

• 药理与临床 •

基于抗肝纤维化生物活性及近红外谱效相关的鳖甲质量评价研究

曹梦珍^{1,2}, 黄倩², 牛明², 赵旭^{2*}, 肖小河^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610032

2. 中国人民解放军总医院 第五医学中心 肝病医学部研究所, 北京 100039

摘要:目的 从鳖甲临床抗肝纤维化功效出发并结合近红外光谱, 探索建立关联抗肝纤维化活性的鳖甲质量生物活性评价方法。方法 建立转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 诱导的 LX-2 肝纤维化细胞模型, 采用 qRT-PCR 检测鳖甲对 I 型胶原 (type I collagen, COL1) mRNA 表达的影响, 计算鳖甲对 COL1 mRNA 相对表达量的抑制率; 采用 Western blotting 检测鳖甲对 COL1 蛋白表达的影响, 以评价鳖甲在细胞模型上的抗肝纤维化生物活性。采集并处理不同批次鳖甲药材的近红外光谱数据, 通过谱-效相关分析探究鳖甲药材近红外光谱数据与其抗肝纤维化活性的相关性, 筛选活性波段, 建立鳖甲的效应近红外谱, 以效应近红外谱下面积评价鳖甲药材的质量。结果 体外实验表明, 与模型组比较, 鳖甲水提物 (water extract of *Trionycis Carapax*, WECT) 处理组细胞中 COL1 mRNA 与蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$, 0.01); 基于谱-效相关分析, 共筛选得到 $R > 0.6$ 、 $P < 0.05$ 且波数大于 8 cm^{-1} 的活性波段 3 个, 分别为 $5226 \sim 5235 \text{ cm}^{-1}$ 、 $5943 \sim 6071 \text{ cm}^{-1}$ 与 $6379 \sim 6396 \text{ cm}^{-1}$, 以 3 个活性波段下面积为指标, 建立鳖甲药材的效应近红外谱, 计算各特征波段下面积和, 并分析其与生物活性的相关性, 两者相关系数 R 为 0.813 53。结论 WECT 可抑制 LX-2 细胞外基质的产生来治疗肝纤维化; 效应波谱下面积和 ($5226 \sim 5235 \text{ cm}^{-1}$ 、 $5943 \sim 6071 \text{ cm}^{-1}$ 与 $6379 \sim 6396 \text{ cm}^{-1}$) 作为鳖甲药材的质量评价系数, 用于评价鳖甲药材的质量, 可区分不同批次鳖甲药材的抗肝纤维化活性。

关键词: 鳖甲; 肝纤维化; 质量评价; 生物评价; 近红外光谱; 谱效相关分析

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)10-3150-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.012

Quality evaluation of *Trionycis Carapax* based on anti-liver fibrosis biological activity and effect-related near-infrared spectrumCAO Meng-zhen^{1,2}, HUANG Qian², NIU Ming², ZHAO Xu², XIAO Xiao-he^{1,2}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610032, China

2. Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To explore the biological activity evaluation method of Biejia (*Trionycis Carapax*) quality related to anti-hepatic fibrosis activity based on its clinical anti-hepatic fibrosis effect and combined with near-infrared spectroscopy. **Methods** Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) induced LX-2 liver fibrosis cell model was established, qRT-PCR was used to detect the effect of *Trionycis Carapax* on type I collagen (COL1) mRNA expression, the inhibition rate of COL1 mRNA expression was calculated; Western blotting was used to detect the effect of *Trionycis Carapax* on COL1 protein expression to evaluate the anti-hepatic fibrosis bioactivity of *Trionycis Carapax* on cell model. Near-infrared spectral data of different batches of *Trionycis Carapax* were collected and processed, the correlation between near-infrared spectral data of *Trionycis Carapax* and their anti-liver fibrosis activity through spectrum effect correlation analysis was explored, and the active band was screened. The effect-near infrared spectrum of *Trionycis Carapax* was established, and the area under the effect near infrared spectrum was used to evaluate the quality of *Trionycis*

收稿日期: 2023-01-16

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81930110); 国家中医药传承创新团队项目 (ZYXCXTD-C-202005)

作者简介: 曹梦珍 (1997—), 女, 硕士研究生。E-mail: Caomengzhen1213@163.com

*通信作者: 肖小河, 主要从事中药鉴定学和临床中药学工作。Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302xxh@126.com

赵旭, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: xuzhao080@outlook.com

Carapax. Results *In vitro* experiments showed that compared with model group, *COL1* mRNA and protein expressions in water extract of *Trionycis Carapax* (WECT) were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Based on spectrum effect correlation analysis, three active bands with $R > 0.6, P < 0.05$ and wave number greater than 8 cm^{-1} were screened, which were $5226\text{--}5235 \text{ cm}^{-1}$, $5943\text{--}6071 \text{ cm}^{-1}$ and $6379\text{--}6396 \text{ cm}^{-1}$, respectively. Taking the area under the three active wavebands as the index, the effective near-infrared spectrum of *Trionycis Carapax* was established, the area sum under each characteristic waveband was calculated, and its correlation with biological activity was analyzed. The correlation coefficient between the two was $R = 0.813 53$. **Conclusion** WECT can inhibit the production of LX-2 extracellular matrix to treat liver fibrosis; The sum of the area under the effect spectrum ($5226\text{--}5235 \text{ cm}^{-1}$, $5943\text{--}6071 \text{ cm}^{-1}$ and $6379\text{--}6396 \text{ cm}^{-1}$) is used as the quality evaluation coefficient of *Trionycis Carapax* to evaluate the quality of *Trionycis Carapax*, which can distinguish the anti-liver fibrosis activity of different batches of *Trionycis Carapax* medicine. **Key words:** *Trionycis Carapax*; liver fibrosis; quality evaluation; biological evaluation; near-infrared spectroscopy; spectrum-effect correlation analysis

鳖甲来源于鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲, 始载于《神农本草经》, 在我国已有上千年的使用历史, 中医认为其具有滋阴潜阳、退热除蒸、软坚散结等功效, 临床用于治疗阴虚发热、劳热骨蒸、虚风内动、经闭、癥瘕等症^[1-2]。既往系统生物学研究显示, 鳖甲提取物具有抗纤维化、抗氧化及抗肿瘤等药理作用^[2]。临床研究也证实, 以鳖甲为君药组方的鳖甲软肝片、鳖甲化纤方及鳖甲煎丸等复方中药具有显著减缓或逆转肝纤维化的临床疗效^[3-7], 可见鳖甲在肝纤维化治疗领域具有广阔前景。但目前, 鳖甲的成分物质基础, 尤其是其发挥抗肝纤维化作用的药效物质基础研究几乎为空白^[3], 同时, 由于鳖甲为动物药, 传统的基于成分的质量评价方法难以对其进行准确客观地判断, 这进一步造成了其质量难以保证等问题。由于中药质量的一致性是其保障其临床疗效稳定性的重要因素, 因此, 有必要开发质量控制手段保障其在临床抗肝纤维化治疗领域发挥更大作用。

近红外光谱技术作为一种新兴的检测技术, 已广泛应用于食品、药品等多个行业领域。本课题组前期构建了中药效应近红外谱、整合近红外光谱法以及生物评价 2 种评价方法, 并以大黄配方颗粒为例表明与大黄配方颗粒泻下活性高度相关的 5 个活性特征波段 ($4011\text{--}4390 \text{ cm}^{-1}$ 、 $4859\text{--}5461 \text{ cm}^{-1}$ 、 $7012\text{--}7493 \text{ cm}^{-1}$ 、 $10992\text{--}11312 \text{ cm}^{-1}$ 以及 $11871\text{--}12489 \text{ cm}^{-1}$) 能够有效地将不同厂家不同批次的配方颗粒区分开, 可实现大黄配方颗粒质量波动的快速、在线检测^[8]。另有研究显示, 采用近红外光谱技术可快速准确地识别猪皮胶、牛皮胶、驴皮胶 3 种阿胶产品^[9]; 采用近红外光谱分析技术建立的干姜中多指标成分含量快速预测方法, 可对不同产地干姜进行快速无损的质量评价^[10]。以上研究表明近红

外光谱分析技术可将不同药材或同一药材的不同批次较好地地区分, 对于中药材的质量控制具有可观的应用前景。

鳖甲在肝纤维化临床治疗中应用广泛, 肝纤维化作为慢性肝脏疾病的结局, 其中心环节是肝细胞损伤引起的肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 的激活^[11], 正常情况下 HSCs 处于静止状态, 产生少量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) ^[12], 而激活的 HSCs 会产生大量的 ECM, 从而快速引起胶原化反应^[13]。ECM 主要由 I 型胶原 (type I collagen, COL1)、IV 型胶原等组成, COL1 侧向排列形成的大量胶原纤维是肝纤维化的典型特征, 也是肝纤维化严重程度评价的主要指标。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 为肝纤维化模型的活化剂, 可使 HSC 处于高活化状态^[5]。因此, 对于动物药鳖甲的质量控制, 采用与临床疗效直接关联的抗肝纤维化生物评价模式, 基于谱-效相关建立活性校正的指纹图谱, 对于保障鳖甲的质量, 拥有良好的应用远景。

本研究以鳖甲为模式药, 以“源自临床, 证于实验”为研究路径, 从鳖甲的临床作用出发, 基于 TGF- $\beta 1$ 诱导的人 HSC 细胞系 LX-2 肝纤维化细胞模型, 初步探索鳖甲水提物的抗肝纤维化生物活性, 为鳖甲的质量控制及鳖甲抗肝纤维化机制研究提供线索; 对鳖甲近红外谱信息与抗肝纤维化生物活性进行相关性分析, 建立关联活性的质量评价模式, 以期克服鳖甲质量控制与生物活性关联不强、代表性不足等问题。

1 材料

1.1 细胞

人肝星状 LX-2 细胞由解放军总医院第五医学中心肝病医学中心提供。

1.2 药材

鳖甲药材(具体信息见表1)购自北京安国药材市场,经解放军总医院第五医学中心肖小河研究员鉴定为鳖科动物鳖 *T. sinensis* Wiegmann 的背甲,且按《中国药典》2020年版要求检查合格。

表1 18批次鳖甲药材样品信息

Table 1 Information of 18 batches of *Trionycis Carapax*

样品编号	产地	样品编号	产地
S1	湖北	S10	浙江
S2	湖北	S11	湖北
S3	湖北	S12	湖北
S4	湖北	S13	湖北
S5	湖南	S14	湖南
S6	湖南	S15	湖南
S7	湖南	S16	湖南
S8	湖南	S17	浙江
S9	浙江	S18	浙江

1.3 药品与试剂

DMEM 培养基(批号 CM10013)购自北京中科迈晨生物技术有限公司;青霉素-链霉素双抗(批号 CC008)、胰酶(批号 CC008)购自迈晨科技(北京)有限公司;CCK-8 试剂(批号 FC0720)、RT Master Mix for qPCR(批号 HY-K0510)、SYBR Green qPCR Master Mix(批号 HY-K0521)购自 Med Chem Express 公司;qRT-PCR 引物由上海生工生物工程公司合成;RNA 快速纯化试剂盒(批号 ES-RN001)购自上海奕杉生物科技有限公司;RIPA 裂解液(批号 C1053)购自北京普利莱基因技术有限公司;BCA 法蛋白定量试剂盒(批号 C190501)购自北京阳光英锐生物科技有限公司;COL1 多克隆抗体(批号 72026S)购自美国 CST 公司;GAPDH 多克隆抗体(批号 A01020)购自 Abbkine 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 P21118)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 P21206)购自北京全式金生物技术股份有限公司。

1.4 仪器

HF100 型 CO₂ 恒温培养箱(上海力申科学仪器有限公司);SW-CJ-2F/2FD 型超净工作台(苏州净化仪器厂);IX70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);MSA36S 型分析天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声波仪器有限公司);MPA 型傅立叶变换近红外分析仪(德国 Bruker 公司);Fresco 21 型超低速低温离心机;ABI QuantStudio 6 Flex 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo

Fisher Scientific 公司);5200Multi 型全自动化学发光成像仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 提取物的制备 称取鳖甲药材,粉碎,过 80 目筛,料液比 1:20,40 °C、250 kW 超声水提 30 min,减压浓缩,冷冻干燥,得鳖甲药材的超声水提物(water extract of *Trionycis Carapax*, WECT),备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取上述提取物粉末,按照要求配制成相应浓度,过 0.22 μm 滤膜,得供试品溶液。

2.2 体外实验

2.2.1 WECT 细胞毒性的测定 将 LX-2 细胞以 2×10⁵ 个/mL 均匀接种于 96 孔板中,100 μL/孔,细胞贴壁后,分别加入生药质量浓度为 0、25、50、100、150、200、300 mg/mL 的 WECT 处理 1 h,随后加入 20 ng/mL TGF-β1 共培养 24 h,按照 CCK-8 试剂说明书检测细胞活力。

2.2.2 qRT-PCR 验证 WECT 抗肝纤维化生物活性 将 LX-2 细胞以 2×10⁵ 个/mL 均匀接种于 24 孔板中,500 μL/孔,细胞贴壁后,分别加入生药质量浓度为 40、80、120、160、200、300 mg/mL 的 WECT 处理 1 h,随后加入 20 ng/mL TGF-β1 共培养 24 h,收集细胞,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 2。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列(5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: TGCACCACCAACTGCTTAGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>COL1</i>	F: GACACAGAGGTTTCAGTGG R: CACCCTTAGCACCAACAG

计算 WECT 对 *COL1* mRNA 相对表达量的抑制率,并计算半数效应浓度(50% effective concentration, EC₅₀)值。随后在 EC₅₀ 对应的生药浓度下,考察不同批次 WECT 对 *COL1* mRNA 相对表达的抑制率,评价鳖甲药材的抗肝纤维化生物活性。

相对表达量抑制率=(模型组相对表达量-给药组相对表达量)/模型组相对表达量

2.2.3 Western blotting 检测 WECT 抗肝纤维化生物活性 将 LX-2 细胞以 2×10⁵ 个/mL 均匀接种于 6 孔板中,2 mL/孔,细胞贴壁后,分别加入生药质量浓度为 120、160、200、300 mg/mL 的 WECT 处理 1 h,随后加入 20 ng/mL TGF-β1 共培养 24 h,收集

细胞, 使用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5%脱脂奶粉, 室温封闭 1 h, TBST 洗膜后加入 COL1、GAPDH 抗体, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 最后用 ECL 发光液显影。

2.3 近红外光谱数据采集及处理

选取 10 批 (S1~S10) 鳖甲药材, 用于建立基于效应近红外谱的鳖甲质量评价方法, 其余 8 批 (S11~S18) 用于验证质量评价方法的科学性。取适量 WECT, 加入去离子水溶解至生药质量浓度 1000 mg/mL, 统一装入 1 mL 液体样品测量管, 采集光谱。采样方式: 光谱扫描范围 12 500~4000 cm^{-1} , 分辨率 8 cm^{-1} , 以去离子水溶液为空白, 扫描 32 次, 每个样品重复 3 次, 求平均光谱。为了排除干扰因素造成测量结果的偏倚, 利用 OPUS7.5 软件对近红外光谱数据进行一阶导数预处理, 并对经过一阶导数预处理的近红外光谱数据进行相似度分析。

2.4 不同批次的鳖甲药材抗肝纤维化生物活性的评价

在 40、60、120、160、200、300 mg/mL 生药质量浓度下测定 WECT 对肝纤维化模型细胞中 COL1 mRNA 相对表达量的抑制率, 并计算 EC_{50} 值。检测

生药浓度为 EC_{50} 时, 10 个批次 WECT 对 TGF- β 1 诱导的肝纤维化模型细胞中 COL1 mRNA 表达量的抑制率, 评价不同批次鳖甲药材的抗肝纤维化生物活性。

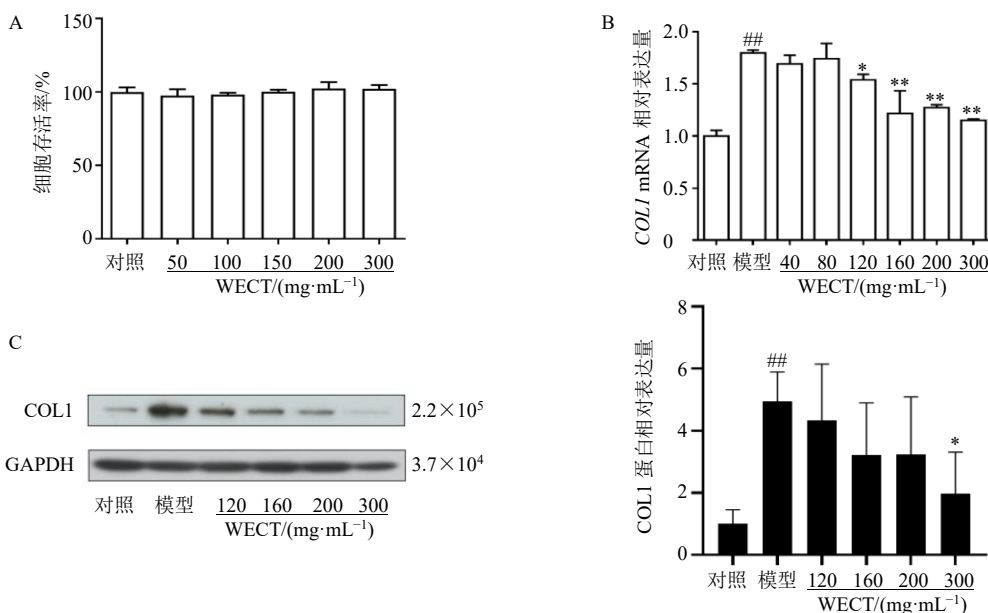
2.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据处理与统计分析, 采用 t 检验分析两样本间数据, 采用单因素方差分析比较组间数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 使用 OPUS7.5 软件对近红外光谱进行预处理, 在线数据分析软件 Metaboanalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 进行相关性分析。

3 结果

3.1 体外实验结果

CCK-8 法检测 WECT 的细胞毒性, 结果显示 WECT 在生药浓度不超过 300 mg/mL 下处理 LX-2 细胞 24 h 无细胞毒性 (图 1-A)。肝星状细胞的活化与增殖是肝纤维化的关键, 本实验构建了 TGF- β 1 诱导的 LX-2 肝纤维化细胞模型, 用于评价 WECT 的抗肝纤维化生物活性。如图 1-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组 COL1 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, WECT (120、160、200、300 mg/mL) 组 COL1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 300 mg/mL WECT 可显著抑制 COL1 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。



A-WECT 对 LX-2 细胞存活率的影响 B-WECT 对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞 COL1 mRNA 表达的影响 C-WECT 对 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞 COL1 蛋白表达的影响 与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

A-effect of WECT on survival rate of LX-2 cells B-effect of WECT on COL1 mRNA expression in TGF- β 1-induced LX-2 cells C-effect of WECT on COL1 protein expression in TGF- β 1-induced LX-2 cells ### $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 1 细胞实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Cell experiment results ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

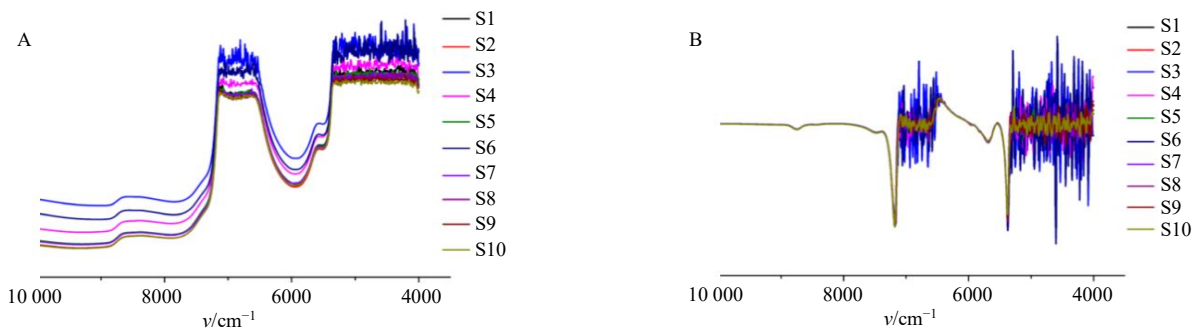
3.2 近红外光谱数据的预处理与相似度分析

10 批鳖甲药材 (S1~S10) 的近红外光谱数据见图 2-A, OPUS7.5 软件对近红外光谱数据进行一阶导数预处理见图 2-B。对经过一阶导数预处理的近红外光谱数据进行相似度分析 (表 3), 结果显示 10 批鳖甲药材的相似大于 0.9, 这表明 10 批鳖甲药材的近红外光谱信息的相似度高, 提示单以近红外光

谱数据难以实现鳖甲药材的质量评价。

3.3 不同批次的鳖甲药材抗肝纤维化生物活性的评价

在 40、60、120、160、200、300 mg/mL 生药质量浓度下测定 WECT 对肝纤维化模型细胞中 *COL1* mRNA 相对表达量的抑制率, 计算得到 EC_{50} 值为 149.5 mg/mL, 结果见图 3-A。据此, 检测在生药质



A-10 批鳖甲药材的近红外光谱数据 B-经一阶导数处理后的 10 批鳖甲药材的近红外光谱信息

A-near-infrared spectrum data of 10 batches of *Trionycis Carapax* B-near-infrared spectrum information of 10 batches of *Trionycis Carapax* after first derivative processing

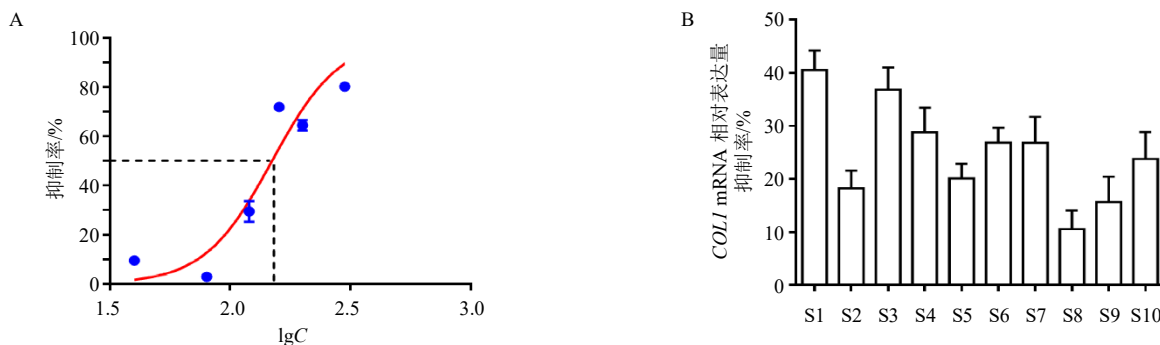
图 2 10 批鳖甲药材的近红外光谱信息

Fig. 2 Near-infrared spectrum of 10 batches of *Trionycis Carapax*

表 3 10 批鳖甲药材 (S1~S10) 的相似度分析

Table 3 Fingerprint similarity analysis of 10 batches of *Trionycis Carapax* (S1—S10)

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000 00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S2	0.999 45	1.000 00	—	—	—	—	—	—	—	—
S3	0.958 12	0.949 07	1.000 00	—	—	—	—	—	—	—
S4	0.995 49	0.980 19	0.980 19	1.000 00	—	—	—	—	—	—
S5	0.999 89	0.959 62	0.959 62	0.995 95	1.000 00	—	—	—	—	—
S6	0.979 11	0.995 28	0.995 82	0.992 96	0.980 16	1.000 00	—	—	—	—
S7	0.999 86	0.957 02	0.957 02	0.995 14	0.999 86	0.978 20	1.000 00	—	—	—
S8	0.999 33	0.948 08	0.948 08	0.991 83	0.999 18	0.971 83	0.999 52	1.000 00	—	—
S9	0.999 19	0.947 24	0.947 24	0.991 56	0.99903	0.971 83	0.999 41	0.999 91	1.000 00	—
S10	0.999 16	0.947 67	0.947 67	0.991 69	0.999 03	0.961 27	0.999 43	0.999 86	0.999 95	1.000 00



A-WECT 对肝纤维化模型细胞中 *COL1* mRNA 相对表达量的 EC_{50} B-10 批 WECT 对 *COL1* mRNA 表达量的抑制率

A- EC_{50} of WECT on inhibiting *COL1* mRNA relative expression in liver fibrosis model cells B-inhibition rate of 10 batch of WECT on *COL1* mRNA expression

图 3 10 批鳖甲药材的抗肝纤维化生物活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Anti-hepatic fibrosis biological activity of 10 batches of *Trionycis Carapax* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

量浓度为 150 mg/mL 时 10 个批次 WECT 对 TGF-β1 诱导的肝纤维化模型细胞中 COL1 mRNA 表达量的抑制率, 评价不同批次鳖甲药材的抗肝纤维化生物活性, 结果见图 3-B。

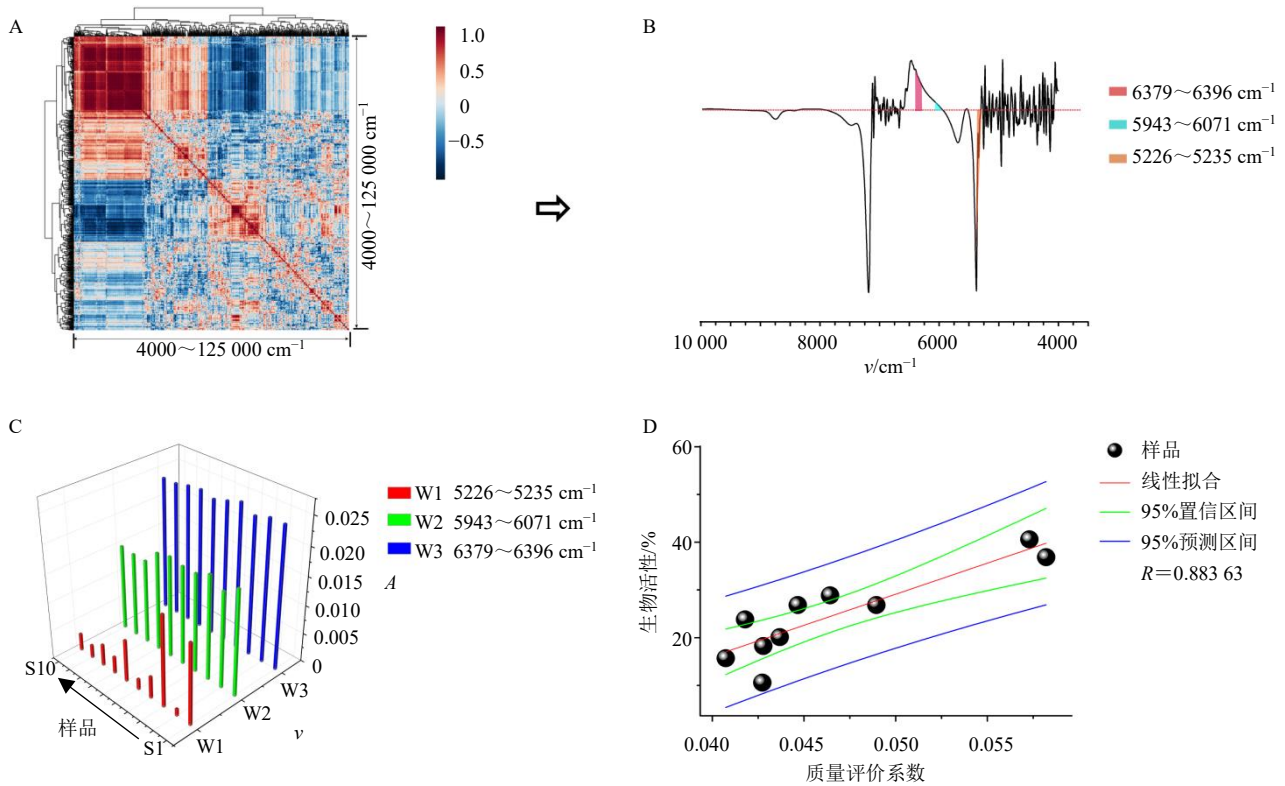
3.4 鳖甲药材效应近红外谱的建立与应用

对 10 批鳖甲药材的近红外光谱数据和鳖甲对 TGF-β1 诱导的肝纤维化模型细胞中 COL1 mRNA 相对表达量的抑制率进行相关性分析, 共筛选得到 $R > 0.6$ 、 $P < 0.05$, 且波数大于 8 cm^{-1} 的活性波段 3 个, 分别为 $5226\sim 5235\text{ cm}^{-1}$ 、 $5943\sim 6071\text{ cm}^{-1}$ 与 $6379\sim 6396\text{ cm}^{-1}$ (图 4-A、B)。为进一步探究各活性波段与鳖甲药材抗肝纤维化生物活性的相关性, 以各活性波段下面积为指标构建鳖甲药材的效应近红外谱 (图 4-C), 结果表明不同鳖甲药材的效应近红外谱之间存在一定的差异性。将各效应波谱下面积和作为鳖甲药材的质量评价系数, 用于评价鳖甲药材

的质量, 结果表明鳖甲药材的抗肝纤维化活性与质量评价系数呈显著正相关 ($R=0.886\ 23$, 图 4-D)。

3.5 鳖甲药材效应近红外谱的验证

为进一步验证质量评价方法的科学性, 本研究另取 8 批鳖甲药材 (S11~S18), 采集其近红外光谱信息并进行一阶导数处理, 结果见图 5-A。测定其抗纤维化活性, 结果见图 5-B。计算各特征波段下的面积, 建立效应近红外光谱, 见图 5-C。随后计算各批次药材的质量评价系数 (质量评价系数 = $SW1 + SW2 + SW3$, SW1、SW2、SW3 分别表示 $5226\sim 5235\text{ cm}^{-1}$ 、 $5943\sim 6071\text{ cm}^{-1}$ 与 $6379\sim 6396\text{ cm}^{-1}$ 3 个波段下的面积和), 并将各批次药材的质量评价系数与其抗肝纤维化活性进行相关性分析 (图 5-D), 结果显示两者呈显著正相关 ($R=0.813\ 53$), 这表明基于鳖甲效应近红外谱构建的鳖甲质量评价系数能够较好评价鳖甲抗肝纤维化生物活性。

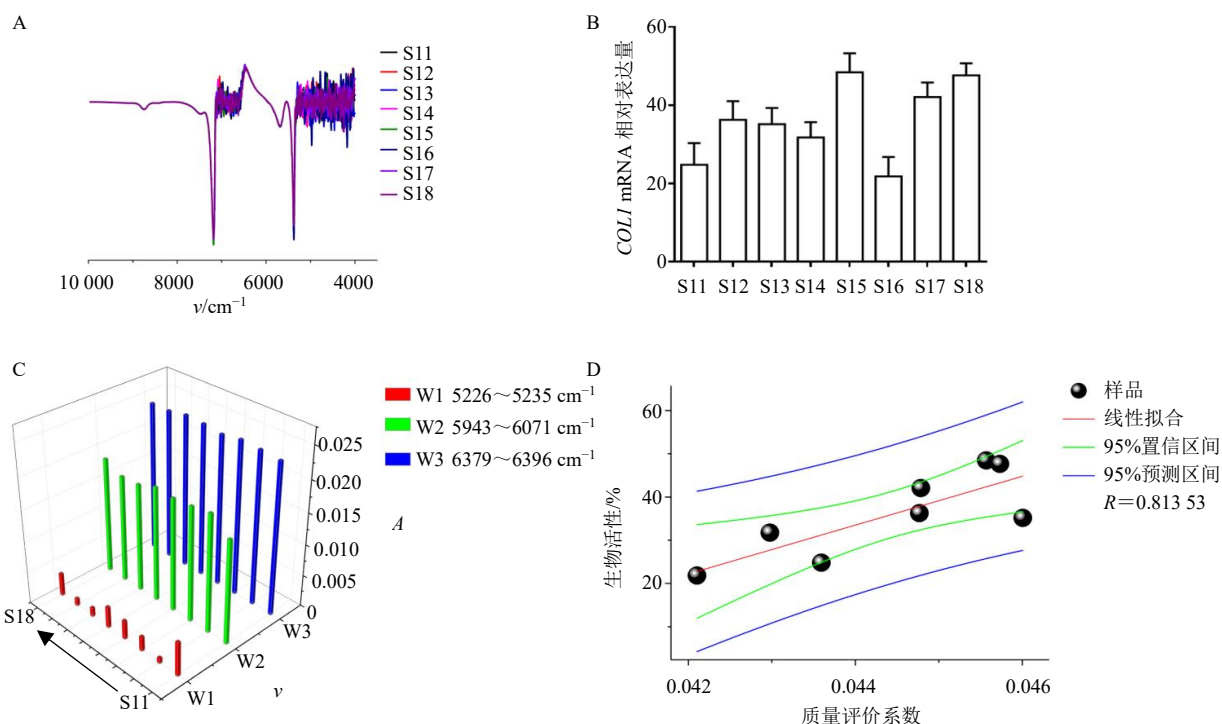


A-10 批 WECT 近红外光谱信息与其生物活性的相关性分析结果 B-活性波段筛选示意图 C-10 批鳖甲药材的效应近红外谱 D-10 批鳖甲药材的质量评价系数与生物活性相关性分析结果图, 其中质量评价系数 = $SW1 + SW2 + SW3$, SW1、SW2、SW3 分别表示 $5226\sim 5235\text{ cm}^{-1}$ 、 $5943\sim 6071\text{ cm}^{-1}$ 与 $6379\sim 6396\text{ cm}^{-1}$ 3 个波段下的面积和

A-correlation analysis results of near-infrared spectrum information and biological activity of 10 batches of WECT B-schematic diagram of active band screening C-effect-related near-infrared spectrum of 10 batches of *Trionycis Carapax* D-quality evaluation coefficient and biological activity correlation analysis results of 10 batches of *Trionycis Carapax*, quality evaluation coefficient = $SW1 + SW2 + SW3$, SW1, SW2 and SW3 respectively represent the area of $5226\sim 5235\text{ cm}^{-1}$, $5943\sim 6071\text{ cm}^{-1}$ and $6379\sim 6396\text{ cm}^{-1}$

图 4 10 批鳖甲药材效应近红外谱的建立

Fig. 4 Establishment of effect-related near-infrared spectrum of 10 batches of *Trionycis Carapax*



A-8 批验证药材的近红外光谱信息 B-8 批验证药材的抗肝纤维化生物活性 C-8 批验证药材活性波段下效应近红外谱 D-效应近红外谱与生物活性相关性分析

A-near-infrared spectrum information of eight batches of validation medicinal materials B-anti-liver fibrosis biological activity of eight batches of validation medicinal materials C-effect-related near-infrared spectrum of eight batches of validation medicinal materials D-correlation analysis of effect-near infrared spectrum and biological activity

图5 效应近红外谱的验证

Fig. 5 Verification of effect-related near-infrared spectrum

4 讨论

鳖甲在临床应用广泛，以鳖甲为君药的复方鳖甲软肝片对肝纤维化及早期肝硬化的疗效显著，是我国为数不多的用于治疗肝纤维化的药物^[14]。近年来不少学者，基于生物评价建立了反映中药功效与毒性、中药制剂的一致性等的评估方法，但对于以鳖甲为例的药效物质尚不明确的动物药的质量评价研究较少^[15]。因此关联生物活性的质量评价方法建立对于鳖甲的开发与利用有着重要意义^[16]。据此，本研究以鳖甲为模式药物，结合鳖甲的抗肝纤维化生物活性与鳖甲药材近红外指纹图谱，通过谱-效相关分析，探究鳖甲的活性波段，用于鳖甲的质量评价，以期为动物药质量控制模式的建立与健全提供参考。

首先，本研究在细胞水平证实了鳖甲水提物的抗肝纤维化生物活性，实验表明，WECT可以减少TGF-β1诱导的肝纤维化LX-2细胞模型中COL1 mRNA及蛋白的表达，这提示WECT可能通过抑制ECM的沉积而发挥抗肝纤维化生物活性；在此基础

上，本研究基于WECT对肝纤维化细胞模型中COL1 mRNA表达量的抑制率，建立了鳖甲药材生物活性评价方法；并通过对生物活性与近红外光谱数据进行相关性分析，筛选出具有高相关性的3个活性波段，分别为5226~5235 cm⁻¹、5943~6071 cm⁻¹与6379~6396 cm⁻¹，以此3个活性波段下面积为指标建立了鳖甲抗肝纤维化效应近红外谱，以效应近红外谱下面积和，作为质量评价系数，并应用于鳖甲药材质量评价，结果显示，质量评价系数与抗肝纤维化生物活性呈正相关且相关性良好，这提示基于效应近红外谱建立鳖甲的质量评价系数，在一定程度上能够区别不同鳖甲的抗肝纤维化生物活性。

综上，本研究以鳖甲为例，首先在细胞水平验证了鳖甲的抗肝纤维化生物活性，通过近红外光谱数据的分析与抗肝纤维化活性评价，建立了鳖甲效应近红外谱，并通过计算鳖甲的质量评价系数，实现了对鳖甲功效质量的评价，为鳖甲药材的开发与利用提供了有力保障，从而为鳖甲及动物药质量评价方法的建立或健全提供了新的线索。此外，基于

效应近红外谱活性波段的鳖甲质量评价,是关联生物活性、操作相对简便的质量评价方法,可为其他动物药质量评价方法的建立或完善提供一定参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 肖云芝, 于超, 刘朝勇, 等. 鳖甲药材指纹图谱与其抗肝纤维化作用的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2506-2510.
- [2] Wu X, Zhang H B, Fan S S, *et al.* Quality markers based on biological activity: A new strategy for the quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 103-108.
- [3] Wu Y W, Sun S Q, Zhou Q, *et al.* Fourier transform mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy for rapid quality assessment of Chinese medicine preparation Honghua Oil [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 498-504.
- [4] 肖小河, 张定堃, 王伽伯, 等. 中药品质综合量化评控体系——标准评控力金字塔 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 7-12.
- [5] Jiang T T, Liu X L, Jiang Y Y, *et al.* Minimal hepatic encephalopathy and Biejia-Ruangan are associated with first hospital readmission in nonalcoholic cirrhosis patients [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6652858.
- [6] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [7] Li T, Su C. Authenticity identification and classification of *Rhodiola* species in traditional Tibetan medicine based on Fourier transform near-infrared spectroscopy and chemometrics analysis [J]. *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 204: 131-140.
- [8] 张萍, 牛明, 谭鹏, 等. 中药效应近红外谱的构建及应用: 以大黄配方颗粒为例 [J]. 药科学报, 2019, 54(12): 2162-2168.
- [9] 高凤伟, 张东京, 武以敏, 等. 基于近红外光谱技术结合判别分析快速识别阿胶产品 [J]. 廊坊师范学院学报: 自然科学版, 2017, 17(3): 23-25.
- [10] 张振宇, 常相伟, 严辉, 等. 基于近红外光谱分析技术的干姜质量快速评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7516-7523.
- [11] Wu J, Zern M A. Hepatic stellate cells: A target for the treatment of liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol*, 2000, 35(9): 665-672.
- [12] Bataller R, North K E, Brenner D A. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: A critical appraisal [J]. *Hepatology*, 2003, 37(3): 493-503.
- [13] Henderson N C, Forbes S J. Hepatic fibrogenesis: From within and outwith [J]. *Toxicology*, 2008, 254(3): 130-135.
- [14] Tacke F, Zimmermann H W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5): 1090-1096.
- [15] 游云, 廖福龙, 黄璐琦. 基于生物活性测定开展中药质量控制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 452-456.
- [16] Yoo W, Gjuka D, Stevenson H L, *et al.* Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid [J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0189965.

[责任编辑 李亚楠]