

鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究

肖云芝^{1,2}, 于超¹, 刘朝勇^{1,2}, 万露¹, 徐平华¹, 韩晋^{1*}, 袁海龙^{1*}

1. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 研究不同产地鳖甲药材的 HPLC 指纹图谱与其抗纤维化作用的谱效关系, 揭示鳖甲药材抗肝纤维化作用的“药效成分组”。**方法** HPLC-DAD 法测定了 12 个产地鳖甲药材样品, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A 进行评价, 建立了共有模式, 并进行主成分分析 (PCA)。以 LX-2 肝星状细胞为模型研究其对肝细胞的抑制效果, 采用 SPSS 软件对数据进行相关分析, 研究谱效相关性。**结果** 12 个产地鳖甲药材 HPLC 指纹图谱中共有 7 个特征共有峰, 其中峰 2、5 与 LX-2 肝星状细胞抑制效果 (*A* 值) 的相关性呈现中等程度相关, 峰 4 的相关性最强。由 PCA 可知, 峰 4 的量对鳖甲质量有着重要的影响。**结论** 12 个产地鳖甲药材对 LX-2 肝星状细胞均有抑制作用, HPLC 指纹图谱与其抗纤维化作用之间有一定的相关性, 为进一步控制鳖甲药材内在质量提供参考。

关键词: 鳖甲; 指纹图谱; 抗肝纤维化作用; 主成分分析; 谱效关系; LX-2 肝星状细胞

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)17-2506-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.015

Spectrum-activity relationship on anti-hepatic fibrosis efficacy of *Trionycis Carapax*

XIAO Yun-zhi^{1,2}, YU Chao¹, LIU Chao-yong^{1,2}, WAN Lu¹, XU Ping-hua¹, HAN Jin¹, YUAN Hai-long¹

1. 302 Military Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the spectrum-activity relationship between HPLC of *Trionycis Carapax* from different regions and its anti-hepatic fibrosis efficacy, in order to reveal the “active component group” for anti-hepatic fibrosis efficacy of *Trionycis Carapax*. **Methods** The samples from 12 regions were determined with the HPLC-DAD method. The representative standard fingerprint was calculated using the *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (Version 2004A). The common pattern and the principal component analysis (PCA) were established. Using the LX-2 hepatic stellate cell as a hepatic fibrosis model of *Trionycis Carapax* to study its inhibition on the hepatic fibrosis cells. The spectrum-effect relationship was studied by SPSS 19.0 software. **Results** Seven common peaks in the HPLC-fingerprint of *Trionycis Carapax* were obtained. It was tentatively concluded that peaks 2 and 5 related better to the inhibitory effect of LX-2 cells (OD value) in the seven characteristic peaks. Peak 4 had the strongest correlation. And the quality of *Trionycis Carapax* was influenced by the concentration of peak 4 obtained by PCA. **Conclusion** All the samples could inhibit the proliferation of LX-2 hepatic stellate cell in some extent. There may be a certain relationship between HPLC fingerprint and anti-hepatic fibrosis efficacy. In addition, the research could be used as the quality control method of *Trionycis Carapax*.

Key words: *Trionycis Carapax*; fingerprint; anti-hepatic fibrosis efficacy; principal component analysis; spectrum-activity relationship; LX-2 hepatic stellate cell

鳖甲 *Trionycis Carapax* 为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲^[1], 具有滋阴潜阳、退热除蒸、软坚散结的功效。相关药理研究表明, 鳖甲

提取物能促进早期或者晚期肝硬化肝细胞恢复及纤维组织重吸收^[2-3]。

中药的“多成分、多靶点、多渠道”特点表明

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 国家新药创制重大专项 (2011ZX09201-201-14); 国家自然科学基金资助项目 (81073069)

作者简介: 肖云芝, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: (010)66933367 E-mail: destiny7@163.com

*通信作者 袁海龙, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统。Tel: (010)66933367 E-mail: yhlpharm@126.com

韩晋, 女, 主任药师, 博士生导师, 研究方向为中药剂型与工程技术研究。Tel: (010)66933225 E-mail: hanjin302emba@163.com

中药药效是多个有效成分的协同作用。中药指纹图谱能够标示中药中的多种化学成分,但其反映的化学信息可能并不包含中药的有效成分,与中药疗效的相关性不强。因此,将指纹图谱与中药药效评价相结合,通过指纹图谱与其药效作用的相关性研究,不仅能使指纹图谱中化学成分体现相应的药效,也能阐明指纹图谱特征与药效的关系,确定相应的药效物质基础,从而运用构建的药效指纹图谱更有针对性地控制中药质量^[4-7]。

本研究测定了12个产地鳖甲药材的HPLC指纹图谱及其抗纤维化作用,利用SPSS 19.0软件进行分析,建立了鳖甲药材的谱效关系,为鳖甲药材的控制建立有效的方法,同时为鳖甲药材的临床应用提供基础。

1 仪器与材料

BSA—124S型精密电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;LC—20AT型岛津高效液相色谱仪,含在线脱气机,四元梯度泵,自动进样器,DAD检测器,日本岛津公司;MYB型电子调温电热套,天津市中环实验电炉有限公司;RE52型旋转蒸发器,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。

所购买鳖甲药材经解放军三〇二医院袁海龙研究员鉴定为鳖科鳖属动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲,产地见表1。LX-2肝星状细胞,北京协和细胞资源中心;尿苷(批号YY10961)、鸟苷(批号YY10964),上海源叶生物科技有限公司。色谱甲醇,重蒸水,其余试剂均为分析纯。

表1 不同产地鳖甲药材样品来源

Table 1 *Trionyx Carapax* samples from different regions

编号	采集地点	编号	采集地点	编号	采集地点
S1	江西九江	S5	浙江嘉兴	S9	湖北黄陂
S2	安徽安庆	S6	浙江吴兴	S10	湖北监利
S3	安徽芜湖	S7	河南商城	S11	湖南常德
S4	浙江金华	S8	湖北孝感	S12	湖南邵阳

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定鳖甲药材指纹图谱方法建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Arcus EP C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为水-甲醇, 梯度洗脱程序: 0~35 min, 88%水; 35~45 min, 88%~80%水; 45~70 min, 80%水; 体积流量为 0.8

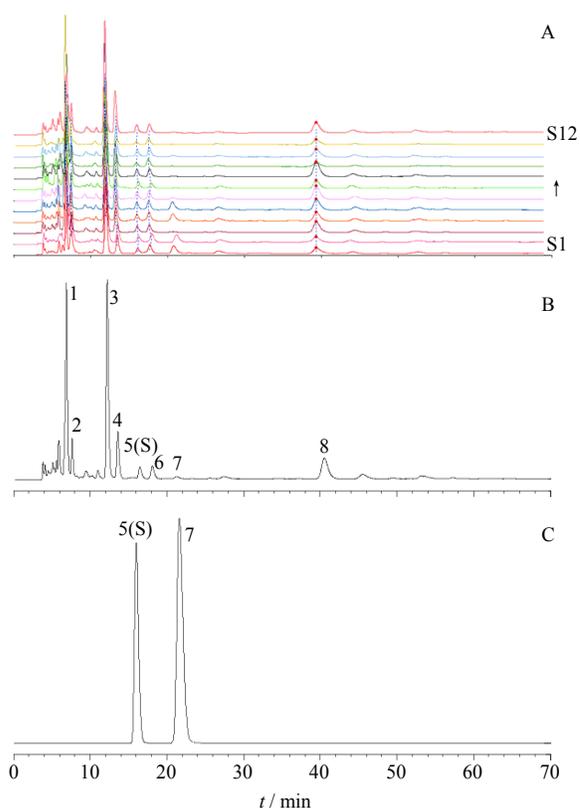
mL/min; 室温, 检测波长为 254 nm, 进样量为 20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 分别精密称取尿苷、鸟苷对照品适量置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇配制成含尿苷 36.68 μg/mL、鸟苷 27.2 μg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液制备 将 12 批鳖甲药材于 40 °C 干燥 30 min, 经粉碎后, 分别过 80 目筛, 精密称取约 5.0 g, 加 75%乙醇 50 mL, 回流提取 1.5 h, 滤过, 残渣加 75%乙醇 50 mL 继续回流 1.5 h, 合并 2 次滤液, 减压浓缩至约 20 mL, 加水至 80%, 冷处放置 24 h, 滤除沉淀, 滤液经减压浓缩至 25 mL, 取续滤液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。部分冷冻干燥, 供抗肝纤维化实验。

2.1.4 鳖甲药材指纹图谱的建立 采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004A 版, 对各产地 12 批鳖甲药材供试品 HPLC 图谱进行处理, 生成对照指纹图谱, 见图 1。

2.1.5 共有峰的标定 采用相对保留时间标定共有



A-12 批样品 B-共有指纹图谱 C-混合对照品 5(S)-尿苷 7-鸟苷
A-12 batches of samples B-common fingerprint C-mixed reference substances 5(S)-uridine 7-guanosine

图1 不同产地鳖甲药材的HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Trionyx Carapax* samples from different regions

指纹峰, 结果 12 批鳖甲标定了 7 个共有峰, 占总峰面积的 73.4%。经混合对照品的 HPLC 图定位, 鉴定出 2 个色谱峰, 5、7 号峰分别为尿苷、鸟苷, 见图 1。

2.1.6 鳖甲药材指纹图谱主成分分析(PCA) PCA 是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组新的相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法, 也是数学上处理降维的一种方法^[8]。本实验

运用 SPSS 19.0 统计分析软件进行 PCA, 得到主成分方差以及初始因子载荷矩阵, 结果见表 2、3。由主成分的贡献率可知, 主成分 1 的贡献率最大为 36.744%, 主成分 2 和 3 贡献率其次分别为 25.299%、21.169%, 其他成分的贡献率较小, 系统自动提取了前 3 个特征根大于 1 的主成分, 其累积方差贡献率达到 83.212%, 可用这 3 个主成分新变量代替原有的 7 个变量。

表 2 鳖甲主成分分析贡献率及累积贡献率

Table 2 Contribution rate and cumulative contribution rate of PCA in *Trionycis Carapax*

主成分	初始特征值			提取特征值		
	特征根	方差贡献率 / %	累积方差贡献率 / %	特征根	方差贡献率 / %	累积方差贡献率 / %
1	2.572	36.744	36.744	2.572	36.744	36.744
2	1.771	25.299	62.043	1.771	25.299	62.043
3	1.482	21.169	83.212	1.482	21.169	83.212

表 3 初始因子载荷矩阵

Table 3 Matrix of initial factors

峰位	主成分			峰位	主成分		
	1	2	3		1	2	3
1	0.569	0.341	0.640	4	0.839	-0.360	0.011
2	0.405	0.822	-0.110	6	0.356	-0.560	-0.603
3	0.328	-0.410	0.737	8	0.596	0.554	-0.359

初始因子载荷矩阵中, 每 1 个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数, 将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到 3 个主成分中每个指标所对应的系数, 经计算得主成分模型: $F_1=0.355 X_1+0.253 X_2+0.205 X_3+0.523 X_4+0.222 X_6+0.372 X_8$; $F_2=0.256 X_1+0.618 X_2-0.308 X_3-0.271 X_4-0.421 X_6+0.416 X_8$; $F_3=0.526 X_1-0.009 X_2+0.605 X_3+0.009 X_4-0.496 X_6-0.295 X_8$, 其中 F_1 、 F_2 、 F_3 表示 3 个主成分, X_1 、 X_2 、 X_3 …… X_8 表示各个色谱峰(峰 1、2、3……8)相对于参照峰(峰 5)的相对峰面积。在 3 个主成分中, F_1 是特征值最大的, “信息量最全面”的指标, 而第 1 主成分中 X_4 的系数最大, 表明峰 4 的量在鳖甲药材的质量控制中有相对重要的作用, 本实验室将进一步分析峰 4 为何种化合物, 为鳖甲的质量控制提供科学依据。

2.2 抗肝纤维化作用研究

2.2.1 样品添加量考察 复苏后的 LX-2 肝星状细胞均匀接种于 DMEM 培养液中(含 20%胎牛血清、 1×10^4 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 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 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, 接种于 96 孔培养板培养 24 h(每孔 200 μL)^[9], 细胞单层铺满孔底后, 随机分成 8 组(5%、15%、25%、35%生理盐水空白对照组及 5%、15%、25%、35%鳖甲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, 鳖甲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, 每孔体积为 200 μL, 作用 48 h, 吸除 96 孔板的上清液, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h, 加入 DMSO 200 μL, 振荡 10 min 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度(A₄₉₀)值。结果见表 4。可知, LX-2 肝星状细胞增殖受生理盐水浓度的影响不大, 鳖甲提取液组 4 种浓度对 LX-2 肝星状细胞增殖有抑制作用, 采用单因素方差分析, 与空白对照组比较有显著性差异(P<0.01)。35%的鳖甲药材提取液的抑制效果最好。

2.2.2 鳖甲药材提取液对细胞抑制作用^[9] 将复苏后的 LX-2 肝星状细胞均匀接种于 96 孔板, 操作同“2.2.1”项, 调整细胞浓度后, 接种于 96 孔(每孔 200 μL)培养板培养 24 h, 加入 35%鳖甲药材提取液, 每组设 6 个平行孔, 作用 48 h, 吸除 96 孔板的上清液, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μL, 继续孵育 4 h, 加入 DMSO 200 μL, 振荡 10 min 后, 使结晶物充分溶解。在 490 nm 波长下, 用酶联免

表 4 不同浓度的提取液对 LX-2 细胞增殖作用的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison on effect of extract solution at different concentration on LX-2 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A_{490}			
	5%	15%	25%	35%
空白对照	1.803 4±0.007 1	1.789 0±0.011 2	1.776 2±0.007 5	1.775 5±0.007 3
提取液	1.328 8±0.012 3**	1.300 7±0.007 8**	1.269 4±0.010 6**	1.153 6±0.049 3**

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank control group

疫检测仪测定各孔 A_{490} 值。结果见表 5。

2.2.3 鳖甲药材谱效关系分析 12 个产地鳖甲药材指纹图谱以 5 号峰(尿苷)为参照峰,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,计算各供试品溶液的 A_{490} 值与空白对照组的差值 R ,采用 SPSS 19.0 软件进行相关性分析,计算各特征共有峰与 12 个样品对 LX-2 肝星状细胞增殖作用的 pearson 相关系数,结果见表 6。其中样品 S7(河南商城)的抑制效果最好,7 个特征峰中峰 3 与 LX-2 细胞抑制效果(A_{490} 值)呈正相关,其余各峰呈负相关,峰 2、5 相关性较高,呈中等程度相关;峰 4 相关性最强。

表 5 各产地鳖甲药材提取液对 LX-2 细胞增殖的抑制作用

Table 5 Inhibition of *Trionycis Carapax* samples from different regions on LX-2 cell proliferation

编号	A_{490} 值	编号	A_{490} 值
空白对照	1.770 5±0.044 3	S7	0.873 4±0.009 4
S1	1.152 3±0.031 2	S8	0.983 2±0.033 9
S2	1.034 2±0.028 1	S9	1.123 4±0.007 6
S3	1.293 4±0.014 1	S10	1.222 1±0.032 2
S4	1.321 2±0.033 7	S11	1.326 3±0.022 1
S5	1.209 8±0.008 2	S12	1.472 3±0.058 2
S6	1.187 3±0.010 2		

表 6 不同产地鳖甲药材指纹图谱共有峰的相对峰面积、 R 及相关系数

Table 6 Relative peak area of common peaks, R , and correlation coefficient of *Trionycis Carapax* samples from different regions

供试品	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 8	R
S1	5.919 7	1.359 6	13.967 9	3.643 6	1	1.176 7	0.431 8	-0.431 8
S2	6.285 8	2.334 5	6.254 3	2.775 6	1	1.309 1	0.505 1	-0.505 1
S3	6.491 8	1.808 7	9.946 9	4.013 6	1	1.534 4	0.543 7	-0.543 7
S4	11.547 1	3.240 0	13.818 3	3.724 5	1	1.016 6	0.635 2	-0.635 2
S5	11.590 0	2.396 3	14.211 7	3.819 4	1	1.577 9	0.532 0	-0.532 0
S6	12.246 8	2.367 1	13.937 0	3.612 7	1	0.490 3	0.488 2	-0.488 2
S7	11.146 8	2.591 4	23.965 0	3.148 6	1	1.728 3	0.795 3	-0.795 3
S8	11.024 1	1.359 6	12.436 5	3.643 5	1	1.176 7	0.429 9	-0.429 9
S9	6.285 8	2.334 5	6.400 2	2.775 6	1	1.309 1	0.523 8	-0.523 8
S10	6.491 8	1.808 7	9.946 9	4.013 6	1	1.234 2	0.545 9	-0.545 9
S11	10.501 4	2.389 9	6.734 5	4.289 5	1	1.008 1	0.539 2	-0.539 2
S12	6.103 8	1.712 9	10.940 9	4.440 5	1	1.243 1	0.376 9	-0.376 9
相关系数	-0.088	-0.463	0.023	-0.723	-0.452	-0.152	-0.385	

3 讨论

取同一批鳖甲药材,以 50%、75%、95%乙醇溶剂制备供试品溶液,进样并检测,结果以 75%乙醇提取样品的色谱峰数较多,谱图特征性较强;同时,对提取方法(加热回流、超声、冷浸等)也进行了考察,结果以加热回流测得的色谱峰信息丰富,因此选择 75%乙醇,加热回流为最佳提取方法。

由于鳖甲是动物药,其成分复杂,大多数文献只报道其药理作用,关于鳖甲药材质量控制的研究文献极少。本研究通过梯度洗脱模式建立鳖甲药材指纹图谱,该方法图谱指纹性较强,且色谱峰大部分得到了基线分离。在本研究中,经对照品 HPLC 察了不同吸收波长图谱。结果表明,因在 254 nm 处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息较为全面,

图定位出1共有峰(尿苷),在已有的研究文献中未见报道。采用二极管阵列检测器做全波长扫描,考而且避免了溶剂末端吸收的影响,故本实验选择254 nm作为最佳扫描波长。

鳖甲具有良好的抗肝纤维化作用,但其化学成分复杂,对其HPLC图谱进行归属,并结合MTT法进行其抗肝纤维化作用的谱效关系研究。MTT比色法是一种细胞活性检测方法,广泛应用于新药筛选、细胞毒性实验、肿瘤放射敏感性实验^[9-10],具有操作简单、快速、重复性好等优点。采用双变量相关分析研究不同产地的鳖甲药材的谱效关系。结果表明,12个产地的鳖甲药材对LX-2肝星状细胞均有抑制作用,其中样品S7(河南商城)的抑制效果最好,7个特征峰中峰3与LX-2细胞抑制效果(A_{490} 值)呈正相关,其余各峰呈负相关,峰2、4、5与LX-2肝星状细胞抑制作用的相关系数较大,其中峰4的相关性最强。

同时,由鳖甲药材的主成分分析得出峰4的量在鳖甲药材的质量控制中有相对重要的作用,这个结果与谱效关系相同,因此,进一步探索峰4为何种化合物,对鳖甲的内在质量控制起到重要作用。

由本研究结果可知,鳖甲药材抗肝纤维化作用是多种成分的协同作用的结果,鳖甲药材的谱效关系能揭示中药所含化学成分与药效之间的相互关系,从而更有针对性的控制中药质量。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 唐尹萍,刘焱文,许腊英.中药鳖甲提取物抗肝纤维化的实验研究[J].湖北中医药大学学报,2011,13(2):44-46.
- [3] 王拥泽,杨宏志,林炳亮,等.加减鳖甲煎治疗肝硬化失代偿期的临床研究[J].中药材,2007,30(6):755-757.
- [4] 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.
- [5] 崔秋兵,张 艺.系统化学生物学在中药谱效关系研究中的应用展望[J].中草药,2012,43(5):833-836.
- [6] 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):171-176.
- [7] 张华锋,刘 炯,张 杰,等.基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J].中草药,2013,44(19):2696-2702.
- [8] 许 禄.化学计量学[M].北京:科学出版社,2004.
- [9] 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.
- [10] Bechmann L P, Zahn D, Gieseler R K, et al. Resveratrol amplifies profibrogenic effects of free fatty acids on human hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*, 2009, 49(6): 601-608.