

## 鸡血藤指纹图谱的建立及抗肿瘤谱效关系研究

聂钰湘, 郭占京\*, 閻雪晴, 韦敏珍, 余远智, 何丽霞, 黄宏妙\*  
广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

**摘要:** 目的 建立鸡血藤 *Spatholobus suberectus* HPLC 指纹图谱, 研究鸡血藤指纹图谱与抗肿瘤活性之间的谱效关系。方法 采用 HPLC 法建立鸡血藤指纹图谱; 以人肝癌 HepG2 细胞为供试细胞, 采用 MTT 法测定鸡血藤抗肿瘤活性, 运用灰色关联度和偏最小二乘法分析鸡血藤指纹图谱与抗肿瘤作用的谱效关系。结果 构建鸡血藤的 HPLC 图谱, 标出了 14 个共有峰, 并指认了其中 6 个共有峰, 其中 2 号峰儿茶素、3 号峰葛根素、9 号峰大豆苷元偏最小二乘标准方程回归系数为正值, 与抗肿瘤活性呈正相关, 且 VIP 值 > 1.0; 同时, 通过活性成分验证结果显示儿茶素、葛根素、大豆苷元均具可抑制 HepG2 细胞生长, 且存在浓度相关性, 可认为是鸡血藤抗 HepG2 细胞的物质基础。结论 通过鸡血藤 HPLC 指纹图谱与抗肿瘤活性之间的相关性分析, 为挖掘鸡血藤的质量标志物以及药材质量控制提供参考。

**关键词:** 鸡血藤; 指纹图谱; 抗肿瘤; 谱效关系; 儿茶素; 葛根素; 大豆苷元

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)07-2405-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.026

## Establishment of fingerprints and spectrum-effect relationship of anti-tumor activity of *Spatholobi Caulis*

NIE Yuxiang, GUO Zhanjing, XIA Xueqing, WEI Minzhen, YU Yuanzhi, HE Lixia, HUANG Hongmiao  
College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

**Abstract: Objective** To establish HPLC fingerprints of Jixueteng (*Spatholobi Caulis*) and study the spectrum-effect relationship between its fingerprints and anti-tumor activity. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprint of *Spatholobi Caulis*. With HepG2 cells as the test cells, the anti-tumor activity of *Spatholobi Caulis* was determined by MTT method. The spectrum-effect relationship between *Spatholobi Caulis* fingerprint and anti-tumor activity was analyzed by grey correlation degree and partial least square method. **Results** HPLC chromatogram of *Spatholobi Caulis* was established, a total of 14 common peaks were identified, and six of them were identified. The partial least square standard equation regression coefficients of peak 2 catechin, peak 3 puerarin and peak 9 daidzein were positive, positively correlated with anti-tumor activity, and VIP value was > 1.0. The verification results of active ingredients showed that catechin, puerarin and daidzein could inhibit HepG2 cell growth in a concentration dependent manner, which could be considered as the material basis of anti-HepG2 cells of *Spatholobi Caulis*. **Conclusion** Through the correlation analysis between the anti-tumor activity and the HPLC fingerprint of *Spatholobi Caulis*, this study can serve as a reference for excavating the quality markers of *Spatholobi Caulis* and the quality control of medicinal materials.

**Key words:** *Spatholobi Caulis*; fingerprint; anti-tumor; spectrum-effect relationship; catechin; puerarin; daidzein

鸡血藤为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎, 具有活血补血、调经止疼, 活络筋脉的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明鸡血

藤粗提物或者总黄酮类物质也具有显著的抗肿瘤作用<sup>[2-6]</sup>, 如鸡血藤醇提物可抗鼠肝癌 S<sub>180</sub> 活性<sup>[4]</sup>, 总黄酮类物质可不同程度地抑制肝癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>, 但

收稿日期: 2023-10-06

基金项目: 广西中医药大学博士科研启动基金项目 (2022BS009); 广西中医药大学 2023 年硕士研究生科研创新项目 (YCSY2023009); 广西自然科学基金面上项目 (2019GXNSFAA185053); 广西中医药大学校级科研项目 (2023MS014); 广西研究生联合培养基地项目 (桂学位 [2021] 6 号)

作者简介: 聂钰湘 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: 2575205467@qq.com

\*通信作者: 郭占京 (1979—), 男, 博士, 副教授, 从事中药物质基础及成分分离技术研究。E-mail: 276590311@qq.com

黄宏妙, 女, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及中药制剂研究。E-mail: hhmgoodluck@163.com

是其具体的药效物质基础并未明确。为了寻找鸡血藤抗肿瘤物质基础,王宏等<sup>[7]</sup>和富琦等<sup>[8]</sup>在发现鸡血藤黄酮类组分具有显著抗肿瘤作用的基础上,建立了富含黄酮类化合物的有效组分鸡血藤黄酮类抗肿瘤活性部位的 HPLC 指纹图谱,王妮佳<sup>[9]</sup>也基于 UPLC 色谱法建立了 8 个产地的鸡血藤鞣质类成分(抗肿瘤活性组分)的指纹图谱。但是这些研究只是采用指纹图谱阐明了鸡血藤抗肿瘤活性部位或某物质大类的化学成分组成,并未与其药效联系起来,未能直接阐明鸡血藤抗肿瘤活性具体的药效物质基础,具有一定局限性。

中药谱效关系则可以将中药指纹图谱与中药药效通过各种数据处理进行分析,筛选出与药效

密切相关的中药成分<sup>[10]</sup>。因此,本研究通过建立鸡血藤 HPLC 指纹图谱,采用灰色关联度和偏小二乘回归分析等数理统计方法,将鸡血藤指纹图谱信息与鸡血藤体外抗人肝癌 HepG2 细胞药效进行综合分析,期望筛选出鸡血藤主要抗肿瘤活性成分(群),初步揭示鸡血藤体外抗肿瘤活性的药效物质基础。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

鸡血藤药材购买于不同市场,经广西中医药大学药学院马雯芳教授鉴定为豆科植物密花豆 *S. suberectus* Dunn 的干燥藤茎。样品详细信息见表 1。

表 1 鸡血藤样品信息

Table 1 Sample information of *Spatholobi Caulis*

编号	产地	购买地点	编号	产地	购买地点
S1	中国云南	成都市荷花池药材市场	S15	越南	玉林市中药材市场
S2	中国云南	成都市荷花池药材市场	S16	越南	玉林市中药材市场
S3	中国云南	成都市荷花池药材市场	S17	中国云南	玉林市中药材市场
S4	中国云南	成都市荷花池药材市场	S18	中国云南	玉林市中药材市场
S5	中国云南	成都市荷花池药材市场	S19	中国云南	玉林市中药材市场
S6	越南	成都市荷花池药材市场	S20	中国云南	玉林市中药材市场
S7	越南	成都市荷花池药材市场	S21	中国广东	玉林市中药材市场
S8	中国广西	玉林市中药材市场	S22	老挝	玉林市中药材市场
S9	中国广西	玉林市中药材市场	S23	越南	河北省安国中药材专业市场
S10	中国广西	玉林市中药材市场	S24	越南	河北省安国中药材专业市场
S11	中国广西	玉林市中药材市场	S25	越南	河北省安国中药材专业市场
S12	中国广西	玉林市中药材市场	S26	中国云南	河北省安国中药材专业市场
S13	越南	玉林市中药材市场	S27	中国广西	河北省安国中药材专业市场
S14	越南	玉林市中药材市场			

### 1.2 试剂

对照品原儿茶酸(批号 RP190605)成都麦德生科技有限公司,质量分数 $\geq 99.99\%$ ;对照品儿茶素(批号 DST220929-047)、葛根素(批号 DSTDG000202)、大豆苷元(批号 DSTDD002001)、染料木素(批号 DSTDR000202)均购于乐美天医药德思特生物,质量分数 $\geq 98\%$ ;对照品芒柄花素(批号 PS000674)成都普思生物科技股份有限公司,质量分数 $\geq 98\%$ ;紫杉醇(批号 RL211020),质量分数 $\geq 98\%$ ,西安瑞林生物科技有限公司;二甲亚砜(DMSO)购于天津市富宇精细化工有限公司;胎牛血清(FBS)购于浙江天杭生物科技股份有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购于阿拉丁;HepG2 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

### 1.3 仪器

Waters 2998 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;CKX41SF 倒置显微镜,日本 Olympus 公司;HR1200-IIB2 生物安全柜,青岛海尔特种电器有限公司;SQP 电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;全波长酶标仪,生命技术控股有限公司;HVA-110 全自动立式高压灭菌,日本 Hirayama 公司。

## 2 方法

### 2.1 鸡血藤 HPLC 指纹图谱的建立

**2.1.1 对照品溶液配制** 精密称取原儿茶酸、儿茶素、葛根素、大豆苷元、芒柄花素、染料木素适量,用乙醇溶解,并置于容量瓶中定容,配制成一定质量浓度的对照品溶液。再分别吸取上述对照品溶液,稀释为原儿茶酸 0.063 0 mg/mL、儿茶素 0.166 5 mg/mL、葛根素 0.163 5 mg/mL、大豆苷元 0.157 5 mg/mL、芒

柄花素 0.153 0 mg/mL、染料木素 0.151 5 mg/mL 的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液配制** 取鸡血藤药材约 50 g, 以 1:50 加入 70%乙醇, 超声提取 30 min (40 Hz、240 W), 重复提取 3 次, 滤过, 合并提取液, 浓缩, 干燥, 得提取物粉末。取各批次鸡血藤提取物粉末, 以 70%乙醇制成质量浓度为 0.1 mg/mL 供试品溶液, 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜, 转移至进样瓶备用。

**2.1.3 色谱条件** ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈 (A)-0.1%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 10% A; 10~140 min, 10%~23% A; 140~160 min, 23%~27% A; 160~200 min, 27%~33% A; 200~210 min, 33%~37% A; 体积流量为 0.8 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L; 检测波长 260 nm。

**2.1.4 精密度试验** 按“2.1.2”项制备鸡血藤 (S14) 供试品溶液, 以“2.1.3”项色谱条件连续进样 6 次, 以 1 号峰为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间 RSD $\leq$ 2.43%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 2.75%

**2.1.5 重复性试验** 按“2.1.2”项平行制备 6 份鸡血藤 (S14) 供试品溶液, 以“2.1.3”项色谱条件进样, 以 1 号峰为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间 RSD $\leq$ 2.78%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 2.50%。

**2.1.6 稳定性试验** 按“2.1.2”项制备鸡血藤 (S14) 供试品溶液, 在 0、4、8、12、16、20、24 h, 以方法“2.1.3”项色谱条件进样, 以 1 号峰为参照峰 (S), 计算共有峰相对保留时间 RSD $\leq$ 2.35%, 相对峰面积 RSD $\leq$ 2.83%。

**2.1.7 指纹图谱的建立及相似度评价** 按“2.1.2”项制备 27 批鸡血藤药材供试品溶液, 以“2.1.3”项色谱条件进样, 将液相谱图以 cdf 格式导出, 用“中药指纹图谱评价系统 (2012.1 版)”打开进行数据分析。采用 SPSS 21.0 进行聚类分析, 采用 SPSS 21.0 和 SIMCA 14.1 进行主成分分析。

## 2.2 抗肿瘤活性测定

**2.2.1 样品溶液准备** 精密称取鸡血藤提取物粉末 20.0 mg, DMEM 培养基溶解, 0.22  $\mu$ m 细胞专用滤膜滤过, 用培养基稀释为不同质量浓度, 冷藏备用。

**2.2.2 细胞培养** 将 HepG2 细胞培养在添加 10% 胎牛血清、1%双抗的 DMEM 培养基中, 置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。

**2.2.3 MTT 法测定各样品的抗肿瘤活性** 取对数生长期的 HepG2 细胞制成  $1 \times 10^5$  个/mL 的单细胞

混悬液, 按照文献<sup>[11]</sup>方法测定各鸡血藤样品的细胞抑制率。将鸡血藤样品质量浓度及对应测定的肿瘤细胞抑制率导入软件 SPSS 21.0 中, 经处理可得半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)<sup>[12]</sup>。

## 2.3 谱效关系分析

**2.3.1 灰色关联度分析** 将 27 批鸡血藤提取物的抗 HepG2 细胞 IC<sub>50</sub> 值的倒数与 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积以初值法进行归一化处理, 并以 IC<sub>50</sub> 值的倒数为母序列 (Y<sub>k</sub>), 共有峰峰面积为子序 (X<sub>i</sub>), 通过公式计算参考序列与比较序列的灰色关联度<sup>[13-14]</sup>。

$$A_{ik} = (\Delta i_{kmin} + \rho \Delta i_{kmax}) + (\Delta i_{kman} + \rho \Delta i_{kmax})$$

$$\Delta i_k = |Y_k - X_i|$$

k 为样品编号, i 为共有峰编号, A<sub>ik</sub> 为关联系数,  $\rho$  为分辨系数取 0.5

**2.3.2 偏最小二乘回归分析** 以各批次鸡血藤 HPLC 指纹图谱共有峰峰面积为自变量 (X), 鸡血藤提取物抗 HepG2 细胞 IC<sub>50</sub> 值的倒数为因变量 (Y), 利用 SIMCA14.0 软件, 进行偏最小二乘回归<sup>[15]</sup>分析, 建立回归方程。

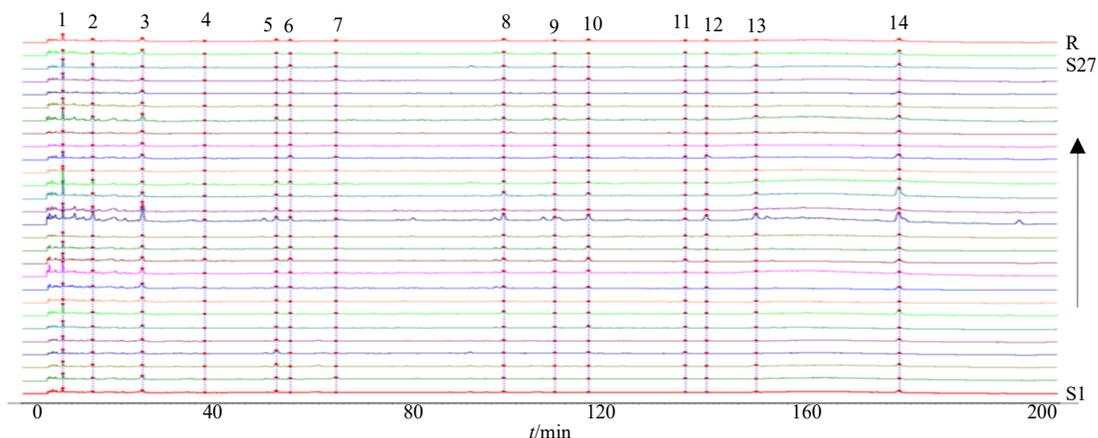
## 3 结果与分析

### 3.1 鸡血藤 HPLC 指纹图谱分析

**3.1.1 方法学考察** 鸡血藤样品在重复性、精密度、稳定性考察中, 各色谱峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均小于 3.0%, 说明该方法具有良好的可行性, 可用于建立鸡血藤的指纹图谱。

**3.1.2 鸡血藤指纹图谱的建立及共有峰指认** 用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版”27 批不同地区鸡血藤的液相谱图, 以 S1 为参照图谱, 采用平均数法, 时间窗宽度 0.1 min, 经多点校正, 生成鸡血藤 HPLC 色谱叠加图 (图 1), 得到共有峰对照图谱 (图 2-B), 共标定出 14 个共有峰; 将共有峰对照图与混合对照品 (图 2-A) 比对, 确定 1 号峰为原儿茶酸, 2 号峰为儿茶素, 3 号峰为葛根素, 9 号峰为大豆苷元, 13 号峰为染料木素, 14 号峰为芒柄花素。

**3.1.3 相似度评价** 在“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版”中得到 27 个不同地区鸡血藤相似度结果见表 2。其中来自中国广西 (S8~S12、S27)、越南 (S6、S7、S13~S16、S23~S25)、中国广东 (S21)、老挝 (S22) 的药材相似度大于 0.9, 说明这些产区的药材化学特征接近; 而来自中国云南的部分药材 (S2~S4、S19、S20) 的相似度小于 0.9, 说明该产区药材与中国广西、越南、中国广东、老挝等产区药材的化学特征存在一定的差异性。



1-原儿茶酸; 2-儿茶素; 3-葛根素; 9-大豆苷元; 13-染料木素; 14-芒柄花素。  
1-protocatechuic acid; 2-catechin; 3-puerarin; 9-daidzein; 13-genistein; 14-formononetin.

图 1 鸡血藤 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed HPLC fingerprint of *Spatholobi Caulis*

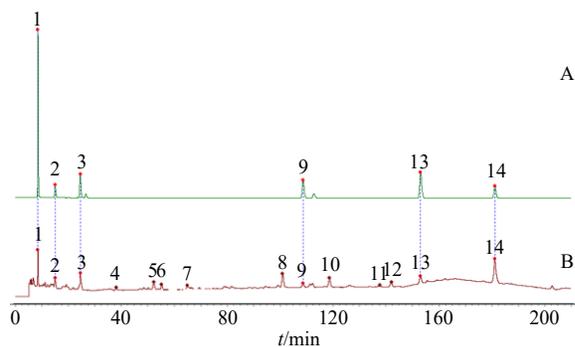


图 2 混合对照品 HPLC 图 (A) 与鸡血藤 HPLC 对照指纹图谱 (B)

Fig. 2 HPLC fingerprint of mixed standard (A) and HPLC fingerprint of *Spatholobi Caulis* (B)

3.1.4 聚类分析 在 SPSS 21.0 软件中导入 27 批鸡血藤共有峰峰面积, 采用组间联系, 以平方欧氏距离进行聚类分析, 结果见图 3。当欧式间距为 13 时,

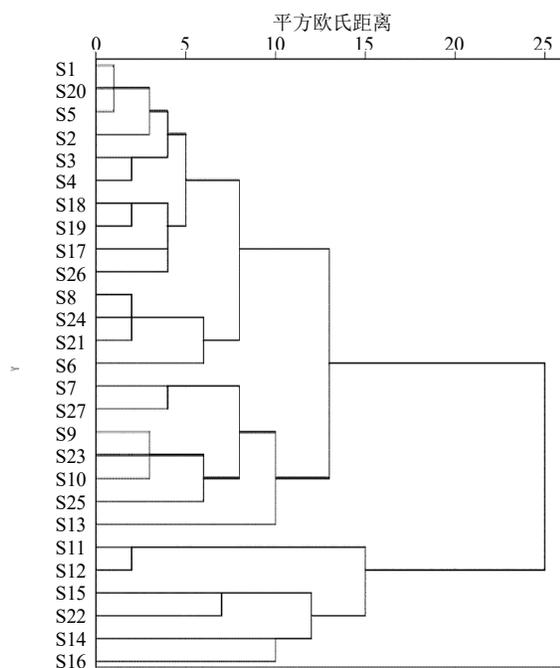


图 3 鸡血藤聚类分析树状图

Fig. 3 Clustering analysis tree diagram of *Spatholobi Caulis*

可聚为 4 类, 第 1 类: S1~S6、S8、S17~S21、S24、S26; 第 2 类: S7、S9、S10、S13、S23、S25、S27; 第 3 类: S11、S12; 第 4 类 S15、S22、S14、S16, 表明不同产地的鸡血藤药材中化学成分存在一定差异, 相同产地鸡血藤的化学成分类似, 如当欧式间距为 6 时, 中国云南产地鸡血藤聚为一类。

3.1.5 主成分分析

(1) 特征值与贡献率: 将 27 批鸡血藤中 14 个

表 2 鸡血藤样品相似度评价结果

Table 2 Results of similarity evaluation of *Spatholobi Caulis* samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.930	S10	0.951	S19	0.871
S2	0.885	S11	0.970	S20	0.757
S3	0.896	S12	0.936	S21	0.960
S4	0.820	S13	0.928	S22	0.965
S5	0.925	S14	0.942	S23	0.981
S6	0.933	S15	0.930	S24	0.976
S7	0.942	S16	0.927	S25	0.927
S8	0.926	S17	0.957	S26	0.908
S9	0.976	S18	0.956	S27	0.967

共有峰峰面积为评价指标导入 SPSS 21.0 软件, 经描述统计及标准化处理, 得到各主成分相关特征值及贡献率, 结果见表 3。以主成分特征值 > 1 为依据, 得到 3 个主成分, 第 1 主成分方差贡献率为 49.765%, 第 2 主成分方差贡献率为 14.653%, 第 3 主成分方差贡献率为 10.865%, 累积方差贡献率为 75.274, 该 3 个主成分可基本反映出鸡血藤药材成分的质量评价指标。

表 3 主成分分析特征值和贡献率

Table 3 Characteristic values and contribution rates of principal component analysis

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	6.966	49.756	49.756
2	2.051	14.653	64.409
3	1.521	10.865	75.274

(2) 成分矩阵: 通过 SPSS 21.0 软件分析得到特征值与贡献率的同时, 也得到鸡血藤共有峰。由成分矩阵见表 4。以因子载荷大于 0.5<sup>[16]</sup>分析, 主成分 1 信息主要来源于峰 1~3、5、8~14; 主成分 2

表 4 主成分载荷矩阵

Table 4 Load matrix table of principal components

共有峰	主成分 1	主成分 2	主成分 3	共有峰	主成分 1	主成分 2	主成分 3
1	0.897	0.089	-0.011	8	0.893	0.138	0.127
2	0.820	-0.360	-0.040	9	0.881	-0.053	-0.068
3	0.768	-0.175	-0.136	10	0.808	0.045	-0.212
4	0.409	0.733	-0.309	11	0.600	0.044	-0.471
5	0.865	-0.099	-0.321	12	0.549	0.062	0.590
6	0.097	0.882	-0.118	13	0.669	-0.067	0.635
7	-0.140	0.723	0.369	14	0.786	0.030	0.337

表 5 鸡血藤主成分得分和综合得分

Table 5 Principal component scores and comprehensive scores of *Spatholobi Caulis*

排序	批次	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合值	排序	批次	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合值
1	S14	7.112	1.913	0.334	5.122	15	S2	2.729	0.349	-0.046	1.865
2	S22	6.468	1.156	0.334	4.549	16	S26	2.339	0.811	0.426	1.765
3	S11	6.316	0.948	-0.265	4.321	17	S19	2.277	0.985	0.252	1.734
4	S16	5.688	0.946	0.528	4.020	18	S18	2.083	0.778	-0.142	1.508
5	S15	5.018	1.046	0.608	3.609	19	S3	2.007	0.313	0.289	1.429
6	S12	5.023	0.843	-0.254	3.448	20	S6	2.047	0.315	-0.118	1.397
7	S10	4.769	0.339	0.077	3.230	21	S4	2.026	0.254	-0.115	1.372
8	S23	3.988	0.677	0.362	2.820	22	S1	1.886	0.382	-0.129	1.302
9	S9	4.082	0.677	-0.150	2.809	23	S21	1.693	0.573	0.287	1.272
10	S17	3.600	0.445	0.214	2.497	24	S20	1.755	0.329	-0.183	1.198
11	S25	3.618	0.036	-0.127	2.381	25	S24	1.470	0.696	0.327	1.154
12	S7	3.219	0.800	0.475	2.352	26	S5	1.585	0.355	0.096	1.131
13	S27	3.089	1.131	0.621	2.351	27	S8	1.214	0.559	0.074	0.922
14	S13	2.835	1.208	0.132	2.128						

信息主要来源于峰 6、4、7; 主成分 3 信息主要来源于峰 13、12, 由此可知引起鸡血藤质量差异的原因可能是多因素导致的结果。

(3) 主成分得分与综合得分分析: 通过 SPSS 21.0 方差贡献率及成分矩阵分析, 将 27 批鸡血藤共有峰峰面积经标准化处理, 以各主成分的方差贡献率为分配系数, 计算 27 批鸡血藤各主成分得分与综合得分, 并进行排序, 样品得分越高, 表明该样品质量越好<sup>[17]</sup>。

结果显示见表 5, 主成分综合得分依次排序为 S14 > S22 > S11 > S16 > S15 > S12 > S10 > S23 > S9 > S17 > S25 > S7 > S27 > S13 > S2 > S26 > S19 > S18 > S3 > S6 > S4 > S1 > S21 > S20 > S24 > S5 > S8, 综合排名靠前大部分为越南、老挝、中国广西的鸡血藤, 与聚类分析结果相似, 说明鸡血藤药材中共有成分在含量积累上受原产地生长环境的影响, 存在组间差距。

运用 SIMCA 14.1 软件对 27 批鸡血藤药材进行主成分分析, 以 HPLC 指纹图谱中 14 个共有峰峰面积为变量, 以此构建 27 × 14 的原始数据矩阵,

绘制 27 批不同地区鸡血藤药材的 PCA 得分图。结果见图 4, 可将其分为 3 类, S14 单独为一类; S9~S12、S15~S17、S22、S23 为第 2 类, 主要为中国广西、越南、老挝; S1~S8、S13、S18~S21、S24~S27 为第 3 类。与 SPSS 主成分分析综合得分排序基本一致, 排名第 1 为第 1 类, 排名第 2~10 为第 2 类, 主要为中国广西、越南、老挝, 及个别中国云南地区 (S17), 排名第 10 以后为第 3 类。由于地理环境, 不同地区鸡血藤存在质量差异, 而同地区间可能由采摘时节不同也有所差异。

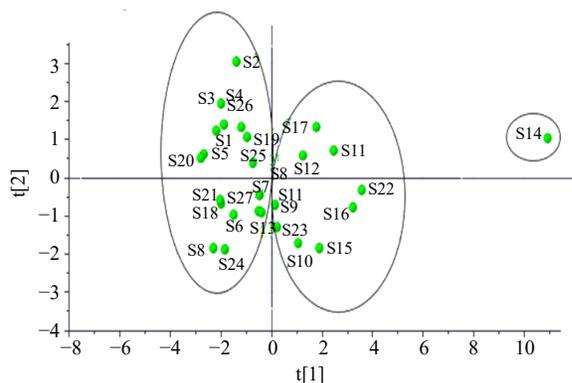


图 4 鸡血藤 PCA 图

Fig. 4 PCA of *Spatholobi Caulis*

### 3.2 鸡血藤抗肿瘤活性考察

按照上述“2.2”项步骤对 HepG2 细胞进行体外抗肿瘤活性实验, 将鸡血藤提取物对 HepG2 细胞抑制率导入 SPSS 21.0 软件中, 用 Probit 回归分析计算 IC<sub>50</sub> 值。结果见表 6, 27 批鸡血藤样品对 HepG2 细胞的抑制 IC<sub>50</sub> 值在 1.319~2.769 mg/mL, 其中 S14 对 HepG2 细胞的抑制作用最强, 其次为 S23、S24, 均为越南地区; 而 S1、S2、S26 对 HepG2 细胞的抑制作用较弱, 均来自于中国云南。初步说明鸡血藤对 HepG2 细胞有抑制作用, 不同产地鸡血藤对 HepG2 细胞抑制作用强弱有所不同。

### 3.3 鸡血藤抗肿瘤谱效关系研究

**3.3.1 灰色关联度分析** 灰色关联度计算结果见表 7, 其中特征峰 1 (原儿茶酸)、7、6、3 (葛根素)、11、12、14 (芒柄花素)、4、8、13 (染料木素) 关联度大于 0.9, 即这些峰在鸡血藤发挥抗肿瘤作用方面有主要贡献; 同时, 鸡血藤中 14 个特征峰与抗肿瘤关系总体关联度均大于 0.7<sup>[18]</sup>, 可表明鸡血藤是通过其内部的“有效组分群”共同发挥其抗肿瘤作用。

表 6 鸡血藤对 HepG2 细胞的 IC<sub>50</sub> 值

Table 6 IC<sub>50</sub> value of HepG2 cells induced by *Spatholobi Caulis*

编号	IC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	编号	IC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	编号	IC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )
S1	2.486	S10	1.969	S19	2.233
S2	2.468	S11	1.985	S20	1.954
S3	2.165	S12	2.017	S21	1.711
S4	2.769	S13	2.123	S22	1.911
S5	2.026	S14	1.319	S23	1.573
S6	1.913	S15	1.622	S24	1.601
S7	2.004	S16	1.817	S25	1.798
S8	1.730	S17	2.062	S26	2.369
S9	1.661	S18	2.057	S27	1.836

表 7 灰色关联度分析结果

Table 7 Results of grey relational analysis

特征峰	关联度	关联序	特征峰	关联度	关联序
1	0.962	1	8	0.944	9
2	0.734	14	9	0.838	12
3	0.958	4	10	0.834	13
4	0.950	8	11	0.957	5
5	0.899	11	12	0.956	6
6	0.961	3	13	0.935	10
7	0.961	2	14	0.955	7

**3.3.2 偏最小二乘回归分析** 偏最小二乘法回归分析结果如下, 图 5 为鸡血藤抗 HepG2 细胞标准回归系数图, 即 14 个特征峰抗 HepG2 细胞活性标准回归方程为:  $Y_{\text{HepG2}} = -0.052 X_1 + 0.190 X_2 + 0.193 X_3 - 0.213 X_4 + 0.078 X_5 - 0.252 X_6 - 0.224 X_7 + 0.077 X_8 + 0.122 X_9 + 0.088 X_{10} + 0.073 X_{11} + 0.099 X_{12} + 0.036 X_{13} + 0.102 X_{14}$ ; 其中回归方程系数的正、负代表各成分抗肿瘤活性的正相关或负相关。结果表明, 有 10 个共有峰回归系数为正数, 即与抗肿瘤活性呈正相关, 相关性大小依次为峰 3 (葛根素)、2 (儿茶素)、9 (大豆苷元)、14 (芒柄花素)、12、10、5、8、11、13 (染料木素); 有 4 个共有峰回归系数为负值, 即与抗肿瘤活性呈负相关, 相关性大小依次为峰 6、7、4、1 (原儿茶酸)。对特色谱峰 VIP 进行分析 (图 6), VIP 值大于 1 的特征峰有 6 个, 分别为峰 6、2、3、4、7、9。综合相关系数和 VIP 值 2 个指标, 即抗肿瘤活性呈正相关且 VIP 值大于 1 的共有峰有 3 个, 分别为 2 (儿茶素)、3 (葛根素)、9 (大豆苷元)。综合以上灰色关联度分析结果可得出 3 (葛根素)、2 (儿茶素)、9 (大豆苷元) 是与鸡血藤抗肿瘤作用的主要物质基础。

**3.3.3 单体化合物抗肿瘤活性验证** 通过灰色关

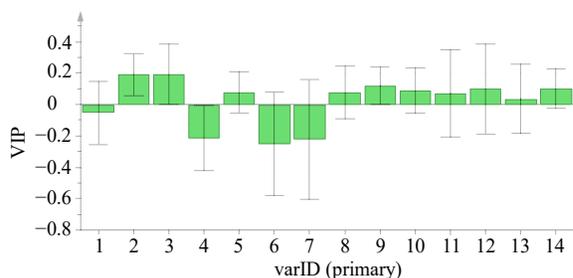


图5 抗 HepG2 细胞标准回归系数图

Fig. 5 Standard regression coefficient of anti-HepG2 cells

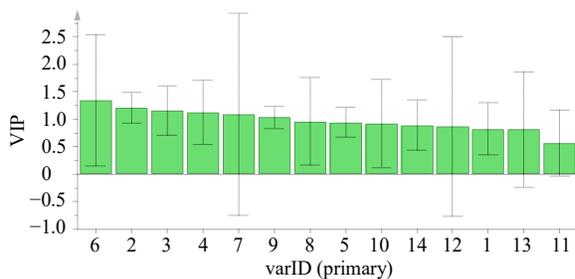


图6 抗 HepG2 细胞 VIP 贡献图

Fig. 6 VIP contribution of anti-HepG2 cells

联度与偏最小二乘法分析结果，筛选出峰 3（葛根素）、2（儿茶素）、9（大豆苷元）可能为鸡血藤抗 HepG2 细胞的物质基础。为了验证谱效分析结果的可靠性，以紫杉醇作为阳性对照，对葛根素、儿茶素、大豆苷元进行抗 HepG2 细胞活性实验。分别称取化合物适量，配制为不同浓度含药培养基，计算各单体化合物对 HepG2 肝癌细胞抑制率，结果见图 7。各单体化合物均具有抑制 HepG2 细胞生长作用；阳性对照紫杉醇的 IC<sub>50</sub> 值为 6.016 μg/mL，葛根素、儿茶素、大豆苷元 IC<sub>50</sub> 值分别为 250.73、321.43、364.30 μg/mL，虽然各单体化合物细胞抑制率均低于阳性对照药紫杉醇，但是各单体化合物对 HepG2

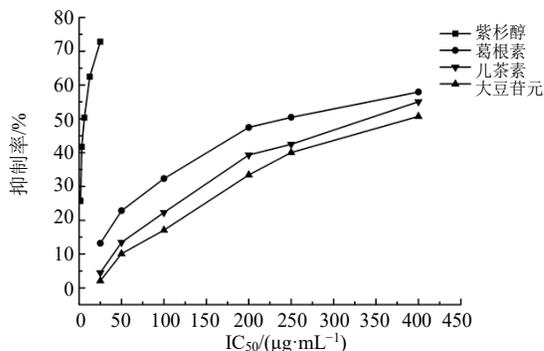


图7 紫杉醇、葛根素、儿茶素、大豆苷元对 HepG2 肝癌细胞生长抑制率

Fig. 7 Growth inhibition rates of paclitaxel, puerarin, catechin, and daidzein on HepG2 hepatoma cells

细胞的抑制率随着浓度的升高而增强，存在剂量相关关系；且在相同质量浓度下，各单体化合物对 HepG2 细胞的抑制率依次为葛根素 > 儿茶素 > 大豆苷元，体外验证结果与谱效相关性程度一致。可进一步验证葛根素、儿茶素、大豆苷元可能是鸡血藤抗肝癌活性基础物质。

## 4 讨论

### 4.1 HPLC 色谱条件优化

本实验用 Waters 2998 PDA 检测器的液相型号，在 210~400 nm 对鸡血藤醇提液全波长扫描，筛选出在 260 nm 波长下，色谱峰出峰较多，特征性强，因此，选择波长为 260 nm。同时考察流动相种类甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液，其中乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时，色谱峰分离效果较佳。进一步探究乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）洗脱比例，洗脱程序为 0~10 min，10% A；10~140 min，10%~23% A；140~160 min，23%~27% A；160~200 min，27%~33% A；200~210 min，33%~37% A 时，各色谱峰出峰时间适宜，峰型较好。

### 4.2 指纹图谱

通过 HPLC 法得到不同产区鸡血藤指纹图谱，比较相似度可发现相似度低于 0.9 的批次均来自中国云南地区；而越南、中国广西一带中有效成分相似度高，均大于 0.9；同时，鸡血藤通过聚类分析可分为 4 类，中国云南地区全部在第 1 类中，第 3 类与第 4 类主要来自越南和中国广西，与主成分分析分析相符。因此，相似度、聚类分析、主成分分析均说明不同产地间药材中有效成分组成受地理位置、生长环境、采摘时节等影响较大，该分析可为种植鸡血藤药材在选址上提供参考价值。

### 4.3 谱效关系研究

中药谱效关系主要是通过数理统计方法分析指纹图谱与药效间的潜在关系，预测和筛选处中药中的有效成分；其中，偏最小二乘回归分析是以线性关系预测有效成分的作用强弱，具有一定的误差性；灰色关联度是根据开放数据的几何曲线进行评估，将 2 种分析方法综合比较，可以得到更全面的分析<sup>[18]</sup>。基于谱效关系中灰色关联度与偏最小二乘回归分析方法，将鸡血藤 HPLC 指纹图谱共有峰与抗肿瘤活性数据通过数理统计手段进行综合评价，结果表明 2 号峰儿茶素、3 号峰葛根素、9 号峰大豆苷元偏最小二乘标准方程回归系数为正值，且 VIP

值 > 1.0; 通过对葛根素、儿茶素、大豆苷元抗 HepG2 肝癌细胞药效验证研究发现, 各单体成分均具有一定的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 250.73、321.43、364.30 μg/mL, 在一定程度上验证了谱效关系研究结果。同时, 有文献表明儿茶素可通过调控肿瘤相关蛋白、抗氧化抗炎等相关途径, 抑制肿瘤细胞活性<sup>[19-22]</sup>, 葛根素与大豆苷元属于异黄酮类物质, 可抑制肿瘤细胞周期、影响线粒体调控、基因蛋白的表达等途径发挥抗肿瘤作用<sup>[23-25]</sup>。综上所述, 可认为儿茶素、葛根素、大豆苷元是鸡血藤抗 HepG2 细胞的物质基础。

**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: 202-203.
- [2] 廖佳伟, 金晨, 陈志, 等. 鸡血藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6866-6877.
- [3] Kim H, Yi S S, Lee H K, *et al.* Antiproliferative effect of vine stem extract from *Spatholobus suberectus* Dunn on rat C6 glioma cells through regulation of ROS, mitochondrial depolarization, and P21 protein expression [J]. *Nutr Cancer*, 2018, 70(4): 605-619.
- [4] 苏华, 马雪莹, 罗茜怡, 等. 鸡血藤醇提物的提取及抗鼠肝癌 S180 活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(9): 94-97.
- [5] Wang N J, Wang J Y, Meng X S, *et al.* 3D microfluidic *in vitro* model and bioinformatics integration to study the effects of *Spatholobi Caulis* tannin in cervical cancer [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12285.
- [6] 陈浩天. 鸡血藤总黄酮类物质对肝细胞癌凋亡调控作用机制研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2018.
- [7] 王宏, 刘艺娜, 曾祖平, 等. 鸡血藤抗肿瘤活性部位 SSCE 指纹图谱的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2525-2529.
- [8] 富琦, 唐勇, 罗晓琴, 等. 鸡血藤 SSCE 体内抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1570-1573.
- [9] 王妮佳. 中药鸡血藤药效物质基础及抗宫颈癌作用机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [10] 张强, 杨宇婷. 中药谱效关系研究现状概述 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 680-683.
- [11] 赖昌威. 药对白花蛇舌草与半枝莲提取物的体外抗肿瘤活性研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [12] 顾金瑞. 基于谱效关系的欧李酚类物质抗肿瘤关键成分研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [13] 张萌, 邓家刚, 韦玮, 等. 广山楂 HPLC 指纹图谱建立及其活血化瘀作用谱效关系研究 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 601-607.
- [14] Wang Y L, Zhang Q, Yin S J, *et al.* Screening of blood-activating active components from Danshen-Honghua herbal pair by spectrum-effect relationship analysis [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 149-158.
- [15] 丘琴, 卢显兴, 阮必高, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的扁担藤抗炎谱效关系研究 [J]. 中药材, 2021, 44(2): 369-373.
- [16] 秦慧真, 林思, 谢凤凤, 等. 犁头草指纹图谱及抗炎活性谱效关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(4): 68-74.
- [17] 谢巍, 杨妮, 蒋受军. 白背叶 HPLC 特征指纹图谱及模式识别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18): 52-57.
- [18] 李真. 不同基原淫羊藿化学成分差异及谱效关系研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2023.
- [19] Liang G, Zhang S, Huang Z M, *et al.* MDR-reversing effect of two components of catechin on human hepatocellular carcinoma BEL-7404/Adr *in vitro* [J]. *Chin J Cancer*, 2004, 23(4): 401-405.
- [20] Han S G. Protective effects of EGCG through inhibition of NADPH oxidase expression in endothelial cells [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2014, 23(5): 1611-1614.
- [21] 吴育晶, 金娟, 胡姗姗, 等. 儿茶素对人肝癌细胞 HepG2 的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1598-1602.
- [22] 黄莉霞, 钟文彬, 黄树林, 等. 儿茶素单体 EGCG 与 ECG 体外抗人肝癌细胞 BEL-7402 的作用 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(4): 435-438.
- [23] 胡亚丽, 杨杰, 庞茜茜. 葛根素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡与自噬及其分子机制研究 [J]. 天津中医药, 2021, 38(11): 1472-1477.
- [24] 胡亚丽, 范玉宏, 杨杰, 等. 葛根素对肝癌细胞增殖、凋亡及对铂类敏感性的影响 [J]. 山东医药, 2021, 61(22): 27-31.
- [25] He Y, Wu X, Cao Y, *et al.* Daidzein exerts anti-tumor activity against bladder cancer cells via inhibition of FGFR3 pathway [J]. *Neoplasma*, 2016, 63(4): 523.

[责任编辑 时圣明]