱导 HSC-T6 细胞凋亡, 实验通过流式细胞仪观察经 0.10 mg/mL 脱氢卡维丁、巴马汀及小檗碱处理 24 h 后的 HSC-T6 细胞凋亡率的变化。结果显示, 与对照组相比, 各给药组均可显著诱导 HSC-T6 细胞凋亡, 具有显著性差异。对照组、脱氢卡维丁、巴马汀与小檗碱组细胞凋亡率分别为 1.69%、42.12%、42.22%、36.73% ($P < 0.01$)。见图 5。

图 4 脱氢卡维丁、巴马汀、小檗碱对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Inhibition of dehydrocavidine, palmatine, and berberine on proliferation of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

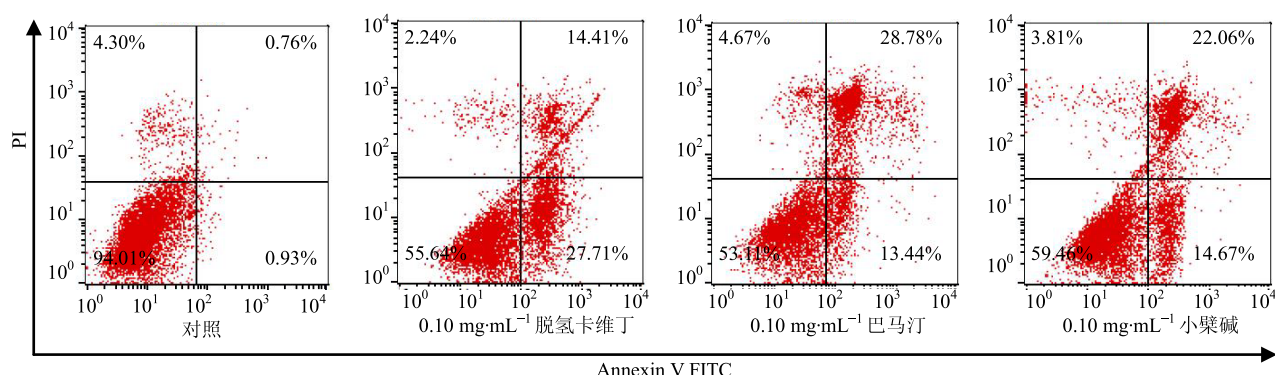


图 5 脱氢卡维丁、巴马汀、小檗碱对 HCS-T6 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of dehydrocavidine, palmatine, and berberine on apoptosis of HCS-T6 cells

3.6 脱氢卡维丁、巴马汀与小檗碱对 HL-7702 细胞的毒性检测

结果显示, 系列质量浓度的巴马汀、脱氢卡维丁和小檗碱分别与 HL-7702 细胞作用 24 h 后, 安全剂量范围分别为 0.01~0.10、0.01~0.15、0.01~0.10 mg/mL。超过其安全使用剂量时, 细胞毒性表现具有一定的肝毒性 (表 2)。

4 讨论

肝纤维化是由代谢、遗传、病毒等原因引起慢性肝病的主要特征, 其进一步发展可形成肝硬化, 也是影响慢性肝病预后的重要环节, 严重影响患者健康及生命^[15-16]。肝纤维化的病理学基础为 ECM 的合成增加, 降解减少, 导致胶原过度沉积。目前普遍认为 HSC 是肝脏合成 ECM 的主要细胞^[17]。HSC 的激活和增殖不仅是肝纤维化的最终共同途径, 而且还是肝纤维化的细胞学基础, 在肝纤维化的病理生理过程中起着关键作用, 是肝纤维化发生、发展的中心环节^[18-19]。肝纤维化恢复期清除活

化的 HSC 主要通过细胞凋亡机制, 细胞凋亡是 HSC 细胞数量减少的主要途径。因此, 诱导活化的 HSC 细胞凋亡是抗肝纤维化的重要方向^[20-21]。近年来, 诱导 HSC 细胞凋亡成为肝纤维化治疗研究的热点, 通过 HSC 细胞凋亡, 减少胶原合成的来源, 促进 ECM 的降解, 有利于肝纤维化的逆转。所以诱导 HSC 细胞凋亡是抗肝纤维化的重要环节, 对肝纤维化自行恢复和抗肝纤维化具有重要的意义。

然而迄今为止, 现代医学尚无良好的治疗肝纤维化的方法, 而中医中药以其对肝纤维化的良好预防和治疗效果及低毒性反应等特点目前已引起国内外学者的关注。岩黄连是一种具有治疗肝炎、肝硬化的广西特色药材^[22], 为壮族的常用药。天然植物药化学成分复杂, 其发挥药效往往是多成分之间的协同作用, 不同的成分对药效所起的贡献也是有差异的^[23-24], 因此, 从药材整体成分切入研究能更客观反映天然植物药的作用特点。基于此, 本实验将岩黄连提取物作为整体进行研究, 结合 HSC-T6

表 2 巴马汀、脱氢卡维丁和小檗碱对 HL-7702 细胞 LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of dehydrocavidine, palmatine, and berberine on LDH level in HL-7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	LDH/(U·L ⁻¹)	组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	LDH/(U·L ⁻¹)	组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	LDH/(U·L ⁻¹)
对照	—	630 ± 12	对照	—	630 ± 12	对照	—	630 ± 12
脱氢卡维丁	0.01	608 ± 30	巴马汀	0.01	607 ± 74	小檗碱	0.01	612 ± 9
	0.02	616 ± 19		0.02	604 ± 30		0.02	605 ± 17
	0.03	621 ± 28		0.03	611 ± 16		0.03	623 ± 21
	0.05	630 ± 12		0.05	612 ± 8		0.05	619 ± 64
	0.08	627 ± 34		0.08	623 ± 22		0.08	642 ± 43
	0.10	644 ± 15		0.10	635 ± 8		0.10	644 ± 34
	0.15	658 ± 27		0.15	701 ± 12*		0.15	678 ± 16*
	0.20	678 ± 25*		0.20	940 ± 56*		0.20	864 ± 69*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

细胞模型对不同化学组成的提取物进行药效评价,运用组效关系的思路将化学成分的波动与药效的变化进行有效的关联,从而锁定药效成分群,并通过与对照品保留时间及紫外吸收光谱的比对辨识成分群中的活性成分。

本实验通过 OPLS 分析发现并确定了岩黄连提取物中对药效贡献较大的 3 个药效成分,为脱氢卡维丁、巴马汀、小檗碱,MTT 法检测结果发现其均能明显抑制 HSC-T6 的增殖;并且,流式细胞术结果也发现其能够诱导 HSC-T6 发生凋亡,说明脱氢卡维丁、巴马汀和小檗碱具有抑制 HSC-T6 增殖以及诱导其凋亡的作用,初步提示这 3 个化学成分极有可能是岩黄连抗肝纤维化药效活性成分群的重要组成部分。肝星状细胞的激活受多种细胞因子的影响,转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是最重要的细胞因子之一,它可以通过直接和间接途径对肝星状细胞的转化过程起关键性的调节作用,是目前已知的最重要的促 HSC 活化因子之一。课题组前期研究发现岩黄连可使慢性肝纤维化大鼠肝组织 TGF- $\beta 1$ 表达下调^[25],结合本研究结果,提示岩黄连中能回调 TGF- $\beta 1$ 表达的物质基础极有可能是包括脱氢卡维丁、巴马汀和小檗碱等在内的某个或某些活性成分(群),本研究也为阐明岩黄连在抗慢性肝纤维化过程中活性成分的干预机制及模式提供了线索。

体外肝细胞培养是一种简便快速的体外毒理学实验系统,而 LDH 是活细胞的内含酶之一,其释放率的变化可以体现细胞膜通透性的改变。当细胞膜受损严重时,胞浆中的 LDH 会释放到培养液中,培养液中 LDH 的量多少可反映细胞膜的损伤程度,因此细胞外液中的 LDH 活性增加是细胞损伤的重要标志之一^[26]。本研究表明,巴马汀、脱氢卡维丁和小檗碱在一定的剂量范围内对肝细胞无细胞毒性,为岩黄连在临床应用过程中的安全性提供了可靠的科学依据。另外,对于本实验中发现的与活性密切相关的尚未鉴定的共有峰,仍有必要进一步运用液质联用等分析手段进行结构分析,以便深入揭示岩黄连抗肝纤维化的药效物质基础,同时,为了进一步阐明岩黄连有效成分的药效机制,可考虑在后续实验中应用 PCR 及蛋白免疫印迹等分子生物学技术对活性成分进行更全面与深入的研究,药效活性成分群的锁定及其作用机制将为阐明岩黄连抗肝纤维化作用的起效机制及该药材的质量控制提供重要的科学依据。

参考文献

- [1] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [2] Moreira R K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(11): 1728-1734.
- [3] Mutluay R, Ozenirler S, Poyraz A. The expression of bcl-2 in chronic liver diseases [J]. *Saudi Med J*, 2005, 26(8): 1245-1249.
- [4] Adrian J E, Poelstra K, Kamps J A. Addressing liver fibrosis with liposomes targeted to hepatic stellate cells [J]. *J Liposome Res*, 2007, 17(3/4): 205-218.
- [5] Yin M F, Lian L H, Piao D M, et al. Tetrandrine stimulates the apoptosis of hepatic stellate cells and ameliorates development of fibrosis in a thioacetamide rat model [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(8): 1214-1220.
- [6] 李荣华, 彭 岳, 赵铁建, 等. 白花丹对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(12): 1171-1177.
- [7] 唐有为. 细胞外基质降解系统与肝纤维化 [J]. 医学综述, 2000, 6(5): 209-210.
- [8] Iwamoto H, Nakamuta M, Tada S, et al. Platelet-derived growthfactor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth [J]. *J Lab Clin Med*, 2000, 135(5): 406-412.
- [9] 尹 华. 岩黄连与丹参注射液合用对慢性乙型肝炎肝纤维化的影响 [J]. 实用医学杂志, 2001, 17(8): 782-783.
- [10] 梁永红, 贾 杰, Spencer P S, 等. 岩黄连生物总碱对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta 1$ 及 MMP-9 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2620-2622.
- [11] Zhang J J, Wang Y L, Feng X B, et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells [J]. *Bio Pharm Bull*, 2011, 34(3): 342-348.
- [12] Watson M R, Wallace K, Gieling R, et al. NF- κ B is a critical regulator of the survival of rodent and human hepatic my of ibroblasts [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(4): 589-597.
- [13] Jiang J L, Jin X L, Zhang H, et al. Identification of antitumor constituents in curcuminoids from *Curcuma longa* L. based on the composition-activity relationship [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70: 664-670.
- [14] 唐超玲, 郑 华, 王 捷, 等. 基于组效关系的壮药岩黄连提取物抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 活性成分辨识研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2372-2375.
- [15] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.

- [16] 蒋水元, 胡兴华, 赵瑞峰. 岩黄连引种栽培研究 [J]. 广西植物, 2002, 22(5): 469-473.
- [17] 王 阳. 岩黄连注射液配合介入疗法治疗伴有肝细胞黄疸的晚期肝癌临床观察 [J]. 吉林医学, 2010, 31(13): 1737-1738.
- [18] 韦记青, 蒋水元, 蒋运生, 等. 药用植物岩黄连研究概述 [J]. 广西科学院学报, 2006, 22(2): 108-111.
- [19] 陆瑞群, 庞雅琴, 庞广福. 岩黄连的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(5): 159-160.
- [20] 韩胜男, 张晓杭, 周培培, 等. 化学计量学在中药组效关系研究中的应用进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2595-2602.
- [21] 蒋建兰, 丁洪涛, 苏 鑫, 等. 基于组效关系的姜黄挥发油抗肿瘤活性成分辨识研究 [J]. 分析化学研究报告, 2012, 40(10): 1488-1493.
- [22] 吴颖瑞, 马云宝, 赵友兴, 等. 岩黄连的抗乙肝病毒活性成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 32-37.
- [23] 孔 靓, 李宝才, 向 诚. 中药有效成分组的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3289-3296.
- [24] Wei J B, Li X, Song H, *et al.* Characterization and determination of antioxidant components in the leaves of *Camellia chrysantha* (Hu) Tuyama based on composition-activity relationship approach [J]. *J Food Drug Anal*, 2014, 23(1): 40-48.
- [25] 梁永红, 贾 杰, Spencer P S, 等. 岩黄连生物总碱对肝纤维化大鼠 TGF- β 1 及 MMP-9 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2620-2622.
- [26] 郭 晶, 宋文华, 丁 峰, 等. 萘醌类化合物对 HL-7702 细胞 LDH 释放率以及线粒体膜电位的影响 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2012, 8(4): 6-12.