

基于“组分-药效”关系研究木芙蓉叶体外抗脂多糖诱导的急性乳腺炎作用

高 雍¹, 陈晓兰^{1*}, 杨长福¹, 谢树才¹, 范耕齐¹, 陈 磊¹, 李月平¹, 谌文元^{1,2}, 黄耀磊¹

1. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 毕节医学高等专科学校, 贵州 毕节 551700

摘 要: **目的** 为了提高木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* 叶的临床疗效, 对其有效组分进行配伍研究并建立设计空间, 为制剂成型工艺研究奠定基础。**方法** 体外培养牛乳腺上皮细胞 (BMEC), 以 CCK-8 法检测的细胞存活率和试剂盒法检测的肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-1 β 分泌量为指标, 筛选脂多糖 (LPS) 造模的适宜浓度及时间; 应用建立的 BMEC 细胞的 LPS 模型, 以细胞存活率和 TNF- α 、IL-1 β 分泌量为指标, 筛选出木芙蓉叶抗急性乳腺炎有效组分——芦丁、异槲皮苷、槲皮素、山柰酚、金丝桃苷的最佳配伍组合; 以细胞存活率为指标, 采用单因素实验初步筛选最佳组合成分中芦丁、异槲皮苷、山柰酚抗 LPS 诱导 BMEC 细胞的有效给药浓度; 通过 Box-Behnken 设计建立模型, 采用多指标叠加法建立芦丁、异槲皮苷、山柰酚抗 LPS 诱导 BMEC 细胞的设计空间, 并以细胞存活率和细胞上清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量为指标, 对随机的选取空间点内和点外进行验证, 筛选出给药浓度。**结果** 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 刺激 BMEC 细胞 24 h 制备模型; 木芙蓉叶抗急性乳腺炎有效组分的最佳配伍组合为芦丁、异槲皮苷和山柰酚 3 个成分; 建立的设计空间芦丁的质量浓度为 96~104 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷的质量浓度为 45~54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚的质量浓度为 4.5~6.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 经验证, 在此空间内的点均在所设的预测范围内。**结论** 成功筛选出木芙蓉叶有效组分的最佳配伍, 且建立的设计空间工艺稳定可靠。

关键词: 木芙蓉叶; 有效组分; 设计空间; 急性乳腺炎; 体外抗炎; 芦丁; 异槲皮苷; 山柰酚

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)05-1145-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.007

In vitro anti-LPS-induced acute mastitis effect of *Hibiscus mutabilis* leaves studied based on "component-efficacy" relationship

GAO Yong¹, CHEN Xiaolan¹, YANG Changfu¹, XIE Shucui¹, FAN Gengqi¹, CHEN Lei¹, LI Yueping¹, CHEN Wenyan^{1,2}, HUANG Yaolei¹

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Bijie Medical College, Bijie 551700, China

Abstract: Objective To improve the clinical efficacy of *H. manihot* leaves, the effective components were studied for compatibility and a design space was established to lay the foundation for subsequent formulation and process research. **Methods** Bovine mammary epithelial cells (BMEC) were cultured *in vitro*. The appropriate concentration and time of lipopolysaccharide (LPS) for model establishment were screened by cell viability detected by CCK-8 and the secretion of TNF- α and IL-1 β detected by kits. Using the established LPS model of BMEC cells, the best compatibility combination of effective components of *H. manihot* leaves against acute mastitis (rutin, isorhamnetin, quercetin, kaempferol and hyperoside) was screened by cell viability and the secretion of TNF- α and IL-1 β . The effective drug concentration of rutin, isorhamnetin and kaempferol against LPS-induced BMEC cells was preliminarily screened by single factor experiments with cell viability as the index. A model was established by Box-Behnken design, and the design space of rutin, isorhamnetin and kaempferol against LPS-induced BMEC cells was established by multi-index superposition method. The random points within and outside the space were verified by cell viability and the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the cell supernatant as the index, and the drug concentration was screened. **Results** The model was established by stimulating BMEC cells

收稿日期: 2024-10-23

基金项目: 贵州省基础研究计划 (自然科学类) (黔科合基础-ZK [2023] 一般 407); 贵州中医药大学外用制剂研究中心; 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项课题 (QYZZ-2025-066); 毕节市科技计划项目 (毕科合 (2024) 15 号)

作者简介: 高 雍 (2001—), 男, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为中药、民族药药物新剂型与新技术。E-mail: 1614781544@qq.com

***通信作者:** 陈晓兰, 博士, 教授, 研究方向为中药、民族药药物新剂型与新技术。E-mail: chenxiaolan76@126.com

with $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS for 24 h; the best compatibility combination of effective components of *H. manihot* leaves against acute mastitis was rutin, isorhamnetin and kaempferol; the established design space was rutin mass concentration of $96\text{--}104 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, isorhamnetin mass concentration of $45\text{--}54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and kaempferol mass concentration of $4.5\text{--}6.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. All the points within this space were within the predicted range after verification. **Conclusion** The best compatibility of effective components of *H. manihot* leaves was successfully screened, and the established design space process was stable and reliable.

Key words: *Hibiscus mutabilis*; effective components; design space; acute mastitis; *in vitro* anti-inflammatory; rutin; isoquercetin; kaempferol

炎症反应是机体应对有害刺激的一种防御性反应,但过度和持续性炎症反应会严重影响机体的健康,其特征为不正常的产生促炎介质^[1]。急性乳腺炎是乳腺管内和周围结缔组织的炎症^[2],临床上表现为乳腺局部疼痛、发热、红肿、寒战等症状^[3]。有研究报道表明急性乳腺炎是哺乳期妇女常见的产后疾病,发病率高达 33%,并且随着病情发展若没有得到及时控制,则会发展成乳房脓肿,给患者造成二次伤害^[4]。

木芙蓉叶为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的干燥叶,具有清肺凉血、散热解毒、消肿排脓等功效,用于治疗多种炎症性疾病^[5]。民间常将其捣烂敷贴乳房治疗急性乳腺炎^[6]。黄酮类成分是木芙蓉叶的主要有效成分,现代药理研究表明木芙蓉叶具有抗炎镇痛、抑菌等作用,在乳腺炎、皮炎方面具有广泛应用^[7]。

本课题组前期通过网络药理学结合细胞验证实验得出木芙蓉叶可有效抑制炎症细胞中肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素(IL)的表达,以及木芙蓉治疗急性乳腺炎的 5 个主要有效成分(芦丁、槲皮素、山柰酚、金丝桃苷、异槲皮苷)。由于 5 个成分的理化性质有一定的差异,不同配伍组合对治疗急性乳腺炎效果的影响不清楚,而质量源于设计(QbD)理念是通过相关试验设计来评价关键质量属性和关键工艺参数的模型,是一种比较系统性的研究方法^[8]。本课题拟引入 QbD 理念研究这 5 个有效成分在一定范围内变化对药效的影响,从而建立设计空间,以期为木芙蓉叶透皮给药制剂的开发利用以及为乳腺炎患者的治疗提供参考。

1 材料与仪器

1.1 主要仪器

L600 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); HH-2S 智能恒温水浴锅(常州恩培仪器制造有限公司); TS100 倒置显微镜(NILON 公司); USA 3131 二氧化碳恒温培养箱(美国热电公

司); MLS-3020 全自动高压灭菌锅(日本三洋有限公司); EPED-E2-20TF 实验室级超纯水器(南京易普易达科技发展有限公司); SW-CJ-2FD 超净工作台、GZX-9240MBE 电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); FlexStation3 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); DW-86L626-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱(海尔特种电器有限公司)。

1.2 药物与主要试剂

木芙蓉叶总黄酮(质量分数 70%, 实验室自制)^[9]; 地塞米松(上海源叶生物科技有限公司, 批号 B25793); 芦丁(批号 A05GB144263, 质量分数 98%)、异槲皮苷(批号 X29O11Y128970, 质量分数 98%)、槲皮素(批号 C28J11Y116820, 质量分数 98%)、山柰酚(批号 G03J11L117305, 质量分数 98%)、金丝桃苷(批号 J16GB143379, 质量分数 98%), 上海源叶生物科技有限公司; RPMI 1640 基础培养基(批号 8123408, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司); 磷酸盐缓冲液(PBS, 批号 20220608)、二甲基亚砜 DMSO(批号 1121E0325), 北京索莱宝科技有限公司; CCK-8(批号 K101828133EF5E, 美国 APEX BIO 公司); 胎牛血清(FBS, 批号 SA220119, 武汉普诺赛生命科技有限公司); 青霉素-链霉素(批号 20220405)、0.25% 胰蛋白酶消化液(批号 20220407), 赛澳美细胞技术有限公司; 脂多糖(LPS, 批号 0000189847, SIGMA 公司); 牛 TNF- α 试剂盒(批号 202212)、牛 IL-1 β 试剂盒(批号 202212)、牛 IL-6 试剂盒(批号 202304), 深圳子科生物科技有限公司。

1.3 细胞株

牛乳腺上皮细胞(BMEC, 批号 202211, 广州吉妮欧生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 DMSO 用量考察

调整对数生长期的 BMEC 细胞密度为 $3 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种于 96 孔板内, 待细胞

生长贴壁后,设置空白组、对照组、DMSO(2.000%、1.000%、0.500%、0.250%、0.125%、0.100%)组,空白组无细胞(仅有培养基),对照组不加 DMSO。培养 24 h 后,弃去原培养基,每孔加入 10% CCK-8 溶液 100 μL ,继续培养 2 h,在 450 nm 下测定 A 值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型浓度和时间的筛选

以细胞存活率及 TNF- α 分泌量为评价指标筛选出适宜的 LPS 浓度诱导 BMEC 细胞炎症模型。调整对数生长期的 BMEC 细胞密度为 $3 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 100 μL 接种于 96 孔板内,待细胞生长贴壁后,设置空白组、对照组、LPS(50.0、20.0、10.0、2.0、1.5、1.0、0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组,空白组无细胞(仅有培养基),对照组不加 LPS。培养 24 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率,试剂盒法检测细胞上清中 TNF- α 分泌量。

筛选出 LPS 适宜造模浓度后,选择适宜浓度,设置 LPS 造模 0、6、12、24、48 h 组,培养结束后,试剂盒法检测细胞上清中 TNF- α 分泌量。

2.3 木芙蓉叶 5 个有效单体成分配伍关系考察

木芙蓉叶纯化物中 5 个单体成分—芦丁(A)、异槲皮苷(B)、槲皮素(C)、山柰酚(D)、金丝桃苷(E)含量依次为每克叶子中含有 121.72、19.80、6.89、4.89、2.59 mg,因此配伍分组时质量比设置为 47.00 : 7.64 : 2.66 : 1.89 : 1.00。5 个单体组合: 1 ABCDE; 4 个单体组合: 2 ABCD、3 ABCE、4 ABDE、5 ACDE、6 BCDE; 3 个单体组合: 7 ABC、8 ABD、9 ABE、10 ACD、11 BCD、12 ACE、13 BCE、14 ADE、15 BDE、16 CDE; 2 个单体组合: 17 AB、18 AC、19 AD、20 AE、21 BC、22 BD、23 BE、24 CD、25 CE、26 DE; 单个给药: 27 A、28 B、29 C、30 D、31 E。

BMEC 细胞接种方法同“2.1”项,设置空白组、对照组、模型组、上述 1~31 配伍组($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),空白组无细胞(仅有培养基),对照组不加 LPS 及药物,模型组用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激 24 h,给药组在 LPS 刺激的同时加药。CCK-8 法检测细胞存活率,试剂盒法检测细胞上清中 TNF- α 、IL-1 β 分泌量,具体操作方法同“2.2”项。

2.4 药物给药浓度的筛选

2.4.1 药物安全浓度筛选 BMEC 细胞接种方法

同“2.2”项,设置空白组、对照组、木芙蓉叶总黄酮(1、10、100、500、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组、最佳组合成分(960、480、320、120、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组、阳性药地塞米松(MTX, 0.1、1.0、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组,药物处理 24 h 后,CCK-8 法检测细胞存活率,具体操作方法同“2.1”项。

2.4.2 单因素实验初步筛选最佳组合成分的有效给药浓度 以细胞存活率为指标,采用单因素实验初步筛选最佳组合成分中芦丁、异槲皮苷、山柰酚抗 LPS 诱导 BMEC 细胞的有效给药浓度。BMEC 细胞接种、造模、给药、细胞存活率检测方法均同“2.3”项。组别设置如下:

- (1) 空白组、对照组、模型组、组合成分组: 异槲皮苷($20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、山柰酚($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、芦丁(25、50、75、100、150、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);
- (2) 空白组、对照组、模型组、组合成分组: 芦丁($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、山柰酚($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、异槲皮苷(5、10、20、40、50、80、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);
- (3) 空白组、对照组、模型组、组合成分组: 芦丁($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、异槲皮苷($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、山柰酚(1、2、4、8、15、20、25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.5 Box-Behnken 响应面的建立

以 Box-Behnken 中心组合实验设计原理优化关键工艺参数,以芦丁给药质量浓度(X_1)、异槲皮苷给药质量浓度(X_2)、山柰酚给药质量浓度(X_3)为自变量,以细胞存活率(Y_1)、TNF- α 含量(Y_2)、IL-1 β 含量(Y_3)作为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Box-Behnken 设计,各因素设置 3 个水平,见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验因素
Table 1 Box-Behnken experimental factors

水平	$X_1/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$X_2/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	$X_3/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
-1	80	30	2
0	100	50	5
1	120	70	8

2.6 设计空间建立及验证

2.6.1 设计空间建立 根据 Box-Behnken 响应面结果,利用多指标叠加法建立木芙蓉叶有效组分抗急性乳腺炎的有效给药范围,将优化目标设定为细胞存活率 $\geq 90\%$,TNF- α 含量 $\leq 225 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,IL-1 β 含量 $\leq 350 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在设定的参数范围内选取符合条件的公共区域,构建设计空间,同时以 Overlay Plot 图进行展示。

2.6.2 设计空间的验证 在设计空间图中选取 2 个点内和 2 个点外 4 个不同区域内的点来进行验证。设置空白组、对照组、模型组、点内 1 (芦丁 $97 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷 $49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、点内 2 (芦丁 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷 $54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、点外 1 (芦丁 $88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、点外 2 (芦丁 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚 $7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、木芙蓉叶总黄酮 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、MTX ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组。BMEC 细胞接种、造模、给药方法均同“2.3”项。CCK-8 法检测细胞存活率, 试剂盒法检测细胞上清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量。

2.7 统计学分析

实验数据用 SPSS 17.00 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析 (One-way ANOVA) 用于进行多组间差异分析, 使用 GraphPad 8.0.2 进行作图。

3 结果

3.1 DMSO 对 BMEC 细胞存活率的影响

DMSO 作用于 BMEC 细胞 24 h 后, 细胞存活率结果如图 1 所示, 与对照组相比, 当 DMSO 的体积分数 $<0.5\%$ 时, 细胞存活率正常; 当 DMSO 体积分数 $\geq 0.5\%$ 时, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明当 DMSO 体积分数高于 0.5% 时可对 BMEC 细胞造成损伤。故选择后续实验 DMSO 的体积分数为 0.1% 。

3.2 LPS 浓度和时间的筛选

3.2.1 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型浓度的筛选 如图 2 所示, 与对照组比较, 随着 LPS 质量浓度不

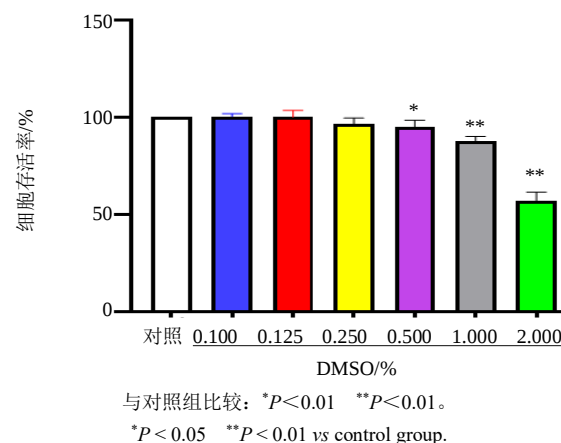


图 1 DMSO 不同体积分数对 BMEC 细胞存活率的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

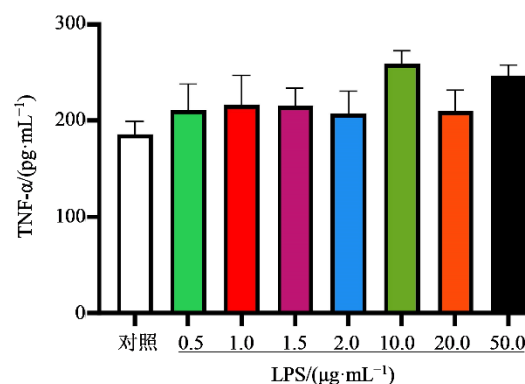
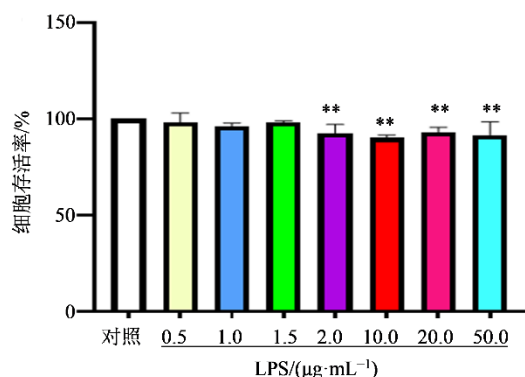
Fig. 1 Effect of different volume fraction of DMSO on viability of BMEC cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

断增大, 细胞存活率不同程度地降低, 当 LPS 的质量浓度 $\geq 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$); 当 LPS 质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率最低, 且此质量浓度下分泌的 TNF- α 的量最多。综合考虑, 选择 LPS 造模质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.2.2 LPS 诱导 BMEC 细胞炎症模型时间的筛选 结果如图 3 所示, 与 0 h 比较, LPS 其余造模时间均能增加 TNF- α 的含量, 24、48 h 差异显著 ($P < 0.01$), 当造模时间为 24 h 时, BMEC 细胞所分泌 TNF- α 的量最多, 故选择后续实验造模时间为 24 h。

3.3 5 个单体成分配伍关系考察结果

3.3.1 5 个单体成分不同配伍对 LPS 诱导 BMEC 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 的影响 如表 2 所示, 与对



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 LPS 不同浓度对 BMEC 细胞存活率及 TNF- α 分泌量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of LPS on viability and secretion of TNF- α of BMEC cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

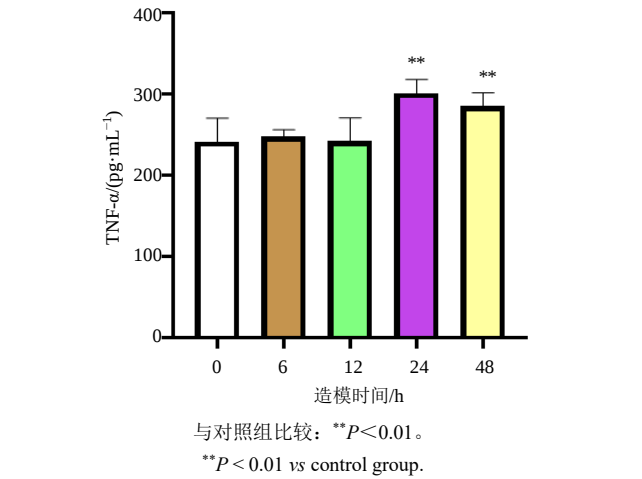


图 3 LPS 不同作用时间 BMEC 细胞分泌 TNF-α 的量 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 3 Content of TNF-α secreted by BMEC cells at different action times of LPS ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

表 2 不同配伍对 LPS 诱导 BMEC 细胞分泌 IL-1β、TNF-α 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Table 2 Levels of IL-1β and TNF-α secreted by LPS-induced BMEC cells in different compatibility groups ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1β/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF-α/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1β/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF-α/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	—	103.69±5.86	188.59±21.41	16	40	225.59±9.00**	300.04±12.16**
模型	—	252.69±6.02##	348.00±22.36##	17	40	210.00±7.13**	294.60±6.78**
1	40	212.57±9.46**	301.82±25.76**	18	40	195.00±7.05**	328.06±18.71
2	40	221.06±9.49**	216.06±30.17**	19	40	206.08±16.45**	276.40±30.40**
3	40	205.36±9.97**	240.88±8.29**	20	40	197.28±12.85**	334.70±16.13
4	40	195.72±9.01**	282.59±6.46**	21	40	198.73±12.45**	296.54±7.25**
5	40	224.92±7.02**	235.44±21.11**	22	40	187.04±3.37**	278.92±34.48**
6	40	226.88±6.52**	324.60±19.94	23	40	202.72±12.84**	258.71±7.41**
7	40	206.08±3.27**	288.73±19.56**	24	40	173.52±7.88**	309.06±23.76**
8	40	170.25±8.87**	231.14±11.39**	25	40	177.43±3.76**	316.69±18.25
9	40	212.14±11.76**	215.60±19.40**	26	40	193.77±15.54**	300.25±23.05**
10	40	208.60±13.54**	251.16±3.99**	27	40	220.31±16.47**	302.12±25.54**
11	40	207.81±3.45**	233.62±26.80**	28	40	226.20±9.13**	274.42±9.55**
12	40	214.49±7.48**	301.14±7.42**	29	40	210.22±6.81**	254.86±17.40**
13	40	195.12±7.61**	276.82±39.30**	30	40	179.17±8.70**	308.30±21.61**
14	40	219.00±7.59**	292.21±40.81**	31	40	192.16±11.23**	280.60±26.31**
15	40	215.18±6.13**	272.30±2.71**				

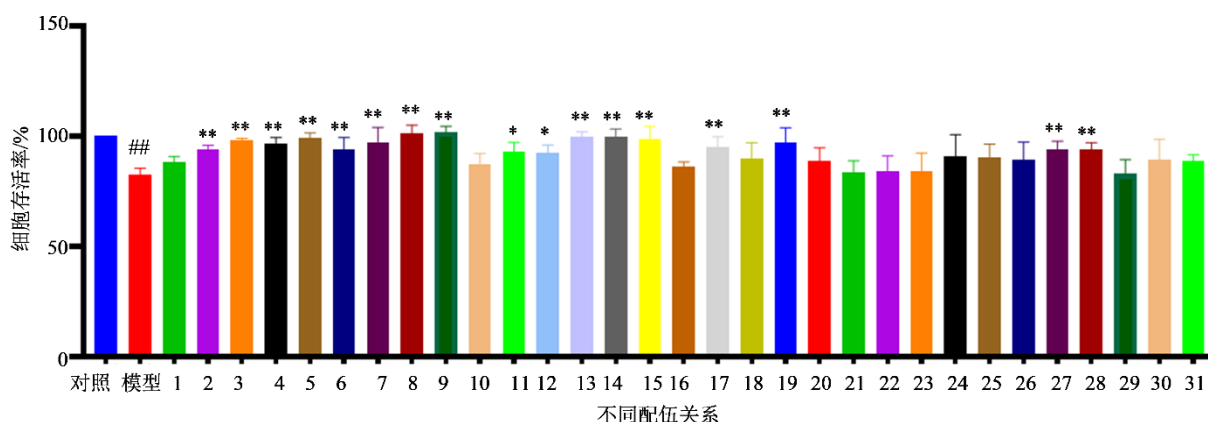
与对照组比较: ## $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ 。
$P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs model group.

3.3.2 不同配伍组对 LPS 诱导 BMEC 细胞存活率的影响 如图 4 所示,与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,除配伍序号为 1、10、16、18、20、21、22、23、24、25、26、29、30、31 外,各配伍组均能显著增加 BMCE 细胞存活率 ($P<0.05$ 、 0.01),各配伍组作用强弱顺序为:9>8>13>14>5>15>3>

照组比较,模型组的 IL-1β 分泌量显著上升 ($P<0.01$),表明造模成功;与模型组比较,各配伍对 IL-1β 分泌量具有显著的抑制作用 ($P<0.01$)。各配伍组作用强弱顺序为:8>24>25>30>22>31>26>18>13>4>20>21>23>3>7>19>11>10>17>29>9>1>12>15>14>27>2>5>16>28>6。

与对照组比较,模型组的 TNF-α 分泌量显著上升 ($P<0.01$);与模型组比较,除序号为 6、18、20、25 的配伍组,其余各配伍组对 TNF-α 生成的量具有显著的抑制作用 ($P<0.01$)。各配伍组作用强弱顺序为:9>2>8>11>5>3>10>29>23>15>28>19>13>22>31>4>7>14>17>21>16>26>12>1>27>30>24>25>6>18>20。

7>19>4>17>6>27>28>2>11>12>24>25>18>26>30>31>20>1>10>16>23>22>21>29。
综合考虑不同配伍组对 LPS 诱导 BMEC 细胞存活率和 IL-1β、TNF-α 分泌量的影响,后续实验选择序号为 8 配伍组,即 ABD (芦丁、异槲皮苷、山柰酚) 作为最佳配伍组合。



与对照组比较: $^{##}P<0.01$; 与模型组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ 。
 $^{##}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

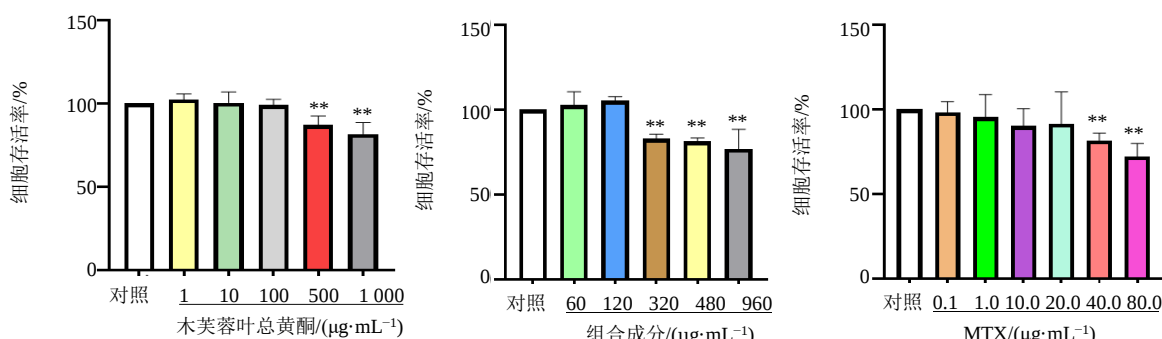
图 4 不同配伍关系对 LPS 诱导 BMEC 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 4 Effect of different compatibility relationships on viability of LPS-induced BMEC cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3.4 不同浓度药物对 BMEC 细胞存活率的影响

根据图 5 的结果可知, 当木芙蓉叶总黄酮给药质量浓度 $\geq 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 组合成分 (芦丁、异槲皮苷、槲皮素、山柰酚、金丝桃苷质量比为 47.00 : 7.64 : 2.66 : 1.89 : 1.00) 质量浓度 $\geq 320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

MTX 给药质量浓度 $\geq 40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 药物对细胞有毒害作用。当木芙蓉叶总黄酮浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、MTX 浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 与对照组细胞存活率相差最小, 故后期实验选择以上 2 个浓度进行实验。



与对照组比较: $^{**}P<0.01$ 。

$^{**}P<0.01$ vs control group.

图 5 不同浓度各药物对 BMEC 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of each drug on viability of BMEC cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

3.5 单因素实验初步筛选最佳组合成分的有效给药浓度

与对照组相比, 模型组细胞存活率显著降低 ($P<0.01$)。当芦丁质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率最高, 故后续实验选择芦丁质量浓度在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。当异槲皮苷质量浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率最高, 故后续实验选择异槲皮苷质量浓度在 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。当山柰酚质量浓度为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率最高, 故后续实验选择山柰酚质量浓度在 $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右。结果见图 6。

3.6 Box-Behnken 响应面实验结果

Box-Behnken 响应面实验设计结果见表 3, Box-Behnken 响应面实验数据方差分析结果见 4。根据方差分析结果可知, 模型具有显著性 ($P<0.05$), 表明该方程模型拟合较好。经 Design-Expert 8.0.6 软件拟合, 得到关于细胞存活率、TNF- α 含量、IL-1 β 含量的二次多项式方程: $Y_1=92.20+2.38 X_1-1.50 X_2-0.38 X_3-3.00 X_1X_2-0.75 X_1X_3+X_2X_3-3.23 X_1^2-0.98 X_2^2-0.72 X_3^2$, $Y_2=212.80+14.88 X_1+4.75 X_2-12.13 X_3-1.50 X_1X_2+1.25 X_1X_3+6.00 X_2X_3+1.73 X_1^2-7.03 X_2^2+10.22 X_3^2$, $Y_3=340.80+$

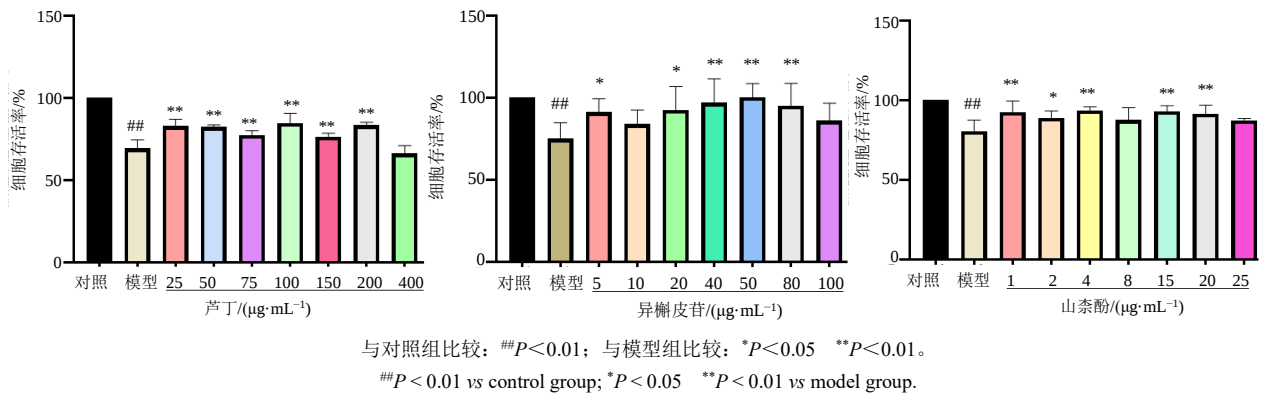


图 6 不同浓度芦丁、异槲皮苷、山奈酚对 BMEC 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)
Fig. 6 Effect of different concentrations of rutin on viability of BMEC cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

表 3 Box-Behnken 实验设计与结果($\bar{x} \pm s, n=9$)
Table 3 Box-Behnken experimental design and results ($\bar{x} \pm s, n=9$)

试验号	因素			$Y_1/\%$	$Y_2/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$Y_3(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	$X_1/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_3/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$			
1	120	30	5	94.01 ± 6.25	226.23 ± 20.57	367.10 ± 4.70
2	80	50	8	85.94 ± 12.86	200.50 ± 10.45	344.95 ± 15.66
3	80	30	5	85.26 ± 4.56	183.14 ± 20.80	355.17 ± 1.80
4	100	30	2	92.84 ± 12.62	227.46 ± 7.67	361.26 ± 6.49

表 4 响应面实验数据方差分析
Table 4 Analysis of variance of experimental data on response surfaces

响应值	项目	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
细胞存活率	模型	1 557.1	9	17.30	10.05	0.003 0	显著
	X_1	45.12	1	45.12	26.21	0.001 4	显著
	X_2	18.00	1	18.00	10.46	0.014 4	显著
	X_3	1.13	1	1.13	0.65	0.445 5	显著
	X_1X_2	36.00	1	6.00	20.91	0.002 6	显著
	X_1X_3	2.25	1	2.25	1.31	0.290 5	显著
	X_2X_3	1.990×10^{-13}	1	1.990×10^{-13}	1.156×10^{-13}	1.000 0	显著
	X_1^2	43.79	1	43.79	25.44	0.001 5	显著
	X_2^2	4.00	1	4.00	2.33	0.171 1	显著
	X_3^2	2.21	1	2.21	1.29	0.294 2	显著
	残差	12.05	7	1.72			显著
	失拟项	9.25	3	3.08	4.40	0.093 0	不显著
	纯误差	2.80	4	0.70			不显著
	误差	167.76	16				不显著
TNF- α 含量	模型	3 919.21	9	435.47	5.88	0.014 6	显著
	X_1	1 770.13	1	1 770.13	23.90	0.001 8	显著
	X_2	180.50	1	180.50	2.44	0.162 5	显著
	X_3	1 176.13	1	1 176.13	15.88	0.005 3	显著
	X_1X_2	9.00	1	9.00	0.12	0.737 7	显著
	X_1X_3	6.25	1	6.25	0.084	0.779 9	显著
	X_2X_3	144.00	1	144.00	1.94	0.205 9	显著
	X_1^2	12.53	1	12.53	0.17	0.693 2	显著

表 4 (续)

响应值	项目	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
IL-1β 含量	X_2^2	207.79	1	207.79	2.81	0.137 9	显著
	X_3^2	440.21	1	440.21	5.94	0.044 9	显著
	残差	518.55	7	74.08			显著
	失拟项	237.75	3	79.25	1.13	0.437 4	不显著
	纯误差	280.80	4	70.20			不显著
	模型	1 910.95	9	212.33	4.52	0.029 7	显著
	X_1	105.13	1	105.13	2.24	0.178 5	显著
	X_2	112.50	1	112.50	2.39	0.165 8	显著
	X_3	210.12	1	210.12	4.47	0.072 3	显著
	X_1X_2	156.25	1	156.25	3.32	0.111 1	显著
	X_1X_3	4.00	1	4.00	0.085	0.779 0	显著
	X_2X_3	30.25	1	30.25	0.64	0.448 8	显著
	X_1^2	566.57	1	566.57	12.05	0.010 4	显著
	X_2^2	169.78	1	169.78	3.61	0.099 1	显著
	X_3^2	429.52	1	429.52	9.14	0.019 3	显著
	残差	329.05	7	47.01			显著
	失拟项	258.25	3	86.08	4.86	0.080 3	不显著
	纯误差	70.80	4	17.70			不显著
	误差	2 240.00	16				不显著

3.63 X_1 −3.75 X_2 −5.13 X_3 −6.25 X_1X_2 + X_1X_3 −2.75 X_2X_3 +11.60 X_1^2 +6.35 X_2^2 +10.10 X_3^2 。由细胞存活率方程可知, X_1 与细胞存活率呈正相关, 其用量越大细胞存活率越高, X_2 、 X_3 与细胞存活率呈负相关, 用量越大细胞存活率越低。由 TNF-α 含量方程可知, X_1 、 X_2 与 TNF-α 含量呈正相关, 用量越大 TNF-α 含量越高, X_3 与 TNF-α 含量呈负相关, 用量越大 TNF-α 含量越低。由 IL-1β 含量方程可知, X_1 与 IL-1β 含量呈正相关, 用量越大 IL-1β 含量越

高, X_1 、 X_2 与 IL-1β 含量呈负相关, 用量越大 IL-1β 含量越低。

3.7 设计空间建立及验证

3.7.1 设计空间建立 结果如图 7 所示, 在 Overlay Plot 图中灰色区域为不满足条件的空间, 浅灰色区域有 5%可能不符合要求, 被称为风险空间。黄色区域为符合条件的空间, 在此空间内, 木芙蓉叶有效组分给药浓度的评价指标都在设定的目标范围内。为进一步确保配伍组分的药效, 对设

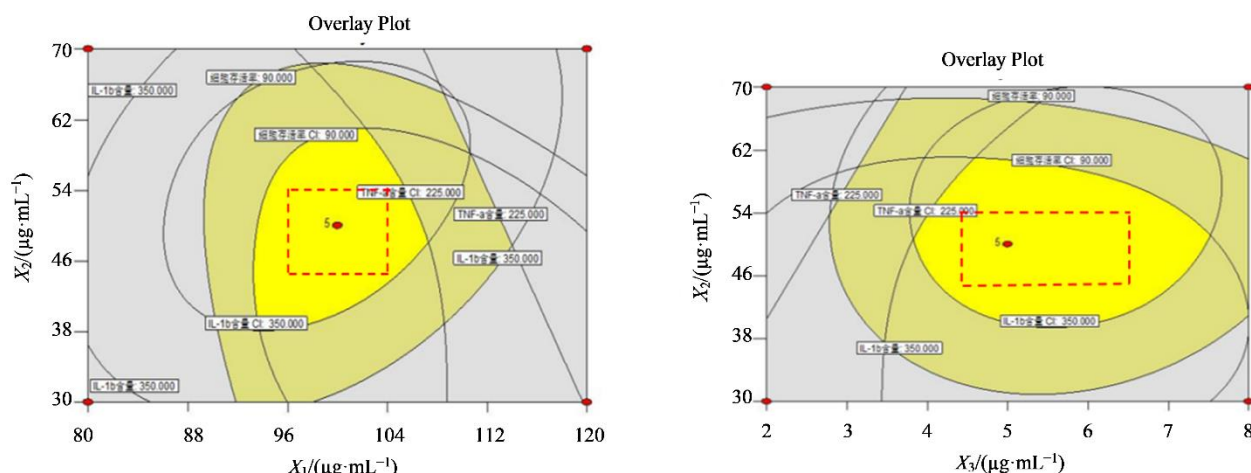


图 7 设计空间图

Fig. 7 Design space diagram

计空间进行适当的缩小，即为红色虚线框部分：芦丁质量浓度为 96~104 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，异槲皮苷质量浓度为 45~54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，山柰酚质量浓度为 4.5~6.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.7.2 验证结果 各处理组作用于 BMEC 细胞 24 h 后，细胞存活率和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 分泌量见表 5。与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低，而 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌量显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比，各给药组均能显著升高细

胞存活率 ($P<0.05$)，对 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的生成具有抑制作用，除点内 1 的 IL-1 β 外均具有显著性差异 ($P<0.05$)，其中空间内的点的细胞存活率、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的生成量均在设定的空间范围内，而空间外的点不满足空间要求。虽然 IL-6 的分泌量不确定是否满足空间要求，但从结果可以看出空间内点的 IL-6 的分泌量较空间外点的分泌量低，这也反映了空间内的结果优于空间外。

表 5 细胞存活率和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 分泌量 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 5 Results of cell viability and content of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	细胞存活率/%	TNF- α / ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1 β / ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-6/ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	100.00 $\pm$ 0.00	106.83 $\pm$ 14.44	139.98 $\pm$ 8.55	102.01 $\pm$ 12.06
模型	62.53 $\pm$ 8.49 [#]	311.49 $\pm$ 16.50 [#]	428.66 $\pm$ 9.87 [#]	258.26 $\pm$ 7.26 [#]
点内 1	91.30 $\pm$ 1.72 [*]	222.02 $\pm$ 4.86 [*]	308.21 $\pm$ 17.88	177.23 $\pm$ 27.56 [*]
点内 2	92.47 $\pm$ 3.83 [*]	214.28 $\pm$ 7.27 [*]	322.99 $\pm$ 6.62 [*]	186.82 $\pm$ 3.81 [*]
点外 1	86.37 $\pm$ 6.19 [*]	232.08 $\pm$ 7.65 [*]	357.97 $\pm$ 7.45 [*]	211.16 $\pm$ 5.23 [*]
点外 2	79.65 $\pm$ 7.35 [*]	249.47 $\pm$ 20.04 [*]	360.46 $\pm$ 7.31 [*]	226.22 $\pm$ 5.40 [*]
木芙蓉叶总黄酮	93.26 $\pm$ 3.64 [*]	198.97 $\pm$ 6.50 [*]	324.99 $\pm$ 8.45 [*]	174.86 $\pm$ 10.47 [*]
MTX	96.80 $\pm$ 5.51 [*]	189.12 $\pm$ 7.23 [*]	270.03 $\pm$ 23.72 [*]	163.75 $\pm$ 4.91 [*]

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ；与模型组比较：^{*} $P<0.05$ 。

[#] $P<0.05$ vs control group；^{*} $P<0.05$ vs model group.

4 讨论

乳腺上皮细胞是乳腺中主要的细胞类型，也是抵御外来病原体入侵的第一道防线。人乳腺上皮细胞几乎被研究者作为乳腺癌的细胞模型进行研究^[10-11]，而奶牛乳腺上皮细胞具有易操作、价格低等优点，是乳腺炎的常用细胞模型^[12]。因此本实验采取牛乳腺上皮细胞进行实验。

实验所用药物不能直接溶于培养基或 PBS，因此需要选择适宜的溶剂将药物溶解后方便给药。DMSO 是实验室常用的助溶剂，具有“万能溶剂”的称号，故本实验选择 DMSO 作为药物的助溶剂。但是，DMSO 自身对细胞具有毒性作用，所以在使用时需要对其浓度和用量进行考察。

细胞存活率是衡量细胞生存能力的重要指标，只有确保一定的细胞数量，才能够有利于细胞学实验的开展；IL-1 β 具有很强的促炎活性，可诱导产生多种促炎介质，如细胞因子，同时对不同种类的细胞可产生多重作用^[13-14]；TNF- α 是一种多效促炎细胞因子，属于 TNF 超家族配体，与多种疾病相关，在多种发育及免疫过程中发挥着不同作用，如炎症、脂质代谢等^[15]。因此，本实验以细胞存活率、TNF- α 和 IL-1 β 分泌量作为关键质量属性，QbD 多

应用于中药提取、成型工艺以及干燥工艺等领域，而本实验将设计空间引入到药效学领域的研究，虽然仅采用体外实验进行设计空间的药效学研究，但可为设计空间应用到体内研究提供一定的参考意义。为进一步临床给药剂量的设置提供基础数据。

本研究通过 QbD 和设计空间及验证实验对木芙蓉叶 5 种主要成分配伍抗乳腺炎进行筛选实验，结果表明当芦丁质量浓度为 96~104 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷质量浓度为 45~54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、山柰酚质量浓度为 4.5~6.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行配伍组合时效果最好且与阳性药相近。但在研究过程中发现该药存在透皮速率低、给药浓度低，且在治疗乳腺炎方面中医常使用外敷、针灸等疗法，而微针是一种新型经皮给药制剂，可穿过表皮直接给药，具有安全、有效、对人体无痛感的优势。因此课题组后续将进一步把该药与微针透皮给药系统结合进行研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 朱文宁, 彭丽娜, 孙莉莉, 等. 大麻二酚对机体炎症作用的可视化分析 [J]. 按摩与康复医学, 2023, 14(10): 95-99.

- Zhu W N, Peng L N, Sun L L, et al. Visualization analysis of cannabinoid on inflammation [J]. Chin Manip Rehabil Med, 2023, 14(10): 95-99.
- [2] Juran J M. *Juran on quality by design: the new steps for planning quality intogoods and services* [M]. New York: Free Press, 1992.
- [3] US Food and Drug Administration (FDA). Pharmaceutical cGMPs for the 21st century-a risk-based approach [S]. 2004.
- [4] Singh J. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use [J]. J Pharmacol Pharmacother, 2015, 6(3): 185-187.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [6] 欧阳莉茜, 尹月娥, 罗宝珠. 复方瓜蒌皮草药膏外敷对急性乳腺炎的临床观察 [J]. 北方药学, 2020, 17(7): 114-115.
Ouyang L Q, Yin Y E, Luo B Z. Clinical observation on external application of compound *Trichosanthes kirilowii* fur ointment for acute mastitis [J]. J N Pharm, 2020, 17(7): 114-115.
- [7] 冯丽萍, 黄李璐, 叶磊, 等. 木槿属药用植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2023, 46(7): 1813-1823.
Feng L P, Huang L L, Ye L, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of medicinal plants of the *Hibiscus Genus* [J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(7): 1813-1823.
- [8] 施文婷, 刘远俊, 张兰兰, 等. 基于质量源于设计理念和信息熵赋值法优化陈皮配方颗粒喷雾干燥工艺 [J]. 环球中医药, 2023, 16(11): 2207-2214.
Shi W T, Liu Y J, Zhang L L, et al. Optimization of spray drying process for *Citri Reticulatae Pericarpium* formula granules based on quality by design concept and information entropy assignment method [J]. Glob Tradit Chin Med, 2023, 16(11): 2207-2214.
- [9] 贵州中医药大学. 一种木芙蓉总黄酮可溶性微针的制备方法: 202210333405.1 [P]. 2023-09-05.
Guizhou University of Chinese Medicine Preparation method of a soluble microneedle with total flavonoids from *Hibiscus manihot*: 202210333405.1 [P]. 2023-09-05.
- [10] 胡启超. miR-375 在奶牛乳腺上皮细胞炎症反应中的作用研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
Hu Q C. Study on the role of miR-375 in inflammatory reaction of mammary epithelial cells in dairy cows [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.
- [11] 樊嘉琦, 贾芳, 李宇思, 等. 黄芪多糖及黄芪甲苷干预对脂多糖诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症的作用 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(4): 16-28.
Fan J Q, Jia F, Li Y S, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide and astragaloside IV on lipopolysaccharides-induced inflammation of bovine mammary epithelial cells [J]. J South China Agric Univ, 2022, 43(4): 16-28.
- [12] 高建朝, 张志生, 张京力, 等. 圣草酚通过 miR-128-3p/MAPK 轴对乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(9): 1187-1194.
Gao J C, Zhang Z S, Zhang J L, et al. Effects of eriodictyol on proliferation and apoptosis of breast cancer cells via miR-128-3p/MAPK axis [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(9): 1187-1194.
- [13] 杨杰. 芦丁的体外抗炎作用及机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
Yang J. Study on the *in vitro* anti-inflammatory effect and mechanism of rutin [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019.
- [14] Topal İ, Bilgin A Ö, Çimen F K, et al. The effect of rutin on cisplatin-induced oxidative cardiac damage in rats [J]. Anatol J Cardiol, 2018, 20(3): 136-142.
- [15] Liu X C, Zheng L, Liu M, et al. Protective effects of rutin on lipopolysaccharide-induced heart injury in mice [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(5): 329-337.

[责任编辑 兰新新]