

实时细胞分析结合指纹图谱技术比较不同部位雷公藤生物活性

盛安琪¹, 石楠^{2#}, 傅惠英¹, 石森林^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 杭州高级中学, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 基于实时细胞分析技术结合 HPLC 法, 比较不同部位、不同产地雷公藤的生物活性。**方法** 建立 xCELLigence 实时细胞分析系统实时动态检测细胞活性的方法: 接种密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 给药时间为 24 h 左右, 检测雷公藤对 RBL-2H3 细胞的活性; 通过 HPLC 法建立不同部位雷公藤的指纹图谱并分析其共有峰。**结果** 浙江产雷公藤同一部位活性相似; 根皮和叶具有类似生物学活性, 根和茎具有类似的活性, 根皮、嫩芽对 RBL-2H3 细胞的生物活性明显高于根、茎部位, 尤以根皮部活性最强; 指纹图谱显示不同部位成分相似但量差异较大; 氯仿提取液对 RBL-2H3 细胞的抑制率明显高于水提液。**结论** 在细胞生物学层面上雷公藤根皮及地上部分有研究与药用价值, 可对其深入开发和利用。

关键词: 雷公藤; 不同部位; 实时细胞分析; 指纹图谱; 生物活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)06-1172-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.019

Comparison of cell activity from different parts of *Tripterygium wilfordii* based on xCELLigence system

SHENG An-qi¹, SHI Nan², FU Hui-ying¹, SHI Sen-lin¹

1. Pharmacy Division of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Hangzhou High School, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** To compare the bio-activities of different parts of *Tripterygium wilfordii* from different regions based on RTCA system with HPLC. **Methods** Real-time xCELLigence analysis system was established to detect dynamically cellular activity at real-time: The seeding density was 2×10^5 cells/mL, the administration time was about 24 h, and the activity of RBL-2H3 cells from *T. wilfordii* was detected; The fingerprints of different parts of *T. wilfordii* were established by HPLC and the common peaks were analyzed. **Results** The activity of *T. wilfordii* from Zhejiang was similar at the same site; The root barks and leaves of *T. wilfordii* had similar biological activity, and the roots and stems had similar activity; The biological activity for RBL-2H3 cells in root barks and buds was significantly higher than that in roots and stems, especially in the root barks, biological activity was the strongest; The fingerprints showed that the components of different parts were similar but the contents were largely different; The inhibitory rate of chloroform extract on RBL-2H3 cells was significantly higher than that of water extract. **Conclusion** At the level of cell biology, the velamen of *T. wilfordii* and other aerial parts possess value of research and medication, which is deserved to further developed and utilized.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; different parts; RTCA; fingerprint; bio-active

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 是我国重要的有毒天然药物资源, 资源蕴藏量十分巨大。雷公藤有清热解毒、祛风通络、舒筋活血、除湿消肿止痛的作用, 大量药理及临床研究已证明其提取物和某些成分具有免疫调节、抗炎、抗肿瘤和男性抗生育作用, 其作为一种新型的免疫抑制剂受到临

床医生的青睐, 多种制剂产品广泛用于治疗肾病综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病、强直性脊柱炎、肾炎、器官移植等 50 多种疾病, 是国内首选的免疫抑制剂, 几乎没有可以完全替代的类似中药^[1-5]。

随着人们对雷公藤有效成分及相关药理作用研

收稿日期: 2016-09-29

基金项目: 浙江省重点科技创新团队项目 (2011R09042-06); 浙江省中医药管理局 (2014Z013)

作者简介: 盛安琪 (1993—), 女, 浙江金华人, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail: 1573476949@qq.com

*通信作者 石森林 (1970—), 男, 浙江金华人, 教授, 博士生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。

#并列第一作者

究的不断深入,雷公藤的临床应用也更加广泛。尽管雷公藤的药效显著,但其毒副作用不容忽视,主要表现为对肾脏、心脏、肝脏和生殖系统的损伤^[6-8],故一般选择根入药。由此而导致每年在其药材采收、加工环节产生的非药用部位等废弃组织器官高达数万吨计,造成资源利用效率低下和巨大浪费。近年来研究表明,雷公藤的根皮及茎、叶、花、果实等中含有类似的资源性成分,具有一定的潜在利用价值,值得对其进行资源化利用与开发研究^[9-12]。

生物活性(效价)测定则是一步到位直接考察药物安全性和有效性的质控方法,是现今中药质量控制模式和方法研究的新发展方向^[13]。本研究采用了一种新型的生物活性检测方法:实时细胞电子分析技术(real-time cell-based assay, RTCA)。RTCA是一种建立在阻抗基础上的瞬时细胞电感应连续记录系统,反映了细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁程度等一系列生理状态^[14-15]。本研究在前期已研究了雷公藤不同部位中6个主要单体成分的量比较^[16]和HPLC指纹图谱结合主成分分析评价不同产地雷公藤药材质量^[17]的基础上,主要将RTCA方法应用于雷公藤的细胞活性筛选,找出不同产地、不同部位样品间的细胞活性差异,并与借助高效液相色谱法得到的化学分析结果进行相关性评价,为引入新的用药部位、合理地利用雷公藤植株提供科学依据,有利于中药资源的开发利用,也为推广雷公藤临床效应奠定良好基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);KH-250DB型数控超声波清洗器(昆山乐创超声仪器有限公司);JA2003N型千分之一分析天平(上海沪粤明科学仪器有限公司);HC-400Y2黄城高速多功能粉碎机(永康市绿可食品机械有限公司);蜀牛GG-17索氏提取器(杭州汇普化工有限公司);型号DMI3000B荧光倒置显微镜(德国莱卡公司);3111型CO₂培养箱、1300Series A2生物安全柜(德国Thermo公司);Centrifuge 5430R台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);实时无标记细胞功能分析仪DP系统、E-Plate 16(杭州艾森生物有限公司,CA92121)。

1.2 试剂

100~200目柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂分厂,批号0120452);三氯甲烷(中国浙江衢州巨化

试剂有限公司,批号20120101);甲醇(成都市科龙化工试剂厂,批号2013090401);脱气纯化水(自制);乙腈、异丙醇(美国TEDIA公司);DMSO(Sigma公司,批号WXBB5403V);PBS(吉诺生物医药技术有限公司,批号21042716);DMEM高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰酶均购自美国Gibco公司,批号分别为8116161、1581745、1760553。

1.3 药材

3批雷公藤植株分别采自浙江杭州、金华、浦江,经浙江中医药大学药学院石森林鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f.,分别将这3批雷公藤植株分为根皮部、根木质部、茎、叶等部分,各自干燥,粉碎过60目筛,备用。雷公藤饮片购于浙中大中药饮片有限公司,批号131201。

1.4 细胞株

RBL-2H3(肥大细胞)购于艾森生物公司。

2 方法

2.1 xCELLigence系统实时动态检测细胞活性

2.1.1 雷公藤供试品溶液的制备 (1)雷公藤水提液:分别取各样品粉碎过60目筛,取粉末各约2g,精密称定,置10mL离心管中,加入纯化水10mL,超声30min,水浴加热1h,再次超声30min,提取液4℃、10000r/min离心10min,取上清液,-20℃保存,备用。(2)雷公藤氯仿提取物:分别取各样品粉碎过60目筛,取粉末各约2g,精密称定,滤纸包裹置于索氏提取器中,加入170mL氯仿,加热至沸,提取4h。提取液70℃下水浴挥干氯仿,-20℃保存,备用。分别取一定量的提取液(物)溶于100μL DMSO中配制成母液(保证母液配制所需最高药物浓度后DMSO的终体积分数在0.1%以下),依据课题组前期实验结果,本实验分别采用2.6mg/mL的水提液和0.33mg/mL的氯仿提取物作为实验剂量(给药前用DMEM稀释成所需质量浓度)。

2.1.2 细胞培养 培养基为含15%胎牛血清和1%青-链霉素溶液的DMEM高糖培养基,于5%CO₂、37℃恒温细胞培养箱中培养,待细胞长至80%融合时,0.25%胰酶消化,1:3进行传代。

2.1.3 接种浓度及给药时间的确定 课题组前期通过RTCA已测得不同浓度RBL-2H3细胞的生长曲线,选择接种密度为 2×10^5 /mL,且最佳给药时间为24h左右,此时细胞处于对数生长期且细胞指数(CI)为1左右。

2.1.4 RBL-2H3 细胞增殖抑制率的检测 细胞生长约 24 h 后, 分别加入不同部位的雷公藤水提液和氯仿提取物 10 μ L, 每个样品设 4 个复孔; 对照组设 4 个复孔, 每孔加 DMEM 10 μ L, 连续检测 24 h, 系统程序设置前 8 h 每 5 min 检测一次观察药物短期作用, 后 16 h 每 15 min 检测一次观察药物长期作用^[18]。

选择合适的药物作用时间, 计算不同产地及不同部位的雷公藤水提液与氯仿提取物对 RBL-2H3 的增殖抑制率 [抑制率 = (CI_{对照} - CI_{供试品}) / CI_{对照}]。

2.1.5 雷公藤对 RBL-2H3 的活性筛选主成分分析 (PCA) 对雷公藤各提取物的细胞增殖抑制率进行 PCA, 绘制各样品在二维空间的分布情况图。

2.2 雷公藤提取物 HPLC 指纹图谱测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为磷酸 (0.1%) - 三乙胺 (0.2%) 水溶液, 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱方式: 0~15 min, 10%~35% B; 15~22 min, 35% B; 22~30 min, 35%~55% B; 30~35 min, 55% B; 35~40 min, 55%~60% B; 40~70 min, 60%~85% B; 70~75 min, 85%~95% B; 75~80 min, 95%~10% B; 检测波长: 0~65 min

为 225 nm, 65 min 时切换为 210 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.75 mL/min; 进样量 20 μ L^[13]。

2.2.2 样品测定 按“2.1.1”项下制备雷公藤氯仿提取物, 以色谱级甲醇复溶, 过 0.22 μ m 滤膜, 取续滤液即得供试品溶液, 按“2.2.1 项”色谱条件进样。

2.2.3 指纹图谱的建立 采用国家药典委员会推荐的中药指纹图谱相似度计算软件 (中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版) 分别对各产地不同部位的雷公藤提取物 HPLC 图谱进行匹配分析, 并按照中位数法建立各样品的对照指纹图谱。

3 结果

3.1 不同药用部位雷公藤对 RBL-2H3 细胞活性的影响

浙江产雷公藤不同药用部位对 RBL-2H3 细胞活性的影响差异较大, 由图 1 可见, 浦江产各部位活性强弱依次为根皮、根木质部、叶、茎, 金华产各部位活性大小依次为根皮、根木质部、多年生茎、叶、一年生茎、嫩芽, 杭州产各部位活性强弱依次为根皮、嫩芽、一年生茎、多年生茎、叶、根木质部, 故除个别如浦江产茎、杭州产根木质部活性较弱外, 浙江产地雷公藤活性大小依次为根皮、嫩芽、根木质部、茎、叶。

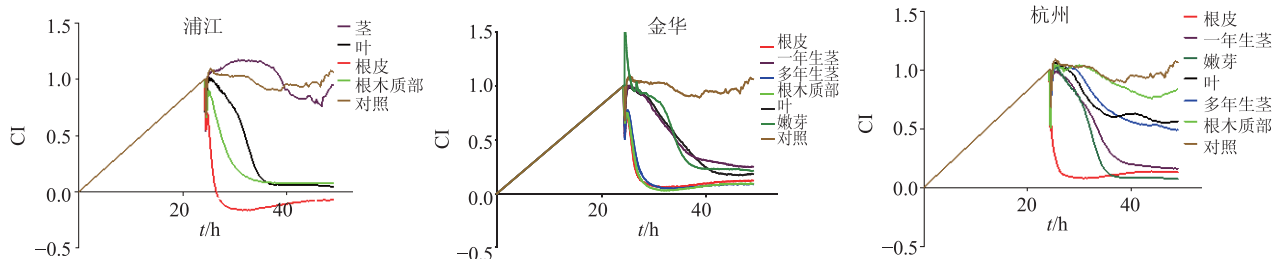


图 1 不同部位雷公藤对 RBL-2H3 细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of different parts from *T. wilfordii* on ability of RBL-2H3 cells

3.2 不同产地雷公藤对 RBL-2H3 细胞活性的影响

不同产地雷公藤根皮和根木质部的氯仿提取物对 RBL-2H3 细胞活性的影响结果见图 2 和 3, 除杭州根木质部活性较弱外, 不同产地雷公藤同一部位的细胞活性相似; 且根木质部的细胞活性强于饮片。

3.3 不同雷公藤提取物对 RBL-2H3 细胞活性的影响

2 种提取方法得到的雷公藤供试品溶液对 RBL-2H3 细胞的增殖抑制率结果见图 4, 不同提取方法对抑制率的影响较大, 氯仿提取物的抑制率普遍大于水提液。

3.4 雷公藤对 RBL-2H3 的活性筛选的 PCA

结果 (图 5) 显示, 17 个样品被明显地分为了 2 类, 除了金华产雷公藤叶 (具有较强的活性), 各

产地的雷公藤根皮和叶都能很好地聚在一起, 表示具有类似生物学活性; 除浦江产雷公藤根木质部 (具有较强的活性), 浙江产雷公藤根木质部和茎具有类似的活性; 不同产地雷公藤嫩芽 (杭州产具有较强的活性) 有较大的区别, 且金华产雷公藤嫩芽与各产地雷公藤根皮和叶具有类似的活性。

3.5 雷公藤药用部位的 HPLC 指纹图谱

按“2.2.3”项下识别, 分别获得浦江产、金华产和杭州产雷公藤不同部位 (嫩芽样品太少, 未进行指纹图谱测定) 的指纹图谱及特征峰对照图谱 (图 6), 分析出浦江产、金华产、杭州产雷公藤各部位分别具有 49、39、40 个共有峰。

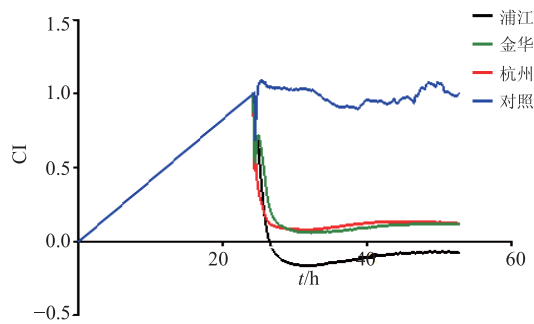


图 2 不同产地雷公藤根皮部对 RBL-2H3 细胞活性的影响
Fig. 2 Effect of velamen of *T. wilfordill* from different origins on RBL-2H3 cells activity

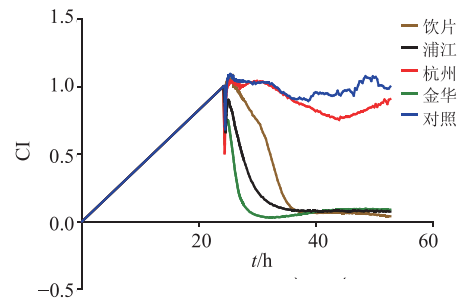


图 3 市售雷公藤饮片与浙江产雷公藤根木质部对 RBL-2H3 细胞活性的影响
Fig. 3 Effect of xylem of *T. wilfordill* from Zhejiang and slices on RBL-2H3 cells activity

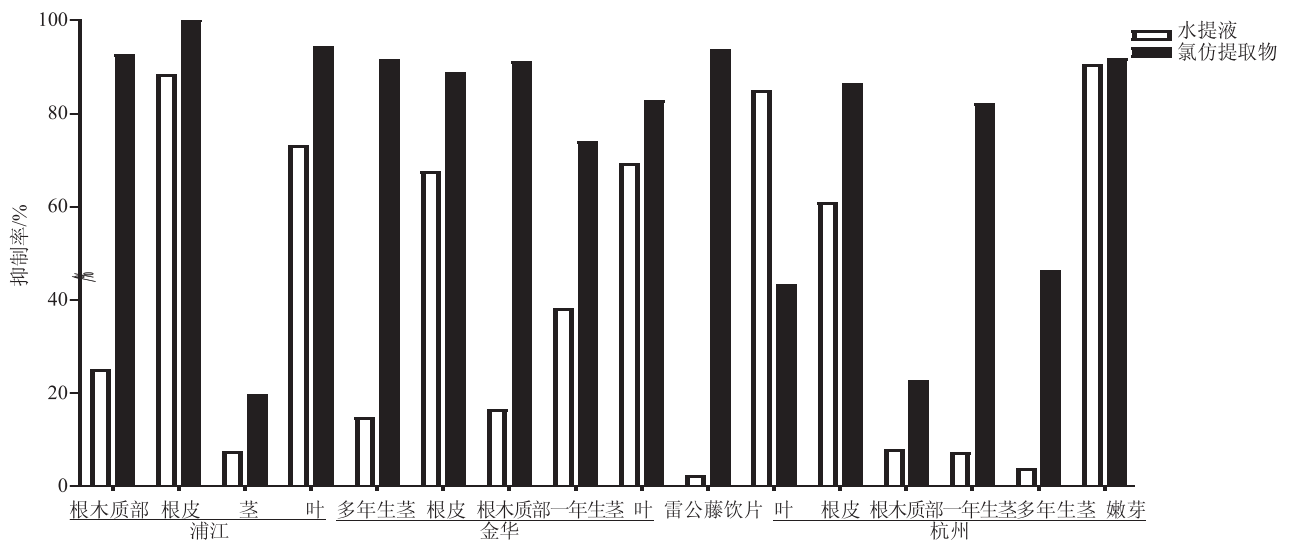


图 4 不同雷公藤提取物对 RBL-2H3 细胞活性的影响
Fig. 4 Inhibitory rates of different extractions of *T. wilfordill* on RBL-2H3 cells

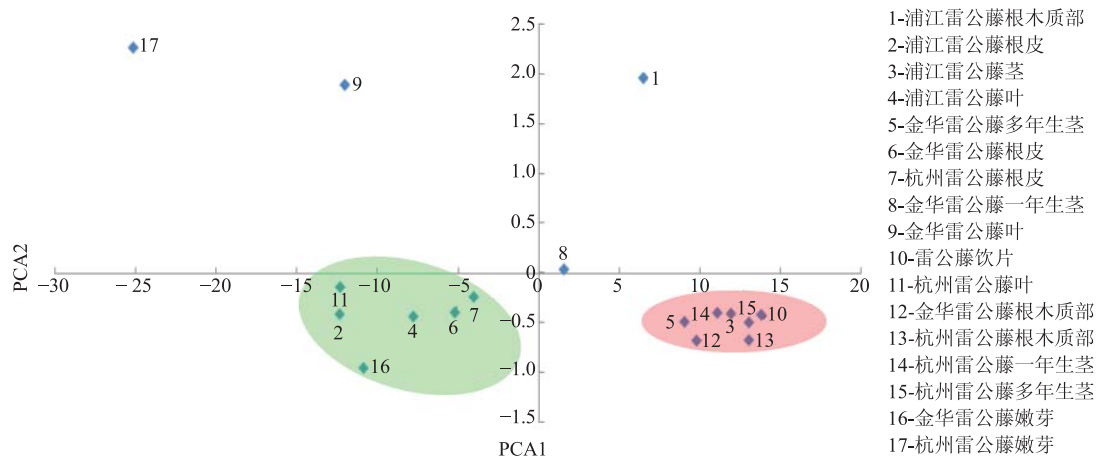


图 5 雷公藤不同部位提取液对 RBL-2H3 活性 PCA 分析
Fig. 5 PCA analysis on RBL-2H3 cell activity from different *T. wilfordill* extractions

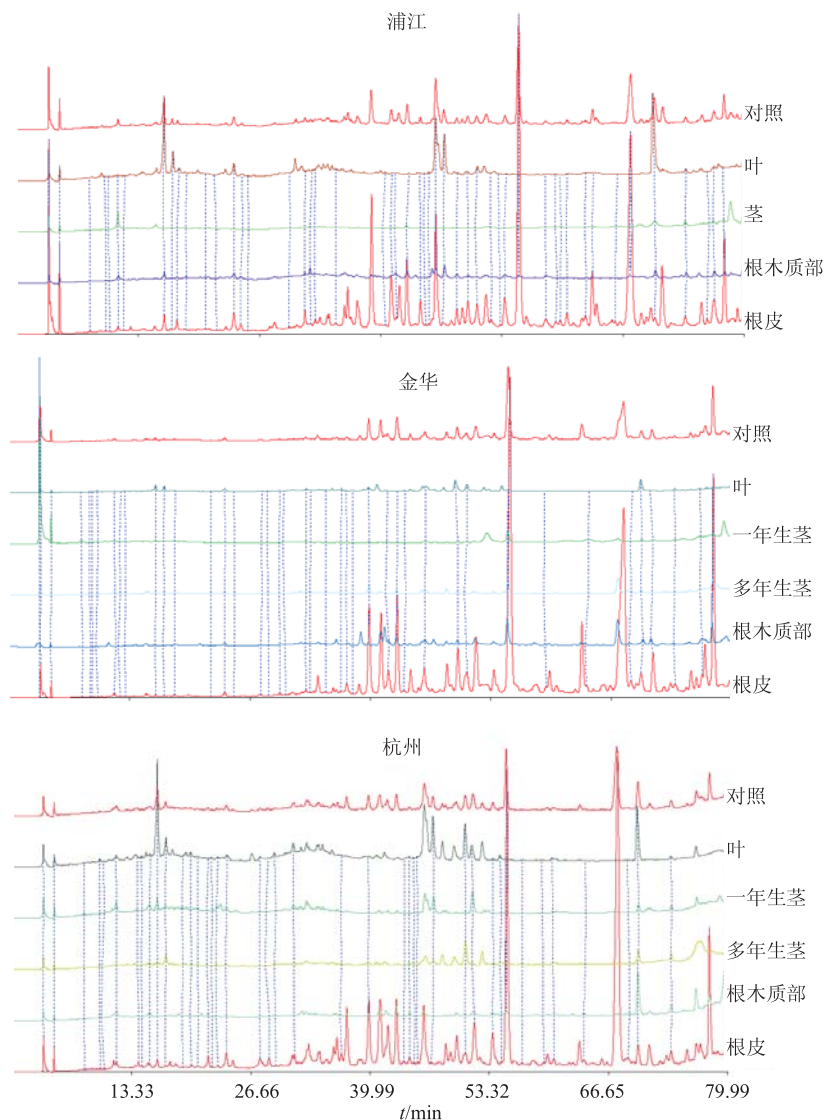


图6 浙江产雷公藤不同部位的 HPLC 叠加图

Fig. 6 HPLC overlay graphs of different parts of *T. wilfordii* from Zhejiang

4 讨论

一直以来,大多数基于细胞筛选的分析均是使用标记性追踪物来检测各种细胞的功能,比如放射性同位素、光学吸收、荧光和发光分析等传统的方法,这些方法通常需要标记的配体或酶底物或示踪分子,最大的缺点是仅给实验定格在一个最终结果,不能正确判断某一时间点没有作用是否代表真的没有作用。此外,因细胞清洗导致的分析复杂性以及标记分子生理条件的干扰通常使结果反复、不稳定,需要耗费大量人力物力进行重复实验。

RTCA 的技术核心是把微电子细胞传感芯片整合到表面适于细胞贴附与生长的细胞检测板的底部或细胞浸润迁移板的微孔膜,通过细胞的传感器阻抗为整个实验的全程包括细胞黏附、增殖、融合提供了全

程且无损伤性的细胞监控,并将信号转化为特定的参数 CI,在相同的生理条件下,CI 值与细胞数量成正比,细胞数量越多,CI 值越高。本实验应用 RTCA 并结合 HPLC 技术来筛选出对特定细胞株毒性小或活性强的雷公藤样品,既突破传统细胞检测方法的局限,实现无标记、全过程动态跟踪,还能直观地反映出中药活性成分对细胞产生的影响^[18-21]。

雷公藤现入药部位为去除二层皮的根木质部^[22],随着雷公藤临床运用的深入,药材需求不断增加,但只使用去皮根入药,将造成雷公藤毁灭性采收使用。前期课题组张少燕等^[16]采用 HPLC 法对雷公藤不同部位中 6 个单体成分的量进行比较,结果发现:雷公藤植株 4 个部位的主要成分基本一致,但各部位 6 种有效成分的量存在一定差异,其中根皮部 6

种成分的量都最高,茎部分各成分的量都较低,而根木质部生物碱、三萜类成分的量高于二萜类成分,提示用雷公藤其他部位代替根木质部入药是可能的。因雷公藤临床上多用于抗炎^[23-24],故本实验以 RBL-2H3 为模型细胞株,进一步考察浙江产雷公藤不同部位的细胞活性,结合 PCA,从结果可以看出,同一产地中根皮和嫩芽部分活性均较强,其次是根木质部,茎的细胞活性较弱;通过 HPLC 法构建指纹图谱可知雷公藤不同部位的成分相似但含量差异较大。本研究细胞活性实验和指纹图谱的结果与张少燕等^[16]的研究结果相吻合,在细胞生物学层面上再次阐明雷公藤根皮及地上部分等具有研究与药用价值,可对其深入开发和利用。

浙江产雷公藤同一部位除个别活性较弱外具有类似的生物学活性,且根木质部的生物活性强于市售雷公藤饮片,提示不同来源的雷公藤药材质量差异较大可能是目前国内市场上不同厂家生产的雷公藤制剂质量良莠不齐的主要原因。

氯仿提取得到的雷公藤样品对 RBL-2H3 细胞的抑制率普遍大于纯水提取,提示对 RBL-2H3 细胞活性较强的是生物碱、二萜等脂溶性成分。

综上,对雷公藤植株进行系统的研究,并对雷公藤植株根皮及地上部分替代根木质部入药的可行性进行论证,或将成为雷公藤药用资源保护新的研究方向。新用药部位的引入不仅能缓解雷公藤资源面临枯竭的现状,而且将会给雷公藤的治疗应用带来更为广阔的前景,也必将产生良好的市场和社会价值。此外,厂家在采购药材时需控制产地,且应该尽快建立雷公藤及其制剂的质量控制标准,对其进行监控以保证用药的有效性。

参考文献

- [1] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等.雷公藤研究新进展[J].中草药,2010,41(7):1215-1218.
- [2] 刘玉凤,潘丽,南丽红,等.雷公藤药理作用研究进展[J].亚太传统药业,2014,10(9):37-39.
- [3] 吴沁航,符士源.雷公藤甲素抗卵巢癌的研究进展[J].中草药,2016,47(6):1049-1052.
- [4] 张迪,凌雪,濮社班,等.雷公藤甲素研究进展[J].中国野生植物资源,2014,33(3):27-31.
- [5] 张明珠,李怡静,苏文晶,等.雷公藤红素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究[J].现代药物与临床,2016,31(10):1528-1534.
- [6] 肖廷超,朱必越.雷公藤片的临床应用及不良反应文献分析[J].重庆医学,2013,42(9):1007-1009.
- [7] 印成霞.55例雷公藤多甙片/雷公藤多苷片致不良反应文献分析[J].中国药物警戒,2013,10(8):478-482.
- [8] 黄郑隽,阙慧卿,朱惠,等.雷公藤甲素对生殖系统毒性的研究进展[J].药物评价研究,2013,36(3):224-227.
- [9] 孙乙铭,徐建中,王志安,等.HPLC测定不同采收年限雷公藤根及不同部位雷公藤甲素含量[J].中国现代应用药学,2009,26(11):904-906.
- [10] 张敏.不同产地雷公藤根、叶的主要活性成分研究[D].福州:福建农林大学,2012.
- [11] 陈列忠,王开金,陈建明,等.RP-HPLC法同时测定不同产地雷公藤根皮中3种生物碱的含量[J].药物分析杂志,2007,27(2):191-193.
- [12] 斯金平,阮秀春,郭宝林,等.雷公藤资源现状及可持续利用的研究[J].中药材,2005,28(1):10-11.
- [13] 肖小河,金城,赵中振,等.论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J].中国中药杂志,2007,32(14):1377-1381.
- [14] 严国俊,裴燕芳,朱贞宏,等.实时细胞电子分析技术的应用研究进展[J].中国药学杂志,2014,49(3):169-173.
- [15] 雷飞飞,王建春,张咏梅,等.实时细胞电子分析应用于复方丹参滴丸质量评价的初步研究[J].中成药,2015,37(5):1119-1123.
- [16] 张少燕,范永升,沈炜,等.雷公藤不同部位中6个单体成分的含量比较[J].中华中医药学刊,2013,31(5):1122-1125.
- [17] 张茹萍,何昱,石森林,等.HPLC指纹图谱结合主成分分析评价不同产地雷公藤药材质量[J].中国现代应用药学,2014,31(11):1338-1344.
- [18] Atienza J M, Yu N, Kirstein S L. Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system[J]. Assay Drug Dev Technol, 2006, 4(5): 597-607.
- [19] Zhu J, Wang X B, Xiao X. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays[J]. J Immunol Methods, 2006, 309(1/2): 25-33.
- [20] Atienza J M, Zhu J, Wang X B. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays[J]. J Biomol Screen, 2005, 10(8): 795-805.
- [21] Xing J Z, Jackson J A, Gabos S. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors[J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18(2): 154-161.
- [22] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999.
- [23] 李红刚,纪伟,宋亚楠,等.雷公藤治疗风湿免疫性疾病临床应用进展[J].中国中医急症,2011,20(4):616-617.
- [24] 谷颖.雷公藤在免疫性疾病治疗中的临床应用[J].中国医药指南,2011,9(28):241-242.