

• 药理与临床 •

L02 肝脂肪变性细胞膜快速筛选大黄调血脂活性成分

武晓玉^{1,2,3}, 段文达¹, 夏鹏飞^{1,2,3}, 王玉霞¹, 边惠琴¹, 赵磊^{1,2,3*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000
2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000
3. 甘肃省道地药材质量标准化研究与推广工程实验室, 甘肃 兰州 730000

摘要:目的 构建 L02 肝脂肪变性细胞膜固相色谱耦合脂肪变性模型, 并将其应用于大黄调血脂活性成分的快速筛选。方法 利用 L02 肝脂肪变性细胞膜作为固定相选择性地吸附大黄 30%乙醇提取液中的活性成分, 采用高效液相色谱(HPLC)测定吸附前后的化学成分; 根据对照品的保留时间及紫外光谱信息, 对比鉴定各亲和活性成分; 并将筛选出的活性成分进一步作用于 L02 肝脂肪变性细胞模型, 验证其调血脂作用。结果 从大黄 30%乙醇提取液中筛选出 11 种活性成分, 分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和 6 种未知成分。芦荟大黄素等蒽醌苷元能够显著降低 L02 肝脂肪变性细胞中三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)含量($P < 0.01$), 且可减少 L02 肝脂肪变性细胞中的脂肪粒。结论 建立的 L02 肝脂肪变性细胞膜固相色谱耦合脂肪变性模型可用于快速筛选中药复杂体系中的活性成分, 为进一步深入探究大黄调血脂活性成分群奠定了基础。

关键词: 大黄; L02 肝脂肪变性细胞; 细胞膜固相色谱; 活性成分; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)03-0735-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.012

Rapid screening of active components from *Rhei Radix et Rhizoma* for hypolipidemia by L02 hepatic steatosis cell membrane

WU Xiao-yu^{1,2,3}, DUAN Wen-da¹, XIA Peng-fei^{1,2,3}, WANG Yu-xia¹, BIAN Hui-qin¹, ZHAO Lei^{1,2,3}

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicine of Colleges of Gansu Province, Lanzhou 730000, China
3. Gansu Province Engineering Laboratory for Traditional Chinese Medicine Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To rapid screening the active components from Dahuang (*Rhei Radix et Rhizoma*) for hypolipidemia through L02 liver steatosis cell membrane solid phase chromatography coupled with steatosis model. **Methods** The active compounds of 30% ethanol extracts from *Rhei Radix et Rhizoma* were combined with L02 cell membrane solid phase chromatography. The solution was detected before and after treating with L02 cell membrane by HPLC. The active compounds from 30% ethanol extracts of *Rhei Radix et Rhizoma* were identified based on retention time and ultraviolet spectrum information of each chemical composition. The selected active ingredients were further applied to L02 hepatic steatosis cell model to verify the effect of hypolipidemia. **Results** A total of 11 compounds were detected from 30% ethanol extract of *Rhei Radix et Rhizoma*, and identified as aloe emodin, rhein, rheum emodin, chrysophanol, physcion and six unknown ingredients. Aloe emodin and other anthraquinone aglycones significantly reduced the contents of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in L02 hepatic steatosis cell ($P < 0.01$), and reduced the lipid granules in L02 hepatic steatosis cell. **Conclusion** The established L02 liver steatosis cell membrane solid phase chromatography coupled with

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82160457); 甘肃省教育厅: 青年博士基金项目(2021QB-079); 甘肃中医药大学引进人才科研启动基金(2018YJRC-02); 甘肃中医药大学科研发展基金项目(81660577)

作者简介: 武晓玉(1983—), 女, 副教授, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: wxypzw@163.com

*通信作者: 赵磊, 女, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及质量控制研究。Tel: (0931)8762539 E-mail: zzyhx@gszy.edu.cn

steatosis model can be used for rapid screening of active components in the complex system of traditional Chinese medicine, as well as to lay the foundation for further study of the active components in hypolipidemia of *Rhei Radix et Rhizoma*.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; L02 hepatic steatosis cells; cell membrane solid phase chromatography; active components; aloe emodin; rhein; rheum emodin; chrysophanol; physcion

大黄为甘肃道地药材,其药用历史悠久、资源丰富,为临床常用中药之一。《神农本草经》记载其“荡涤肠胃,推陈致新,通利水谷,调中化食,安和五脏”^[1];临床主要用于大便干结、湿热泄泻、湿热黄疸、热邪血热、火眼充血、咽喉肿胀、牙龈炎痛、皮感疼痛、表皮烫伤、瘀血诸证^[2]。现代药理学研究表明,大黄具有泻下、抗菌、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、调血脂等作用^[3]。目前大黄调血脂的研究旨在证明其调血脂能力^[4-6],其具体调血脂活性成分尚不明确。本课题组前期利用高血脂大鼠模型对大黄水提液、30%乙醇提取液、醋酸乙酯提取液进行筛选,通过测定血清中三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)含量,对大黄不同部位调血脂效果进行综合评价,发现大黄30%乙醇提取液是其调血脂有效部位^[7]。

细胞膜固相色谱法的原理为直接用生物靶点富集的细胞膜,选择性地结合中药提取液中的活性成分,洗去未结合成分后,再用解离液将细胞膜上的成分解离下来,利用色谱技术分离鉴定效应物质。细胞膜固相色谱具有快速、方便等优点,适用于中药复杂成分的高通量筛选^[8-13]。为深入探究大黄调血脂活性成分群,本研究利用L02肝脂肪变性细胞膜固相色谱快速筛选大黄调血脂活性成分,并将其活性成分进一步作用于L02肝脂肪变性细胞模型,以验证其调血脂效果,为探明大黄调血脂的药效物质基础提供参考。

1 材料

1.1 细胞株

人L02肝细胞购自普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药材

大黄购自甘肃陇脉药材有限公司,经甘肃中医药大学药学院林丽高级实验师鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

PBS溶液(批号AQ29629583)、青链霉素混合液(批号20201116)、胰酶(批号20210629)、RPMI 1640培养液(批号AG29643109)、胎牛血清(批号21040702)、二甲基亚砷(DMSO,批号1121E0326)、

Tris-HCl溶液(1 mol/L,批号20200821)、饱和油红O(批号20210616)、苏木素(批号21057999)、高效RIPA细胞裂解液(批号20200703)、油酸(批号SLBR187V)、Na⁺, K⁺-ATP酶活力测定试剂盒(批号20200629)、BCA蛋白定量试剂盒(批号20201022)、CCK-8试剂盒(批号PF724)购自北京索莱宝科技有限公司;TG测定试剂盒(批号20201118)、TC测定试剂盒(批号20201213)购自南京建成生物工程研究所;对照品芦荟大黄素(批号18121801)、大黄酸(批号20010901)、大黄素(批号20022605)、大黄酚(批号20011601)、大黄素甲醚(批号20110101)购自成都克洛玛生物科技有限公司,质量分数≥98%;甲醇、乙腈(色谱纯)购自德国Merck公司;超纯水由Milli-Q系统制备;其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器

Waters Allincc 高效液相色谱仪(HPLC,美国Waters公司);BSA224S型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);SW-CJ-2D型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);MCO-18AIC型CO₂细胞培养箱(日本三洋株式会社);高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);JY92-IIDN型细胞破碎仪、XB-20型雪花制冰机(宁波新芝科技股份有限公司);IMARK型多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司);AUTO X4全自动细胞荧光计数分析仪(美国Cellometer公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

L02细胞用含10%胎牛血清、1%青链霉素混合液的RPMI 1640培养基,于37℃、5%CO₂培养箱中培养。实验所用细胞代数为15~35代,均处于对数生长期。

2.2 L02肝脂肪变性细胞模型的建立^[14]

采用不同浓度油酸刺激L02细胞,建立L02肝脂肪变性细胞模型;以细胞存活率及细胞内TG、TC含量评价造模是否成功。

2.2.1 细胞存活率的测定 取对数生长期L02细胞,以1×10⁵/cm²接种于96孔板中,每孔100μL,

贴壁生长 24 h。将细胞板分为加入培养基的正常组和加入油酸 (0.25、0.50、1.00、1.50 mmol/L) 的模型组及无细胞的空白组, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 1.5 h 后终止培养, 室温置于摇床 10 min, 采用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.2.2 细胞内 TG、TC 含量的测定 取对数生长期 L02 细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔板, 每孔 1 mL, 待贴壁后分为加入培养基的正常组和加入油酸 (0.25、0.50、1.00、1.50 mmol/L) 的模型组, 培养 24 h, 吸去培养基, PBS 溶液洗涤 2 次, 加入 350 μ L 细胞裂解液, 低温下收集各组细胞, 按试剂盒说明书测定细胞内 TG 及 TC 含量。

2.3 L02 肝脂肪变性细胞膜固相色谱的制备^[15-16]

取造模后的 L02 细胞, 用 1 mL PBS 溶液洗涤 2 次, 弃去 PBS 溶液, 加入 1 mL 0.25% 胰酶消化 4 min, 轻轻吹打, 镜下观察细胞全部脱落, 加入 1 mL PBS 溶液终止消化, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、160 $\times g$ 离心 10 min, 弃去胰酶, 保留细胞沉淀。细胞沉淀加入 5 mL PBS 溶液, 轻轻吹打均匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、160 $\times g$ 离心 10 min, 洗涤 2 次。细胞在 50 mmol/L Tris-HCL 溶液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下溶胀 30 min, 在破碎功率 720 W、破碎时间 2 s、冷却间隔 2 s 的冰浴条件下, 破碎 3 min。取细胞碎片混悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 $\times g$ 离心 10 min, 保留上清液, 弃去沉淀。取上清液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心

20 min, 弃去上清液, 保留细胞膜沉淀。平行制备 3 份, 编号为 B1~B3, 按试剂盒说明书测定细胞膜蛋白含量及 Na^+ , K^+ -ATP 酶活力。

2.4 HPLC 测定方法的建立^[17]

2.4.1 色谱条件 C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.05% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~20% B; 10~15 min, 20% B; 15~30 min, 20%~30% B; 30~50 min, 30%~50% B; 50~60 min, 50%~85% B; 60~65 min, 85%~100% B; 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μL 。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用适量 DMSO 溶解, 甲醇定容至刻度, 即得对照品储备液。依次稀释成质量浓度为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00、80.00、160.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液, 0.22 μm 滤膜滤过, 备用。

2.4.3 供试品溶液的制备 称取大黄粉末 (过 4 号筛) 50 g, 加入 30% 乙醇 1 L, 加热回流提取 2 次, 减压浓缩至稠膏, 40 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。使用时, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 溶液。

2.4.4 线性关系的考察 取“2.4.2”项下的混合对照品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件测定, 以各成分质量浓度为横坐标 (x), 色谱峰峰面积为纵坐标 (y), 绘制标准曲线, 得回归方程, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship investigation

成分	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	R^2
芦荟大黄素	$y=20.540x-10.093$	1.28~164.00	0.999 8
大黄酸	$y=16.252x+15.014$	1.25~160.00	0.999 7
大黄素	$y=14.679x-17.735$	1.28~164.00	0.999 8
大黄酚	$y=18.250x-3.703$	1.28~162.00	1.000 0
大黄素甲醚	$y=7.468x+24.813$	1.41~180.00	0.999 7

2.4.5 方法学考察

(1) 精密度试验: 取供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件重复测定 6 次, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数的 RSD 值, 结果见表 2。

(2) 稳定性试验: 取供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚量分数的 RSD 值, 结果见表 2。

表 2 方法学考察结果

Table 2 Results of methodological investigation

成分	RSD/%		
	精密度	稳定性	重复性
芦荟大黄素	0.96	1.96	0.95
大黄酸	0.29	2.91	0.30
大黄素	1.36	1.36	1.28
大黄酚	2.82	2.29	2.72
大黄素甲醚	2.63	2.36	2.14

(3) 重复性试验: 精密称取大黄粉末 6 份, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件测定, 计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚量分数 RSD 值, 结果见表 2。

由表 2 可知, 方法学考察 RSD 值均小于 3%, 表明仪器的精密性良好, 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, 方法的重复性良好。

(4) 加样回收试验: 取已测定大黄粉末 9 份, 精密称定, 根据各指标成分质量分数的 80%、100%、120% 分别加入相应对照品, 按“2.4.3”项下方法制备, “2.4.1”项下色谱条件测定, 结果显示, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均回收率分别为 96.89%、97.29%、95.66%、95.94%、96.07%, RSD 值分别为 2.83%、1.39%、1.12%、2.17%、2.09%, 表明本方法的加样回收率符合规定。

2.5 L02 肝细胞膜固相相色谱对大黄活性成分吸附、解吸附

2.5.1 共孵育残液的制备 L02 肝脂肪变性细胞膜沉淀中加入 1 mL 大黄 30% 乙醇提取液, 轻轻吹打, 涡旋震荡 3 min, 置于 37 °C 恒温水浴摇床孵育 6 h。孵育结束后, 孵育液于 4 °C、12 000×g 离心 20 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得共孵育残液。

2.5.2 洗涤液的制备 L02 肝脂肪变性细胞膜沉淀中加入 1 mL 蒸馏水, 轻轻吹打混合均匀, 4 °C、12 000×g 离心 20 min, 重复洗涤 3 次, 合并上清液, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得洗涤液。

2.5.3 解离液的制备 L02 肝脂肪变性细胞膜沉淀中加入 1 mL 30% 乙醇, 轻轻吹打, 涡旋震荡 3 min, 置于 37 °C 恒温水浴摇床孵育 4 h。孵育结束后, 孵育液于 4 °C、12 000×g 离心 20 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 即得解离液。

按照相同条件重复上述操作, 制得 6 份共孵育残液、解离液。采用“2.4.1”项下色谱条件测定大黄 30% 乙醇提取液、共孵育残液、洗涤液及解离液。

2.6 大黄调血脂活性成分的体外验证

2.6.1 细胞存活率的测定 将 5、10、20 μmol/L 的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及阿托伐他汀 (0.125、0.250、0.500 μmol/L) 分别作用于 L02 肝细胞脂肪变性模型, 按“2.2.1”项下方法检测细胞存活率。

2.6.2 细胞内 TG、TC 含量的测定 将 10 μmol/L 的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及阿托伐他汀 (0.50 μmol/L) 分别作用于 L02 肝细胞脂肪变性模型, 按“2.2.2”项下方法测定细胞内 TG、TC 含量。

2.6.3 油红 O 染色 取处于对数生长期的 L02 细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔板 (已铺玻璃爬片), 每孔 1 mL, 待贴壁后分为正常组、模型组和芦荟大黄素组, 正常组加入培养基, 模型组和芦荟大黄素组加入 0.50 mmol/L 油酸, 芦荟大黄素组再加入 10 μmol/L 芦荟大黄素, 培养 24 h, 吸去培养基, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 固定 15 min, 加入 1 mL 油红 O 工作液, 室温避光、密封染色 30 min, 吸出染液, 用 10% 异丙醇冲洗, 每次 3~5 s, 吸出洗液, 加苏木素染液复染 1 min (用于染细胞核), 纯水洗去蓝色染液, 甘油明胶封片。于光镜下观察细胞内橘红色脂滴情况。

3 结果

3.1 L02 肝脂肪变性细胞模型的建立

油酸刺激 L02 肝细胞建立脂肪变性模型, 本方法较为简便、快速, 常用于脂代谢研究; 其原理为饥饿状态的肝细胞对油酸摄入增加, 使细胞代谢发生障碍, 肝细胞中的脂肪粒沉积加重及 TG、TC 含量增加。如图 1-A 所示, 与正常组相比, 当油酸浓度由 0.25、0.50、1.00、1.50 mmol/L 逐渐增加, 细胞存活率逐渐下降, 表明高浓度油酸对细胞有一定毒性; 当油酸浓度为 0.25、0.50 mmol/L 时, 细胞存活率大于 85%。如图 1-B 所示, 与正常组比较, 模

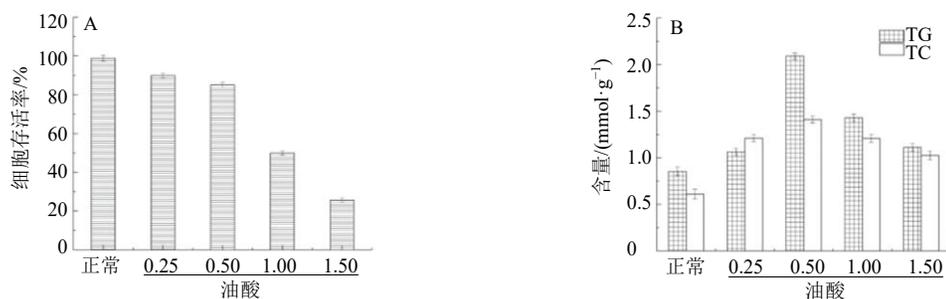


图 1 细胞存活率 (A) 及 TG、TC 含量 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Survival rate (A) of cells and contents of TG and TC (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

型组细胞内 TG、TC 含量上升,表明肝脂肪变性细胞模型造模成功;当油酸浓度由 0.25、0.50、1.00、1.50 mmol/L 逐渐增加,细胞中 TG、TC 含量先增加后减少;TG、TC 含量减少原因在于:油酸浓度为 1.00、1.50 mmol/L 时,造成一定数量细胞死亡,所以其 TG、TC 含量下降。结合细胞存活率和 TG、TC 含量,选择 0.5 mmol/L 油酸为最佳造模浓度。

3.2 L02 肝脂肪变性细胞膜固相相色谱评价

对 L02 肝脂肪变性细胞膜进行膜蛋白含量和 Na⁺,K⁺-ATP 酶活性测定,结果见表 3。L02 肝脂肪变性细胞膜蛋白质质量浓度为 0.602 2 mg/mL,Na⁺,K⁺-ATP 酶活力为 11.38 U/mg,表明 L02 肝脂肪变性细胞膜沉淀具有活力。

表 3 细胞膜蛋白含量和 Na⁺,K⁺-ATP 酶活力

Table 3 Membrane protein content of cells and Na⁺, K⁺-ATPase activity

编号	细胞膜蛋白/(mg·mL ⁻¹)	Na ⁺ ,K ⁺ -ATP 酶/(U·mg ⁻¹)
B1	0.598 8	11.76
B2	0.602 8	11.03
B3	0.607 5	11.35
平均值	0.602 2	11.38

3.3 HPLC 吸附分析

大黄 30%乙醇提取液、共孵育残液、混合对照品溶液、洗涤液、解离液色谱图见图 2。

由图 2-A 可知,优化色谱条件下,多数成分色谱峰分离度良好,能够较全面地反映相关化学成分信息;对比大黄 30%乙醇提取液和共孵育残液色谱峰的峰面积,部分共孵育残液色谱峰峰面积显著减小,表明部分化学成分被 L02 肝脂肪变性细胞膜吸

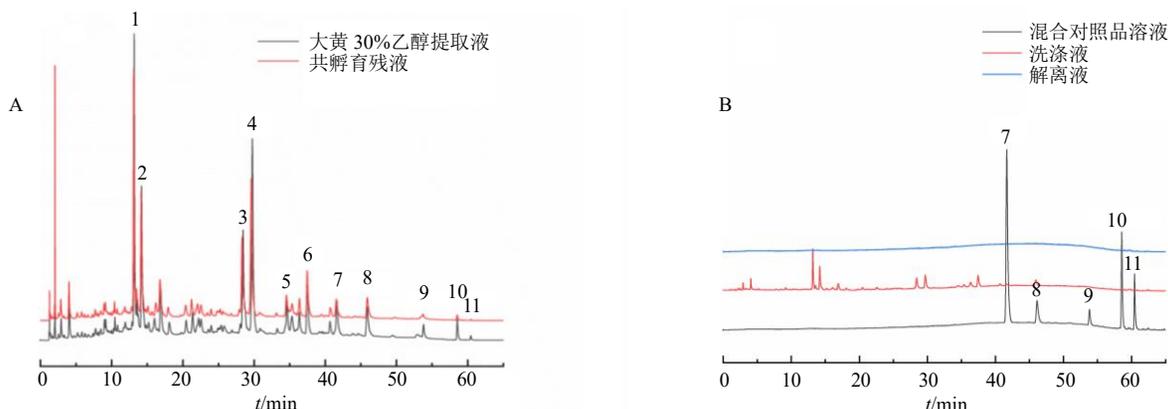
附。由图 2-B 可知,通过混合对照品溶液保留时间(t_R)及紫外光谱图对比,初步确定 7~11 号色谱峰分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚,1~6 号色谱峰为未知成分。洗涤液中所含化学成分较少,表明活性成分与细胞膜结合牢固,不易洗涤下来。解离液中未检测到色谱峰,推测活性成分通过特定的靶点进入细胞膜内部发挥调血脂作用。

将 6 份大黄 30%乙醇提取液、共孵育残液进样分析,对比其色谱峰峰面积变化,计算色谱峰峰面积 RSD 值,结果见表 4、5。6 份大黄 30%乙醇提取液、共孵育残液色谱峰峰面积 RSD 均小于 1%,表明在优化色谱条件下,该测定方法稳定可靠。

以大黄 30%乙醇提取液和共孵育残液色谱峰峰面积差值大于 15%为依据,筛选 L02 肝脂肪变性细胞膜固相相色谱特异性吸附成分,结果见表 6。大黄 30%乙醇提取液中共有 11 种成分色谱峰峰面积的变化率大于 15%;但由于对照品有限,仅初步确认 7~11 号色谱峰为蒽醌苷元;5 种蒽醌苷元峰面积变化率大于 32%,提示其与 L02 肝脂肪变性细胞膜上的靶点有较好的结合能力。

3.4 大黄调血脂活性体外验证

5 种大黄蒽醌苷元作用于 L02 肝脂肪变性细胞模型,其细胞存活率结果见表 7。5 种蒽醌苷元浓度大于 10 μmol/L 时,细胞存活率小于 85%,提示蒽醌苷元(20 μmol/L)对细胞具有一定的毒性作用,故选择 10 μmol/L 蒽醌苷元进行后续调血脂作用的验证。



A-大黄 30%乙醇提取液和共孵育残液色谱图 B-混合对照品溶液、洗涤液和解离液色谱图 1~6-未知成分 7-芦荟大黄素 8-大黄酸 9-大黄素 10-大黄酚 11-大黄素甲醚

A-chromatograms of 30% ethanol extract of *Rhei Radix et Rhizoma* and co-incubation residues B-chromatograms of mixed reference solution, washing solution and dissociation solution 1~6-unknown composition 7-aloe emodin 8-rhein 9-emodin 10-chrysophanol 11-phycion

图 2 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms

表4 大黄30%乙醇提取液色谱峰峰面积变化 (n=6)

Table 4 Peak area change of 30% ethanol extract of *Rhei Radix et Rhizoma* (n=6)

峰号	t_R /min	峰面积						RSD/%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	
1	13.12	5 018 844	5 067 762	5 081 823	5 089 821	5 095 390	5 054 829	0.56
2	14.24	3 825 355	3 864 790	3 824 673	3 833 583	3 881 616	3 840 646	0.60
3	28.37	3 367 105	3 393 122	3 378 389	3 392 597	3 381 576	3 337 687	0.61
4	29.67	5 979 125	6 031 896	5 985 289	6 017 712	6 055 688	6 080 567	0.65
5	34.58	765 629	755 313	767 195	752 116	754 214	766 899	0.93
6	37.63	1 673 715	1 672 681	1 695 763	1 665 997	1 662 208	1 699 216	0.93
7	41.61	1 216 340	1 215 002	1 215 936	1 218 844	1 203 949	1 219 226	0.46
8	46.09	1 210 198	1 216 873	1 227 301	1 208 488	1 220 331	1 215 572	0.57
9	53.79	401 388	407 512	409 669	405 375	402 895	405 214	0.74
10	58.55	435 529	441 594	439 307	446 090	443 376	440 855	0.82
11	60.44	83 010	82 301	81 184	82 368	81 876	81 383	0.83

表5 共孵育残液色谱峰峰面积变化 (n=6)

Table 5 Peak area change of co-incubation residual solution (n=6)

峰号	t_R /min	峰面积						RSD/%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	
1	13.12	4 061 579	4 057 875	4 046 655	4 034 559	4 030 368	4 053 983	0.31
2	14.24	3 073 862	3 070 570	3 062 334	3 057 776	3 049 213	3 075 400	0.33
3	28.37	2 506 705	2 491 193	2 492 275	2 479 534	2 471 941	2 467 956	0.58
4	29.67	4 219 615	4 206 113	4 202 261	4 196 519	4 180 755	4 175 849	0.39
5	34.58	558 850	557 234	555 456	552 487	552 043	550 537	0.59
6	37.63	1 377 257	1 373 935	1 369 221	1 363 651	1 359 657	1 356 785	0.59
7	41.61	548 516	546 598	544 134	544 273	540 734	540 656	0.57
8	46.09	838 137	833 508	830 540	829 140	823 955	825 380	0.63
9	53.79	78 019	78 394	77 932	78 935	78 300	78 041	0.47
10	58.55	114 621	114 865	114 499	116 250	115 118	114 680	0.56
11	60.44	10 719	10 856	10 837	10 784	10 795	10 600	0.87

表6 L02肝脂肪变性细胞膜固相吸附差异结果

Table 6 Results of adsorption difference of L02 hepatic steatosis membrane solid phase chromatography

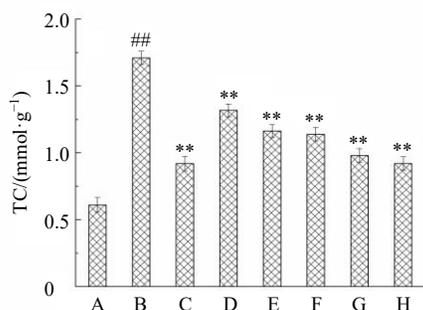
峰号	t_R /min	30%乙醇提取液色谱峰峰面积	共孵育残液色谱峰峰面积	峰面积变化/%	成分
1	13.12	5 081 823	4 057 875	20.15	未知
2	14.24	3 824 673	3 070 570	19.72	未知
3	28.37	3 378 389	2 491 193	26.26	未知
4	29.67	5 985 289	4 206 113	29.73	未知
5	34.58	767 195	557 234	27.37	未知
6	37.63	1 695 763	1 373 935	18.98	未知
7	41.61	1 215 936	546 598	55.05	芦荟大黄素
8	46.09	1 227 301	833 508	32.09	大黄酸
9	53.79	409 669	78 394	80.86	大黄素
10	58.55	439 307	114 865	73.85	大黄酚
11	60.44	81 184	10 856	86.63	大黄素甲醚

表7 大黄蒽醌苷元对L02肝脂肪变性细胞存活率的影响 (n=6)

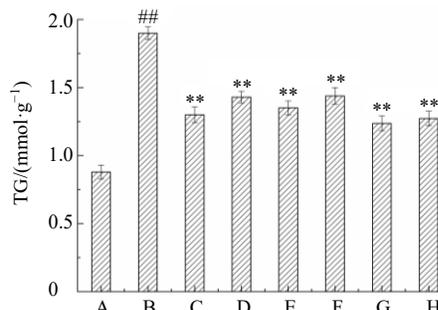
Table 7 Effect of anthraquinone aglycone on survival rate of L02 hepatic steatosis cells (n=6)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%
芦荟大黄素	5	90.2	大黄酚	5	91.5
	10	88.7		10	89.3
	20	81.5		20	81.0
大黄酸	5	93.1	大黄素甲醚	5	91.8
	10	88.6		10	88.6
	20	79.3		20	80.4
大黄素	5	95.4	阿托伐他汀	0.125	92.5
	10	87.8		0.250	90.7
	20	75.6		0.500	90.1

将5种蒽醌苷元(10 μmol/L)和阿托伐他汀(0.5 μmol/L)作用于L02肝脂肪变性细胞模型, TG、TC含量测定结果见图3。与正常组比较, 模型组细胞内TG、TC含量显著升高($P < 0.01$), 表明油酸诱导造模成功; 与模型组比较, 各给药组细胞内TG、TC含量均显著降低($P < 0.01$), 表明5种蒽醌苷元可以通过降低TG、TC含量而达到调血脂作用, 其中大黄素甲醚下调TG效果最强, 而芦荟大黄素下调TC效果最强。



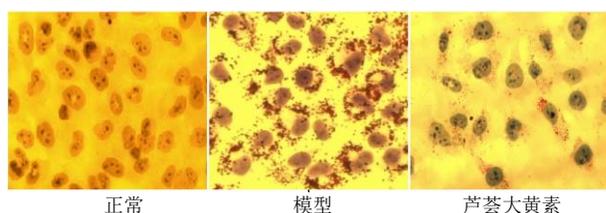
油红O/苏木素染色L02肝脂肪变性细胞, 细胞内脂肪滴情况见图4。油红O染色后, 正常组细胞中蓝色为细胞核, 细胞核周围无红色脂肪粒。模型组细胞形态不规则, 细胞出现肿胀变大, 部分细胞膜不完整和破损; 细胞核周围有大量红色脂肪粒。芦荟大黄素作用于L02细胞肝脂肪变性模型, 细胞核周围的脂肪粒明显减少, 细胞形态有所改善, 表明蒽醌苷元通过清除肝细胞脂质堆积, 改善肝脏内脂质代谢, 并保护肝细胞功能达到调血脂作用。



A-正常组 B-模型组 C-芦荟大黄素组 D-大黄酸组 E-大黄素组 F-大黄酚组 G-大黄素甲醚组 H-阿托伐他汀组 与正常组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$
 A-normal group B-model group C-aloe-emodin group D-rhein group E-emodin group F-chrysophanol group G-physcion group H-atorvastatin group $^{##}P < 0.01$ vs normal group; $^{**}P < 0.01$ vs model group

图3 大黄蒽醌苷元对L02肝脂肪变性细胞TC、TG含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of anthraquinone aglycone on contents of TC and TG in L02 hepatic steatosis cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



正常 模型 芦荟大黄素

图4 油红O染色图片(×400)

Fig. 4 Pictures of Oil red O dyeing (×400)

4 讨论

本研究构建L02肝脂肪变性细胞膜固相色谱耦合脂肪变性模型, 利用L02肝脂肪变性细胞膜表面靶点选择性吸附大黄调血脂活性成分, 以吸附前后化学成分色谱峰面积变化率大于15%为依据, 从大黄30%乙醇提取液中筛选出11种活性成分; 将5种大黄蒽醌苷元作用于L02肝脂肪变性细胞模型, 发现芦荟大黄素等蒽醌苷元能够显著降低L02肝脂肪变性细胞中TG、TC含量, 并可显著减少细胞核周围的脂肪粒。本模型具有快速、方便的优势, 可用于大黄调血脂活性成分的快速筛选, 也可适用于其他中药调血脂活性成分的快速筛选及活性成分群关系的研究。

本方法将活性细胞膜作为固定相, 具有细胞膜完整、膜受体立体结构、周围环境和靶点得以保持的优势, 能够排除大量非作用杂质成分的干扰, 是中药效应成分的有效筛选手段; 但同时也存在细胞膜吸附1~2次后, 细胞膜活性显著降低, 使用寿命短及吸附成分不一定是入血成分等缺陷。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [2] 张桥, 陈艳琰, 乐世俊, 等. 大黄炮制的历史沿革及对化学成分、传统药理作用影响的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 539-551.
- [3] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.
- [4] 王志旺, 郭玫, 马丹, 等. 不同产地大黄对高脂血症大鼠血脂及抗氧化作用的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(3): 278-281.
- [5] 王成, 代旭阳, 龚莉虹, 等. 大黄素对高脂血症斑马鱼脂质代谢的作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019,

- 31(11): 1873-1879.
- [6] 朱慧, 刘晓, 祝婷婷, 等. 熟大黄水煎液中化学成分含量测定及其药效学研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5): 470-475.
- [7] 顾家琿. 大黄治疗便秘、降血脂的有效物质研究 [D]. 兰州: 甘肃中医学院, 2013.
- [8] 朱荃. 细胞膜固相色谱及其在中药效应-物质基础研究中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(1): 8-10.
- [9] 王晓宇, 陈啸飞, 顾妍秋, 等. 细胞膜色谱研究进展及其在中药活性成分筛选中的应用 [J]. 分析化学, 2018, 46(11): 1695-1702.
- [10] 毕肖林, 马世堂, 狄留庆, 等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5229-5234.
- [11] 焦姣姣, 杨园珍, 袁恩, 等. UPLC-Q-TOF-MS 筛选穿心莲中亲和 Caco-2 细胞的活性成分 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2946-2952.
- [12] 汤丹, 肖伟, 钱正明, 等. 活细胞固相色谱法联合高分辨质谱快速筛选龙血竭中镇痛活性成分 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2539-2544.
- [13] 王成, 胡乃华, 余琳媛, 等. 降脂模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 121-130.
- [14] 吴灿, 许平翠, 姚伟宣, 等. 成骨细胞膜色谱/超高效液相色谱-飞行时间质谱法快速筛选六味地黄汤抗骨质疏松活性成分 [J]. 色谱, 2019, 37(3): 305-312.
- [15] 樊宏伟, 朱荃, 洪敏, 等. 血小板细胞膜固相色谱法在脉络宁注射液效应物质分析中的应用 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(1): 63-66.
- [16] 马晓伟, 于蒙蒙, 晋兴华, 等. 人参次苷 H 滴丸原料药中皂苷含量测定及细胞膜色谱技术对效应成分筛选 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2545-2550.
- [17] 谭鹏, 张海珠, 张青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.

[责任编辑 李亚楠]