

基于药效权重评价的杜仲叶-刺五加复方“湿法超微提取-膜澄清耦合”工艺筛选研究

龙利娜^{1,2}, 钟文蔚^{3*}, 周丹^{1,2}, 郭立玮^{3,4,5}, 聂红^{1,2*}

1. 暨南大学药学院 中药药效成分及新药研究广东省重点实验室, 广东 广州 510632

2. 中国教育部中药现代化与创新药物开发国际合作实验室, 广东 广州 510632

3. 广州百奥格林生物科技有限公司, 广东 广州 511455

4. 中药制药过程技术与新药创制国家工程研究中心, 广东 广州 510240

5. 广州达原中药膜科研技术工作室, 广东 广州 510091

摘要:目的 基于对湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合工艺的研究, 用细胞存活率及细胞上清液中炎症因子水平筛选提取工艺, 并以杜仲叶-刺五加提取液的免疫、抗炎效应对所筛选的工艺进行验证。方法 根据杜仲叶-刺五加提取液的体外抗炎实验结果, 筛选杜仲叶与刺五加的比例、提取方法(传统热回流提取工艺和湿法超微粉碎提取)、湿法超微粉碎提取时间和膜澄清耦合的影响等提取条件, 用MTT法测定细胞存活率, 并分析杜仲叶与刺五加提取物对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞RAW264.7增殖和抗炎活性的影响。结果 以免疫调节和抗炎药理效应筛选的杜仲叶-刺五加提取的2种工艺产物表明, 湿法超微粉碎提取工艺优于传统热回流方法提取, 该工艺下的杜仲叶-刺五加提取液对LPS诱导RAW264.7细胞炎症具有良好的抑制作用, 可降低炎症细胞上清液中一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6水平, 能降低M1型巨噬细胞标志物诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达, 增加M2型巨噬细胞标志物Arginase表达, 增加M1型和M2型巨噬细胞的吞噬作用。结论 通过湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合制备的杜仲叶-刺五加提取液可以调节炎症过程中的相关细胞因子, 从而产生积极的免疫调节和抗炎作用。在体外抗炎实验的药效权重评价基础上, 验证了湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合可以对杜仲叶-刺五加进行有效提取, 为中药新药研发中绿色提取技术应用方面提供了新思路。

关键词: 杜仲叶; 刺五加; 湿法超微粉碎提取; 微滤膜澄清; 抗炎; 药效权重评价

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)07-2053-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.07.014

Study on process screening for *Eucommiae Folium-Acanthopanaxis Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* via evaluation of medicinal efficacy weighting using wet ultra-micro pulverization extraction and membrane clarification

LONG Li-na^{1,2}, ZHONG Wen-wei³, ZHOU Dan^{1,2}, GUO Li-wei^{3,4,5}, NIE Hong^{1,2}

1. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drugs Research, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. International Cooperative Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization and Innovative Drug Development of Chinese Ministry of Education (MOE), College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. Guangzhou Bio-Green Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 511455, China

4. National Engineering Research Center of Pharmaceutical Processing Technology of Traditional Chinese Medicine and Drug Innovation, Guangzhou 510240, China

5. Guangzhou Dayuan Studio of Membrane Science and Technology for Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510091, China

收稿日期: 2022-02-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81861138042)

作者简介: 龙利娜, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。E-mail: 2595740610@qq.com

*通信作者: 钟文蔚, 博士后, 主要研究方向为反渗透与膜蒸馏浓缩、中药制药工程。E-mail: wenwei.rachel.zhong@hotmail.com

聂红, 教授, 从事中药药理学研究。E-mail: hongnie1970@163.com

Abstract: Objective To screen the extraction process by cell viability and expression of inflammatory substances in cell culture fluid based on the research of wet ultra-micro pulverization extraction (WUPE) coupled with membrane clarification, and the extracts of Duzhongye (*Eucommiae Folium*, EF) and Ciwujia (*Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*, AS) under the best process were investigated for immune and anti-inflammatory effects. **Methods** Based on the results of cellular pharmacological experiments of extracts, the extraction conditions concerning the drug ratio of EF and AS, the choice of extraction method (comparing the extracts obtained by traditional hot reflux extraction process with those obtained by wet ultra-fine micronization extraction process), the effect of extraction time of wet ultra-fine micronization and clarification coupling by microfiltration were screened; Cell viability was determined by MTT method; Effects of EF and AS extracts on proliferation and anti-inflammatory activity of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) were investigated. **Results** The products of two processes of EF-AS extract screened for immunomodulatory and anti-inflammatory pharmacological effects showed that wet ultra-micronized extraction process was superior to the traditional hot reflux method of extraction, EF-AS extract had a good inhibitory effect on inflammation of RAW264.7 cells induced by LPS, decreased the levels of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in the supernatant of inflammatory cells, decreased M1-like cells marker inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, increased M2-like cells marker Arginase expression, increased the phagocytosis of M1- and M2-like cells. **Conclusion** EF-AS extract prepared by wet ultra-fine pulverization extraction and membrane clarification could modulate cytokines in the inflammatory process, resulting in positive immunomodulatory and anti-inflammatory effects. Based on the evaluation of the pharmacological efficacy weights of the *in vitro* pharmacological experimental results, the effective extraction of EF-AS based on coupling of wet ultra-fine pulverization extraction and membrane clarification was verified, which can provide a green manufacturing extraction technology and new ideas for the future development of new Chinese medicines.

Key words: *Eucommiae Folium*; *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis*; wet ultra-fine comminution extraction; microfiltration membrane clarification; anti-inflammation; evaluation of medicinal efficacy weighting

杜仲叶为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv.的干燥叶, 于夏、秋季采摘、干燥, 可药食两用。杜仲叶是辛温之品, 归属肝经和肾经, 可温补肝肾、强健筋骨^[1]。其原植物杜仲珍稀濒危, 是唯一没有同科同属同种植物的第三纪孑遗植, 被划为我国二级保护树种名录^[2]。刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax seuticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms的干燥根和根茎或茎, 属于辛温之品, 归心、脾、肾 3 经, 集补脾肾、安神为一体, 临床治脾气不足、体虚者, 或肺肾两虚、肾虚者, 心脾不足、难入眠者^[3]。刺五加应用广泛, 历史悠久, 是一种具有抗疲劳作用的功能性食品^[4-5]和免疫调节剂^[6]。

湿法超微粉碎提取是将溶剂(水或其他液体)与药物一同投入, 溶剂在粉碎破坏药物结构的同时快速进入内部, 以致在超微粉碎破坏结构作用下, 更有利于药物成分的溶出, 提高其提取率。该技术具有提取时间短且效率高的优势, 可以更好地保护药物的药效^[7-9]。中药材的提取工艺与药效作用密切相关, 不同提取方法会导致提取物中药效成分存在差异, 而不同成分作用于不同的疾病靶点, 往往表现出不同的药理作用^[10]。研究者采用湿法超微粉碎提取对怀菊花中总黄酮的提取进行了研究, 发现不仅提取时间短, 而且得率高和有效成分破坏少^[11]。

张小利等^[12]研究了超微粉碎对香菇多酚组成及抗氧化活性的影响, 结果表明超微粉碎能够提高香菇多酚的溶出率和抗氧化活性; 超微粉碎可以提高铁皮石斛粉末的生物可接受率和抗氧化活性^[13]。

药效权重评价一般指基于不同药理学指标的权重, 结合多因素、多指标对综合药效进行效果评价^[14]。中药化学成分具有多靶点特性, 不同成分作用不同靶点, 单一评价某一成分高低对中药制药工艺筛选反而会适得其反。因此利用药效结果评价产物质量, 可以为中药制药工艺优化提供新方法。从生理角度出发, 重要的机体调节离不开巨噬细胞的参与^[15]。且在指导调节固有免疫中, 大多数免疫调节均有巨噬细胞的参与, 并参与炎症的应答反应^[16]。巨噬细胞因内在或外在的各种刺激而过度活化, 会产生多种炎症介质, 如一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等^[17], 从而使炎症细胞被激活并维持免疫反应。激活的巨噬细胞也可引发感染性休克和炎症性疾病等严重的危害^[18]。因此, 调节巨噬细胞活化可能会有利于许多炎症性疾病的治疗。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)能够激活巨噬细胞, 可诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应^[19]。核因子被激活后, 释放

炎症因子, 活性氧含量升高, 使得机体氧化与抗氧化之间存在差异^[20], 从而导致机体损伤。细菌性损伤类疾病是由机会致病菌(条件致病菌)所引起的传染病或感染性疾病, 婴幼儿、老人免疫低下, 易于感染^[21], 炎症、免疫与微生物群 3 者存在着相对密切的调控通路网络^[22]。

本研究对不同条件下制备的杜仲叶-刺五加提取液进行药理研究, 通过对 RAW264.7 细胞在 LPS 诱导前后的炎症免疫因子进行评价, 确认基于湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合工艺的条件。此外, 在选择提取工艺下制备杜仲叶-刺五加中药复方提取液, 并探究其抗炎和免疫调节机制。本研究提出了基于药效权重的提取方法和膜过程耦合的目标产物质量评价新方法, 为中药研发中新工艺的选择和膜澄清的应用提供新思路。

1 材料

1.1 细胞

RAW264.7 细胞购自武汉普诺赛生命科学有限公司。

1.2 药材

杜仲叶于 2019 年 7 月采自江西井冈山, 刺五加根于 2020 年秋季采自吉林长白山, 经中药制药过程技术与新药创制国家工程中心郭立玮教授鉴定分别为杜仲科植物杜仲 *E. ulmoides* Oliv. 的干燥叶、五加科植物刺五加 *A. seuticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根。

1.3 药品与试剂

DMEM 高糖培养基(批号 8121524)、胎牛血清(批号 1932594C)、PBS 溶液(批号 8120118)和 P/S(批号 C12703955)购自美国 Gibco 公司; MTT(批号 20190401)购自美国 Amresco 公司; 左旋硝基精氨酸[L-NAME, 能抑制一氧化氮合酶活性, 半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值为 70 μmol/L, 质量分数 99.07%]购自美国 BCM 公司; LPS、绿原酸对照品(批号 C12826066, 质量分数 ≥ 98%)、紫丁香苷对照品(批号 C11489870, 质量分数 ≥ 98%)购自上海麦克林生化科技有限公司; IL-10(novoprotein, 美国); 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体、Arginase 抗体、FITC 二抗购自美国 Affinity 公司; Hoechst 33342 染色试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; Triton X-100、牛血清白蛋白组分购自德国 BioFROXX 公司; NO、TNF-α、IL-1β 和 IL-6

ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司; 磷酸、乙腈均为色谱级, 水为超纯水。

1.4 仪器

电子分析天平(美国奥豪斯公司); 低速离心机(美国贝克曼公司); 数显电热恒温水浴锅(上海力辰邦西仪器科技公司); HF90 型培养箱(上海力辰科学仪器公司); 多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司); 生物显微镜(日本 Olympus 公司); FD-1-50 型真空冷冻干燥设备(北京博医康仪器公司); 干燥箱(上海一恒科学仪器公司); XFH-30CA 型高压灭菌设备(浙江新丰医疗器械公司); 混合分散系统 Pilot Plant MC50 型超微粉碎仪(Coruma 公司); 0.2 μm 微滤膜(天津科亿隆实验设备公司); WATERS e2695 型高效液相色谱仪(HPLC, 美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 杜仲叶-刺五加提取液的制备

2.1.1 加热提取 依据老中医临床经验方中杜仲叶-刺五加的比例(3:4), 设计了低、中、高比例的杜仲叶-刺五加提取液。称取不同比例的杜仲叶、刺五加药材粉末(杜仲叶:刺五加=3:2、3:4、3:8, 总质量为 200 g), 加入粉末的 10 倍量纯水, 加热提取 1 h; 滤过, 滤渣加入粉末的 8 倍量纯水, 加热 0.5 h, 滤过, 合并滤液, 于-80 °C 冷冻后, 冷冻真空干燥成冻干粉。

2.1.2 湿法超微粉碎提取 采用杜仲叶-刺五加的最佳比例(3:2)称取药材, 总质量为 200 g, 加入 10 倍量纯水, 置于超微粉碎仪, 10 000 r/min 提取 5 或 10 min, 将离心后所得上清液经 200 nm 陶瓷膜微滤澄清^[9], 对澄清前和澄清后的液体分别进行冻干。

2.2 细胞培养和 MTT 检测

于液氮中小心取出 RAW264.7 细胞, 于 37 °C 水浴中快速溶化, 吸至灭菌离心管, 1000 r/min 离心 5 min, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 25 cm² 培养瓶中培养。

取处于对数生长期的细胞, 以 2×10⁵/mL 接种于 96 孔板, 100 μL/孔, 加入 LPS (0.5、1.0、2.0 μg/mL) 孵育 24 h; 取处于对数生长期的细胞, 以 2×10⁵/mL 接种于 96 孔板, 100 μL/孔, 加入含不同比例或不同工艺提取的杜仲叶-刺五加提取液的培养基, 杜仲叶-刺五加提取液组及 L-NAME 组(100 μmol/L)均预先给药 1 h, 然后加入 1 μg/mL LPS 共孵育, 对照组加入不含药物的培养基, 每组 6 个复孔, 培养 24 h, 观察各组细胞生长状况。每孔加入

20 μL MTT (5 mg/mL), 孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 避光振摇 10 min, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 杜仲叶-刺五加提取液对 M1 型、M2 型巨噬细胞表型的影响

通过免疫荧光法检测 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞标志物 (分别为 iNOS 和 Arginase) 的表达。以 LPS (10 ng/ml) 刺激 RAW264.7 细胞 48 h, 极化为 M1 型巨噬细胞; 以 IL-10 (10 ng/ml) 刺激 RAW264.7 细胞 48 h, 使其极化为 M2 型巨噬细胞。将 M1 型和 M2 型细胞培养至对数生长期, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 24 孔板中, 细胞贴壁后, 加入含杜仲叶-刺五加提取液 (10.0、1.0、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养基, 培养 24 h。弃去培养基, PBS 溶液清洗 2 次; 以 4% 多聚甲醛固定细胞, 30 min 后清洗 3 次; 加入 Triton X-100 常温孵育 10 min, PBS 清洗 4 次; 加入 5% 牛血清蛋白常温封闭 30 min, M1 型细胞加入 iNOS 抗体 (1:400), M2 型细胞加入 Arginase 抗体 (1:400), 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温过夜; 清洗 4 次, 加入 PBS 稀释后的二抗 (1:100), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, 清洗 3 次, 每次 3 min, 加入 Hoechst 试剂染色细胞核, 室温避光孵育 5 min; 清洗 3 次, 加入封片剂覆盖, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 杜仲叶-刺五加提取液对 M1 型、M2 型巨噬细胞吞噬能力的影响

取处于对数生长期的极化 M1 型、M2 型巨噬细胞, 以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种至 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含杜仲叶-刺五加提取液的培养基, 每组 6 个复孔, 培养 24 h。弃去培养基, PBS 洗涤 1 次, 加入中性红染液, 染液充分覆盖细胞, 静置 10 min, PBS 清洗 2 次, 于显微镜下观察并拍照。

2.5 上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平检测

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 24 孔板中, 500 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 加入含杜仲叶-刺五加提取液的培养基, 每组 4 个复孔。收集各孔培养液, 2000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 NO、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.6 HPLC 分析^[23-24]

2.6.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.2% 磷酸水溶液 (A) -

乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~12 min, 4%~12% B; 12~50 min, 12%~14% B; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL ; 检测波长为 277 nm; 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.2 对照品溶液的制备 绿原酸和丁香苷对照品以 50% 甲醇分别配制成质量浓度为 0.199 4、0.623 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备 将杜仲叶-刺五加提取液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱中干燥 24 h, 然后分别取加热提取样品和湿法超微粉碎提取样品 10 mg, 溶于 2 mL 50% 甲醇溶液中, 进样分析。

2.7 统计分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 RAW264.7 细胞炎症模型的建立

如图 1 所示, 与对照组比较, 3 个质量浓度 (0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LPS 均能显著降低 RAW264.7 细胞的存活率 ($P < 0.05$ 、0.001), 其中 LPS (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组细胞存活率接近 50%, 因此选择 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 进行后续实验。

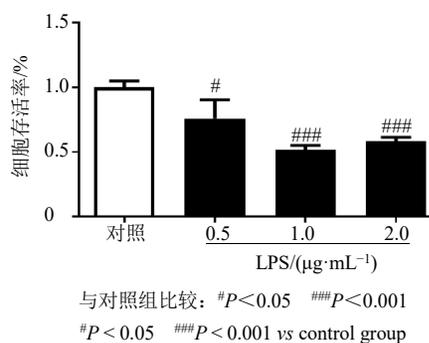


图 1 LPS 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of LPS on survival rate of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 湿法超微粉碎提取与膜工艺中的参数对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响

3.2.1 不同比例的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 杜仲叶-刺五加提取液 (3:2、3:4、3:8) 及 L-NAME (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 均可显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$), 上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.001$);

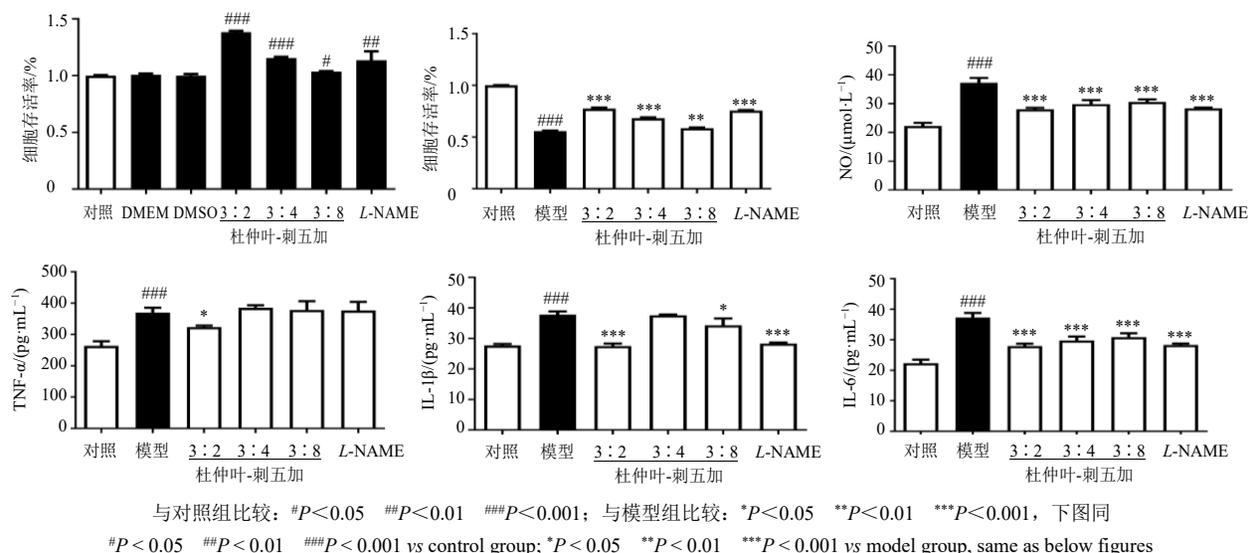


图2 不同比例的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of different proportions of *Eucommiae Folium-Acanthopanaxis Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on survival rate and levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

与模型组比较, 杜仲叶-刺五加提取液(3:2、3:4、3:8)组及 L-NAME 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), 上清液 NO 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.001$); 杜仲叶-刺五加提取液(3:2)组细胞上清液 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$); 杜仲叶-刺五加提取液(3:2、3:8)组和 L-NAME 组细胞上清液 IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001)。因此, 以杜仲叶-刺五加(3:2)为最佳比例进行后续实验。

3.2.2 不同提取方法的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 如图3所示, 与对照组比较, 加热提取和湿法超微提取的杜仲叶-刺五加提取液均可显著促进细胞增殖 ($P < 0.01$ 、0.001)。与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$), 上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 与模型组比较, 加热提取和湿法超微提取的杜仲叶-刺五加提取液组及 L-

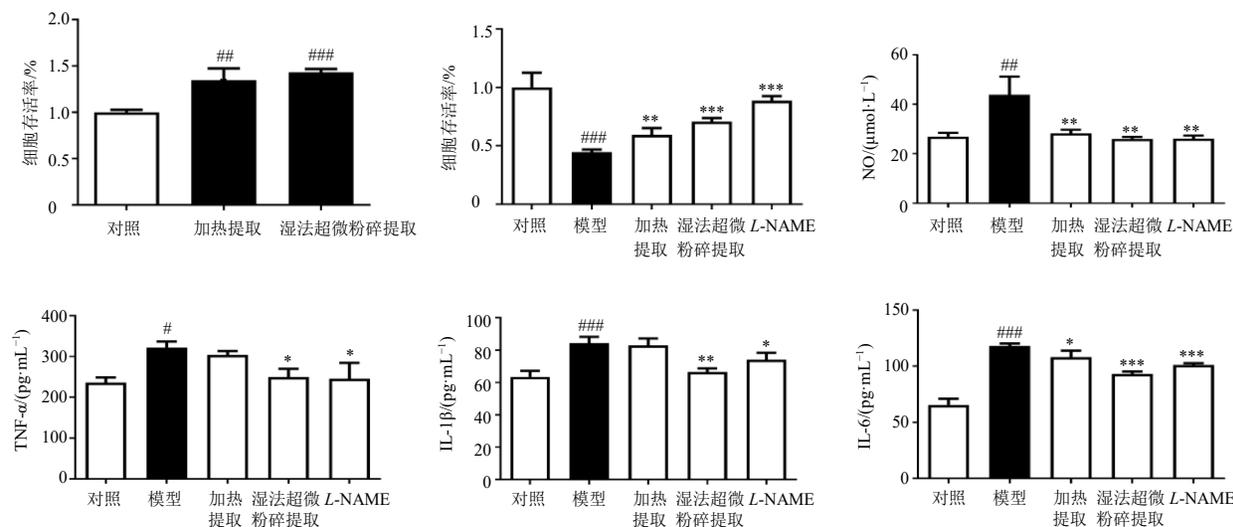


图3 不同提取方法的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of different extraction methods of *Eucommiae Folium-Acanthopanaxis Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on survival rate and levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

NAME 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，上清液 NO 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；湿法超微提取的杜仲叶-刺五加提取液组和 L-NAME 组细胞上清液 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

尽管 2 种提取方法的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞的促增殖作用相当，但是湿法超微粉碎提取为中药制剂提供了一个更绿色的选择，它的操作时间更短，不需要加热。此外，HPLC 分析结果 (图 4) 显示，用湿法超微粉碎提取方法制备的杜仲叶-刺五加提取液中绿原酸和丁香苷的质量浓度分别为 1.330 0、0.0780 0 mg/mL，明显高于传统加热回流提取 (绿原酸和丁香苷的质量浓度分别为 0.450 0、0.002 6 mg/mL)。

3.2.3 不同提取时间的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 如图 5 所示，与对照组比较，湿法超微提取 5 min 或 10 min 的杜仲叶-刺五加提取液均对 RAW264.7 细胞有促进生长趋势，但无明显差异。与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)，上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)；与模型组比较，湿法超微提取 5 min 或 10 min 的杜仲叶-刺五加提

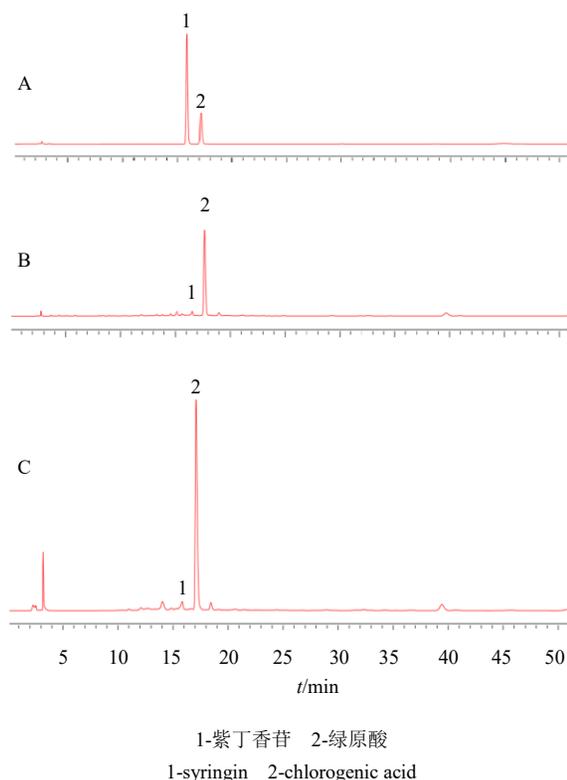


图 4 对照品 (A)、加热提取 (B) 和湿法超微粉碎提取 (C) 样品的 HPLC 分析

Fig. 4 HPLC analysis of control (A), samples from heated extraction (B) and wet ultra-micron extraction (C)

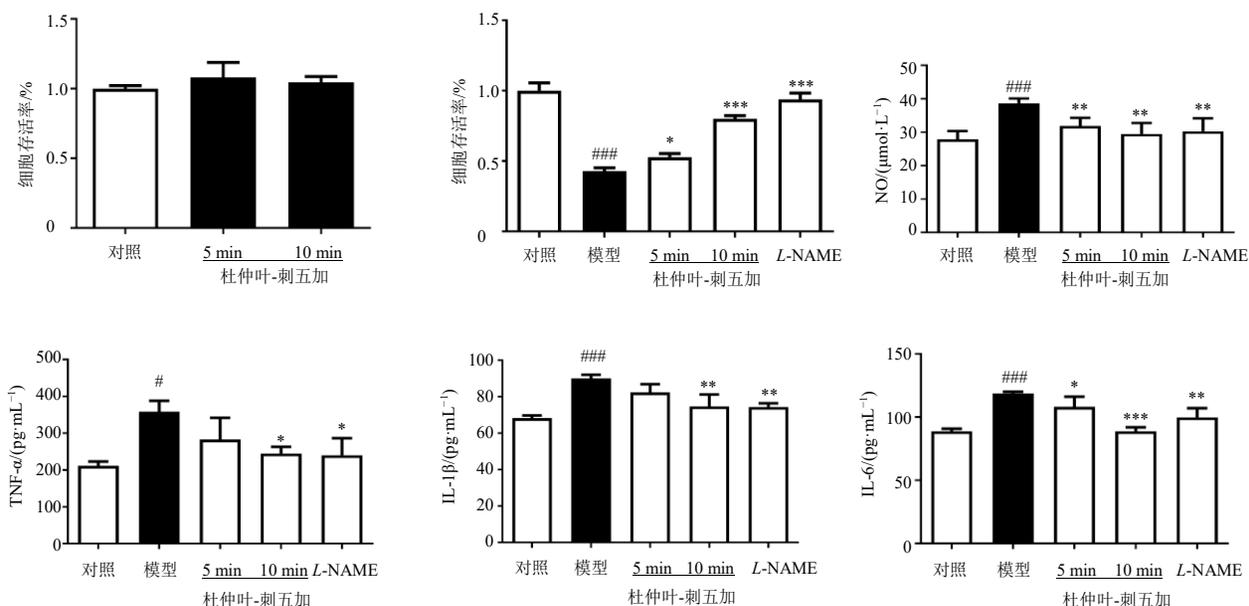


图 5 不同提取时间的刺五加-杜仲叶提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effect of different extraction times of *Eucommiae Folium-Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on survival rate and levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

取液组及 L-NAME 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)，上清液 NO 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；湿法超微提取 10 min 的杜仲叶-刺五加提取液组和 L-NAME 组细胞上清液 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。因此，以湿法超微提取 10 min 为后续实验条件。

3.2.4 采用 0.2 μm 微滤膜澄清工艺的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 如图 6 所示，与

对照组比较，经过 0.2 μm 微滤膜澄清前后，细胞存活率均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)，上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；与模型组比较，膜澄清前后的杜仲叶-刺五加提取液组及 L-NAME 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.001$)，上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，但膜澄清处理后的杜仲叶-刺五加提取液抑制作用优于澄清前。

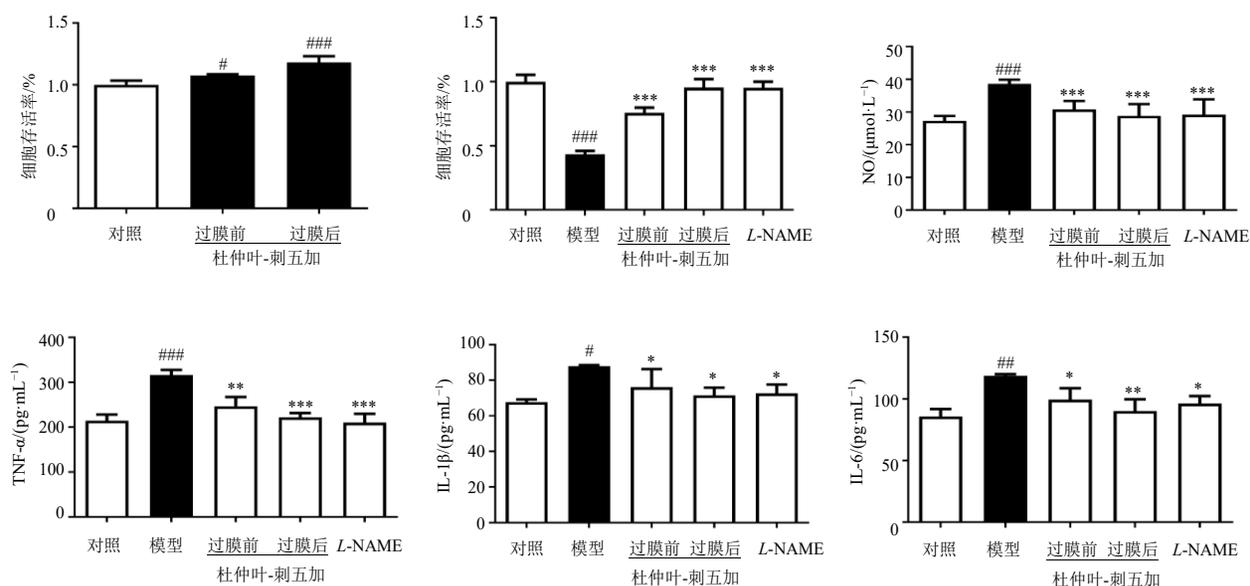


图 6 采用 0.2 μm 微滤膜澄清工艺的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of *Eucommiae Folium-Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts using 0.2 μm microfiltration membrane clarification process on survival rate and levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 杜仲叶-刺五加提取液的剂量筛选

如图 7 所示，与对照组比较，杜仲叶-刺五加提取液 (100、10、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组细胞存活率均显著升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较，模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)，上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与模型组比较，杜仲叶-刺五加提取液 (10、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，上清液 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；杜仲叶-刺五加提取液 (100、10、1、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和 L-NAME 组细胞上清液 NO 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)；杜仲叶-刺五加提取液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组细胞上清液 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.4 杜仲叶-刺五加提取液对促炎和抗炎型细胞的影响

3.4.1 杜仲叶-刺五加提取液对 M1 型、M2 型巨噬细胞表型的影响 如图 8 所示，在 LPS 极化的 M1 型巨噬细胞中，加入杜仲叶-刺五加提取液后绿色荧光物减少，表明杜仲叶-刺五加可降低其标志物 iNOS 的表达。在 IL-10 极化的 M2 型细胞中，加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 杜仲叶-刺五加提取液后绿色荧光增多，表明杜仲叶-刺五加可显著增加其标志物 Arginase 的表达。

3.4.2 杜仲叶-刺五加提取液增加 M1 型、M2 型巨噬细胞的吞噬能力 在普通倒置显微镜 (图 9-A) 和荧光显微镜 (图 9-B) 下可观察到杜仲叶-刺五加

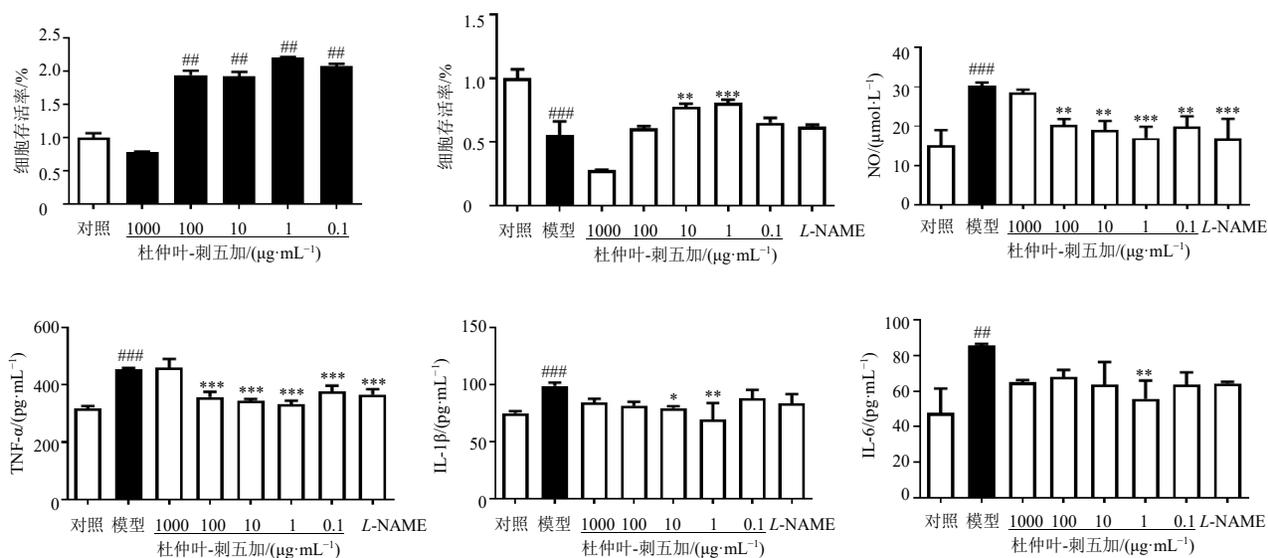


图 7 不同质量浓度的杜仲叶-刺五加提取液对 RAW264.7 细胞对 RAW264.7 细胞存活率及上清液 NO、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of different concentrations of *Eucommiae Folium-Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on survival rate and levels of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in supernatant of RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

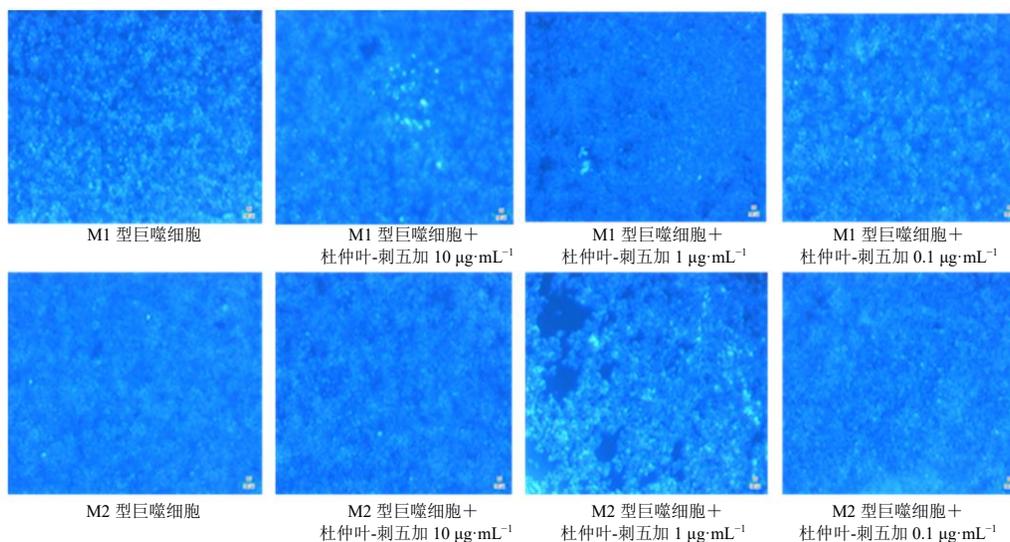


图 8 杜仲叶-刺五加提取液对 M1 型、M2 型巨噬细胞表型的影响

Fig. 8 Effect of *Eucommiae Folium-Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on M1 and M2 macrophage phenotype

组染色数量增加，说明杜仲叶-刺五加可显著增加 M1 型和 M2 型巨噬细胞的吞噬作用。

4 讨论

中药的工艺研究是中药现代化发展的根本条件，将我国瑰宝中药传承是每一个药物研究者的责任。本研究结果显示，采用湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合能在提高效率的同时，提高杜仲叶-刺五加复方提取物的活性。采用湿法超微粉碎提取及膜澄清后，杜仲叶-刺五加提取液的免疫调节、抗炎、抗

菌能力增强，说明湿法超微粉碎提取和膜澄清用于中药的提取分离效果较好，且操作简单、省时。以往的研究证明，从传统技术到新兴技术，工艺研究的发展发生了很大的改变^[25]。在很多工艺优化研究中，通过改变条件可以提高中药中有效成分的提取率^[26]，发现中药新的有效成分^[27]或药理作用^[28]，也给中药制剂的研究提供了基础^[29]。

LPS 是一种炎症诱导剂，过度刺激会造成机体受损，可与巨噬细胞表面抗原识别受体相结合而刺

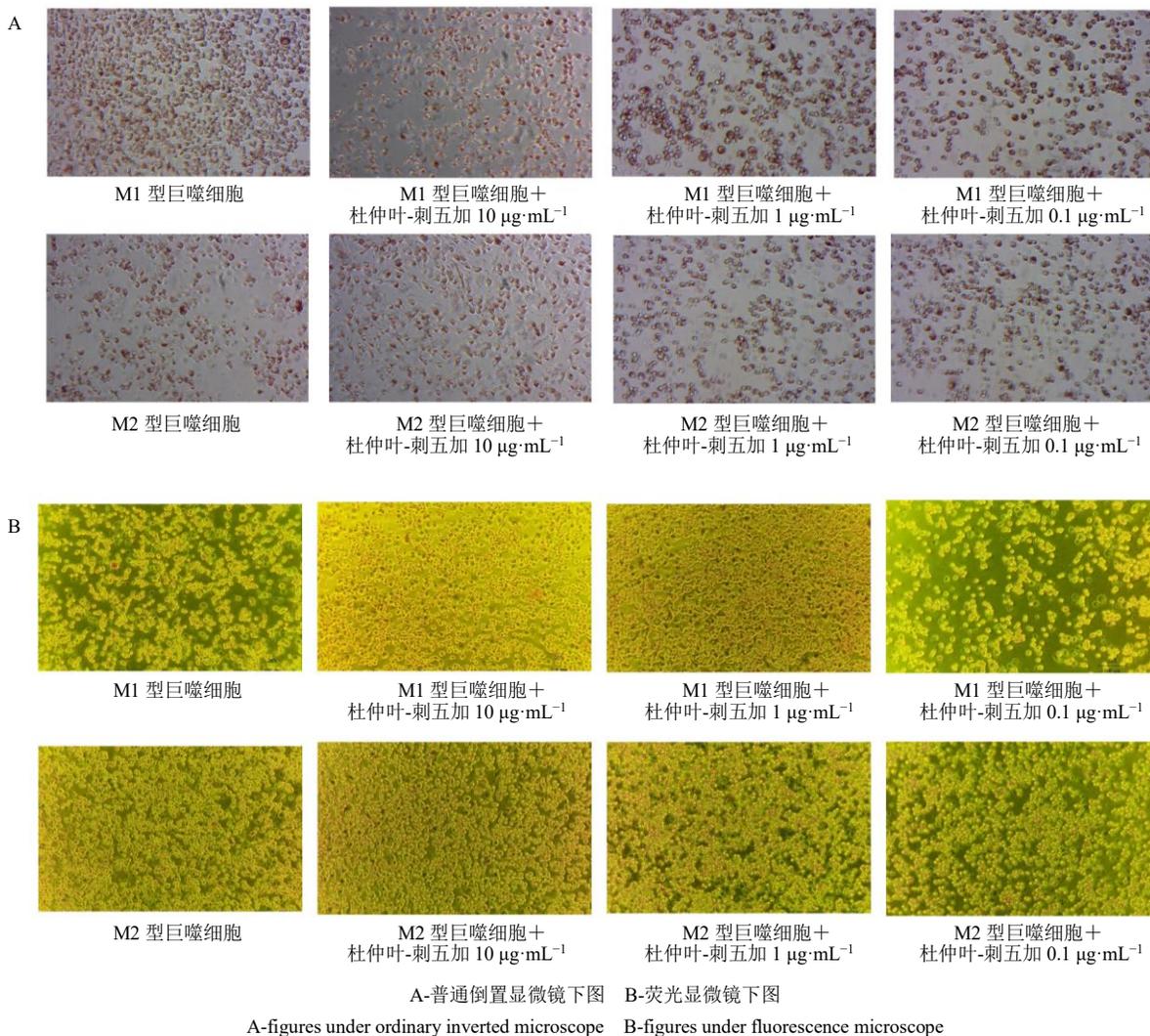


图 9 杜仲叶-刺五加提取液对 M1、M2 样巨噬细胞吞噬作用的影响

Fig. 9 Effect of *Eucommiae Folium-Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis* extracts on phagocytosis of M1 and M2 macrophage

激细胞，继而激活多条炎症通路，产生一系列促炎因子，引起机体严重的炎症反应^[30-31]。LPS 能诱导 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等因子的产生^[32]。NO 是炎症介质的一员^[33]，能引起 DNA 损伤，在免疫和炎症中都有介导作用^[34]。机体损伤可由 TNF 刺激血管内皮细胞、单核巨噬细胞等机体细胞引起^[35]。炎症因子 IL-6 作用于中性粒细胞，其含量升高引发病理反应，为炎症检测的重要指标^[36]。IL-1 β 也被称成炎性痛觉过敏因子^[37]，其含量升高会造成炎症反应^[38]。本研究结果显示，杜仲叶-刺五加提取液能够抑制炎症细胞上清液中的炎症分泌物水平，从而减缓炎症。

在一定条件下，巨噬细胞经过适度增殖，可提高机体防御能力以及对受损机体组织的修复能力，

但细胞增殖应当适当，无节制的刺激会造成细胞发生负向的免疫反应，最终细胞过度凋亡，以致损伤机体^[39]。吞噬能力是能将外入病原体、正常衰老以及其他无关细胞进行吞噬，从而使机体对外界的抵抗力增强，是巨噬细胞被用来衡量活性的一个重要指标^[40]。巨噬细胞是机体关键调节因子，机体组织修复及再生离不开巨噬细胞^[41]。与有辅助功能的 T 细胞类似，在特定的条件下巨噬细胞可发生一定的转变，2000 年 Mills 等^[42]将其划分为 M1 型和 M2 型。M1 型巨噬细胞是巨噬细胞经 γ 干扰素（interferon- γ , IFN- γ ）、LPS 诱导分化，而 M2 型巨噬细胞是巨噬细胞经 IL-4、IL-10 等诱导分化^[43]。M1 型巨噬细胞分泌的炎症因子是驱动炎症的主要因素，也是对外反应和发生适应性免疫的条件；M2 型巨噬细胞

的分泌物能够帮助机体修复^[44]。Mills 等^[45]发现 M1 型和 M2 型巨噬细胞与人类许多疾病相关。因此, 维持二者之间的稳态非常重要。本研究结果发现杜仲叶-刺五加提取液对 M1 型和 M2 型巨噬细胞具有调节作用, 为后续研究提供一定参考。

免疫调节复杂多样, 杜仲叶-刺五加提取液的活性成分可能发挥了协同作用, 从而抗炎和调节免疫。中药的工艺优化研究对于实现中药现代化和标准化的最终目标至关重要。本研究发现, 与加热提取法相比, 湿法超微粉碎提取与膜澄清耦合可以在较短的时间内制备出具有更强的免疫调节和抗炎活性的杜仲叶-刺五加复方提取物, 对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症细胞模型中炎症因子的抑制作用更强。本研究确认了湿法超微粉碎提取和膜澄清耦合在中药绿色制造中的前景, 基于药效权重的理念可为中药新药开发中工艺设计和优化提供一个可靠的评价手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 173.
- [2] 陈建明. 关于杜仲的概述 [J]. 遵义科技, 2004(3): 58-60.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 215.
- [4] Kuo J, Chen K W, Cheng I S, *et al.* The effect of eight weeks of supplementation with *Eleutherococcus senticosus* on endurance capacity and metabolism in human [J]. *Chin J Physiol*, 2010, 53(2): 105-111.
- [5] Zhang X L, Ren F, Huang W, *et al.* Anti-fatigue activity of extracts of stem bark from *Acanthopanax senticosus* [J]. *Molecules*, 2010, 16(1): 28-37.
- [6] Smalinskiene A, Savickiene N, Zitkevicius V, *et al.* Effect of *Acanthopanax senticosus* on the accumulation of cadmium and on the immune response of spleen cells [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2014, 77(21): 1311-1318.
- [7] 董海丽, 刘红. 湿法超微粉碎提取石斛多糖的研究 [J]. 北方园艺, 2013(15): 150-152.
- [8] 田周, 李博, 郭立玮, 等. 湿法超微粉碎和水煎煮提取法对鼠妇蛋白溶栓抗凝活性的影响及机制初探 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(2): 169-174.
- [9] 钟文蔚, 郑东阳, 邹洪芸, 等. 基于中药液、固体物料指标成分含量相关性的膜工艺评估方法创新研究: 以杜仲叶水提液为例 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3234-3238.
- [10] 谢余, 李奇娟, 王文俊, 等. 木香类药物“制剂过程-药效”综合分析展望 [J]. 中药材, 2019, 42(5): 1198-1203.
- [11] 纵伟, 张欢欢. 湿式超微粉碎提取怀菊花总黄酮的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(16): 169-171.
- [12] 张小利, 夏春燕, 王慧清, 等. 超微粉碎对香菇多酚组成及抗氧化活性的影响 [J]. 食品科学, 2015, 36(11): 42-49.
- [13] 张娥珍, 辛明, 苏燕竹, 等. 铁皮石斛超微粉体外抗氧化性研究 [J]. 食品科技, 2014, 39(01): 84-88.
- [14] 马瑞娟, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法: 综合权重法 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.
- [15] Li Y, Meng T T, Hao N, *et al.* Immune regulation mechanism of astragaloside IV on RAW264.7 cells through activating the NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 38-49.
- [16] Gordon S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response [J]. *Cell*, 2002, 111(7): 927-930.
- [17] Shao J, Li Y Q, Wang Z Y, *et al.* 7b, a novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2): 216-228.
- [18] Jung Y S, Kim D H, Hwang J Y, *et al.* Anti-inflammatory effect of tricetin 4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl)ether, a novel flavonolignan compound isolated from *Njavara* on in RAW264.7 cells and in ear mice edema [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 277(1): 67-76.
- [19] Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene [J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2085-2088.
- [20] Ogawa H, Mukai, Kawano Y, *et al.* Th2-inducing cytokines IL-4 and IL-33 synergistically elicit the expression of transmembrane TNF- α on macrophages through the autocrine action of IL-6 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(1): 114-118.
- [21] Rowe T A, McKoy J M. Sepsis in older adults [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2017, 31(4): 731-742.
- [22] Bäumlér A J, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 85-93.
- [23] 孙云峰, 赵妍, 李军, 等. 刺五加提取物 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2): 360-362.
- [24] 阿来·赛坎, 文娥, 田树革. 高效液相色谱法同时测定杜仲叶中4种有效成分的含量 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 571-574.
- [25] 魏远, 杨劫, 焦宁. 中药制剂工艺中新技术应用进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(7): 180-181.

- [26] 江平康, 刘群, 杨松沛, 等. 中药复方总化学成分(浸膏)提取工艺研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 242-245.
- [27] 李伟, 禹玉洪, 戴荣继, 等. HPLC-DAD 及 HPLC-MS 研究干燥工艺对中药粗榷化学成分的影响 [J]. 精细化工, 2007, 24(4): 350-354.
- [28] Zhang T, Yu H H, Lin Y, *et al.* Combinative approaches of chemistry, pharmacology and toxicology for the optimal pharmaceutical preparation of an anti-arthritic Chinese medicine formulation QFJBT [J]. *Digit Chin Med*, 2018, 1(4): 289-301.
- [29] 曾佳, 黄婷, 刘斌斌, 等. 基于计算流体力学的中药流化床制粒工艺数值模拟与实验验证 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30(1): 62-72.
- [30] Ali I, Manzoor Z, Koo J E, *et al.* Monoolein, isolated from *Ishige sinicola*, inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by attenuating mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26(2): 507-511.
- [31] Torres M I, Rios A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(13): 1972-1980.
- [32] Rosadini C V, Kagan J C. Early innate immune responses to bacterial LPS [J]. *Curr Opin Immunol*, 2017, 44: 14-19.
- [33] Coleman J W. Nitric oxide: A regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129(1): 4-10.
- [34] Parwani S R, Parwani R N. Nitric oxide and inflammatory periodontal disease [J]. *Gen Dent*, 2015, 63(2): 34-40.
- [35] Wang C, Yu X H, Yan Y G, *et al.* Tumor necrosis factor- α : A key contributor to intervertebral disc degeneration [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49(1): 1-13.
- [36] Ghasemi H. Roles of IL-6 in ocular inflammation: A review [J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2018, 26(1): 37-50.
- [37] Yazdi A S, Ghoreschi K. The interleukin-1 family [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 941: 21-29.
- [38] Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1): 57-64.
- [39] 杜振华. 苦瓜苷 G 调节巨噬细胞阻止肺损伤和肺癌前病变作用 [D]. 开封: 河南大学, 2019.
- [40] 于笛, 周伟, 郭增旺, 等. 绿豆寡肽对脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264.7 的抗炎作用 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 41-48.
- [41] Wynn T A, Vannella K M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis [J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 450-462.
- [42] Mills C D, Kincaid K, Alt J M, *et al.* M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6166-6173.
- [43] Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 750-761.
- [44] Mills C D, Ley K. M1 and M2 macrophages: The chicken and the egg of immunity [J]. *J Innate Immun*, 2014, 6(6): 716-726.
- [45] Mills C D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease [J]. *Crit Rev Immunol*, 2012, 32(6): 463-488.

[责任编辑 李亚楠]