

基于抗炎生物效价的淫羊藿质量评价研究

鲁宗良^{1,2,3}, 李成伟^{2,3,5}, 文金财^{2,3}, 湛小燕^{2,3}, 肖小河^{2,3*}, 柏兆方^{2,3,4*}

1. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106
2. 中国人民解放军总医院第五医学中心 全军中医药研究所, 北京 100039
3. 中国人民解放军总医院第五医学中心 肝病医学部, 北京 100039
4. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700
5. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

摘要: 目的 建立基于抗炎生物效应的淫羊藿质量评价方法。方法 采用免疫刺激性 DNA (immune-stimulatory DNA, ISD) 诱导的小鼠骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 为炎症细胞模型, 通过检测磷酸化干扰素基因刺激因子 (phosphorylated stimulator of interferon genes, p-STING)、磷酸化干扰素调节因子 3 (phosphorylated interferon regulatory factor 3, p-IRF3) 蛋白表达以及 I 型干扰素 (type I interferon, IFN- β) 表达并结合细胞活力测定, 初步验证淫羊藿的抗炎作用。以 STING 抑制剂 H151 为阳性对照药, 建立以 IFN- β 抑制率为评价指标的抗炎生物效价测定方法, 评价不同品种和批次淫羊藿样品的抗炎效价。采用高效液相色谱仪测定 5 个品种 15 批淫羊藿样品中 6 个特征成分 (双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I) 的含量, 再通过相关性分析方法探讨抗炎效应与特征成分含量之间的关联性。结果 淫羊藿提取物可以抑制环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶 (cyclic GMP-AMP synthase, cGAS) -STING 信号通路活化指标 p-STING、p-IRF3 以及 IFN- β 的表达, 证明其具有良好的抗炎效应。15 批淫羊藿的抗炎效价为 221.05~1130.50 U/mL, 不同品种的平均抗炎效价从高到低排序为箭叶淫羊藿 (951.17 U/mL)、朝鲜淫羊藿 (748.38 U/mL)、淫羊藿 (746.71 U/mL)、柔毛淫羊藿 (728.18 U/mL)、粗毛淫羊藿 (528.87 U/mL), 表明箭叶淫羊藿具有良好的抗炎生物效应, 且伪品粗毛淫羊藿比 4 个正品抗炎效价都低。相关性分析显示, 淫羊藿苷与淫羊藿抗炎效价呈显著正相关 ($r=0.540$, $P<0.05$), 说明该成分可能在抗炎活性中起主要作用。结论 建立了基于抗炎生物效价的淫羊藿质量评价方法, 其能够直接反映不同淫羊藿在抗炎方面的质量“优劣”, 为具有抗炎性质的中药质量评价提供参考。

关键词: 淫羊藿; 抗炎; 生物效价; 质量评价; 相关性分析; 双藿苷 A; 朝藿定 A; 朝藿定 B; 朝藿定 C; 淫羊藿苷; 宝藿苷 I
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)15-5519-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.15.017

Quality evaluation of *Epimedii Folium* based on anti-inflammatory biological potency

LU Zongliang^{1,2,3}, LI Chengwei^{2,3,5}, WEN Jincan^{2,3}, ZHAN Xiaoyan^{2,3}, XIAO Xiaohe^{2,3}, BAI Zhaofang^{2,3,4}

1. College of Food and Biological engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China
2. China Military Institute of Chinese Medicine, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing, 100039, China
3. Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100039, China
4. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China
5. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To establish a method for evaluating the quality of Yinyanghuo (*Epimedii Folium*) based on anti-inflammatory biological potency. **Methods** Immune-stimulatory DNA (ISD)-induced mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were used as an inflammatory cell model, and the anti-inflammatory effects of *Epimedii Folium* were preliminarily verified by detecting the

收稿日期: 2025-04-22

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302); 国家自然科学基金重点项目(U23A20519)

作者简介: 鲁宗良, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: q1263378623@163.com

*通信作者: 柏兆方, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: baizf2008@hotmail.com

肖小河, 研究员, 博士生导师, 从事临床中药学研究。E-mail: pharmacy302xxh@126.com

protein expression levels of phosphorylated stimulator of interferon genes (p-STING), phosphorylated interferon regulatory factor 3 (p-IRF3) and the expression of type I interferon (IFN- β) combined with cell viability assay. Using STING inhibitor H151 as a positive control, an anti-inflammatory biological potency assay was established with IFN- β inhibition rate as the evaluation index to evaluate the anti-inflammatory potency of *Epimedii Folium* samples of different varieties and batches. High performance liquid chromatography was used to determine the contents of six characteristic components (diphyllouside A, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, baohuoside I) in 15 batches of *Epimedii Folium* samples of five varieties, and then exploring the correlations between anti-inflammatory potency and the contents of the characteristic components by correlation analysis methods. **Results** The extract of *Epimedii Folium* could inhibit the expression levels of p-STING, p-IRF3 and IFN- β , which were the activation indexes of cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-STING signaling pathway, proving that it had a good anti-inflammatory effect. The anti-inflammatory potency of 15 batches of *Epimedii Folium* samples ranged from 221.05 to 1 130.50 U/mL, and the average anti-inflammatory potency of different varieties in order of from high to low was *Epimedium sagittatum* (951.17 U/mL), *E. koreanum* (748.38 U/mL), *E. brevicornu* (746.71 U/mL), *E. pubescens* (728.18 U/mL) and *E. acuminatum* (528.87 U/mL), which indicated that *E. sagittatum* had a good anti-inflammatory biological potency, and the counterfeit *E. acuminatum* had lower anti-inflammatory potency than the four genuine ones. Correlation analysis showed there was a significant positive correlation between icariin and the anti-inflammatory potency of *Epimedii Folium* ($r = 0.540, P < 0.05$), suggesting that this component may play a major role in the anti-inflammatory activity. **Conclusion** A method for evaluating the quality of *Epimedii Folium* based on its anti-inflammatory biological potency was established, which can directly reflect the quality of different *Epimedii Folium* in terms of anti-inflammatory “superiority or inferiority”, and provide a reference for the quality evaluation of traditional Chinese medicines with anti-inflammatory properties.

Key words: *Epimedii Folium*; anti-inflammatory; biological potency; quality evaluation; correlation analysis; diphyllouside A; epimedin A; epimedin B; epimedin C; icariin; baohuoside I

淫羊藿 *Epimedii Folium* 又名仙灵脾、三枝九叶草，系小檗科淫羊藿属多基原统称。《中国药典》2020 年版收录的法定基原包括小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai^[1]。此外，非《中国药典》收录品种如粗毛淫羊藿 *E. acuminatum* Franch. 在贵州等地也广泛应用于临床。由于不同基原淫羊藿在临床应用中存在较大治疗差异，因此建立科学的质量评价体系对保障临床疗效至关重要^[2]。现行的中药质量评价方法是借鉴化学质量控制模式所建立，其主要包括化学定性鉴别与指标成分检测，其单独存在难以全面反映整体质量，与临床的有效性、安全性联系不够紧密，不能充分体现中医药特色问题^[3]。生物效价是以药物的生物效应为基础，以生物统计为工具，运用特定的实验设计，测定药物有效性的一种方法。同时，生物效价是评价药物对生物体相关试验系的效果，评价药物有效性或毒性的方法，是推动中药质量标准化走进临床、关联疗效的新策略^[4]。

淫羊藿始记载于《神农本草经》，具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风除湿的功效。其中，祛风除湿功效的现代医学机制研究显示，其与调控自身免疫异常激活、抑制过度炎症反应密切相关^[5]。随着现

代药理学研究的深入，淫羊藿的多重生物活性得到进一步阐明。在免疫调节方面，淫羊藿及其活性成分能够双向调节免疫功能；在抗衰老和抗氧化方面，通过清除自由基、增强抗氧化酶活性等途径发挥作用；其抗肿瘤活性表现为抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡；此外，在骨骼健康领域具有显著的抗骨质疏松作用^[6-11]。有关其药理作用机制的研究是近年来研究的热点。炎症反应作为多种疾病的共同病理基础，可能是淫羊藿发挥综合疗效的关键机制之一^[12]。淫羊藿的抗炎作用与其传统“祛风除湿”功效形成了古今印证，体现了传统中药理论的科学内涵。此前的研究也表明，淫羊藿黄酮可以通过调节环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶（cyclic GMP-AMP synthase, cGAS）-干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon genes, STING）通路，调节机体免疫，抑制炎症反应^[13]。天然免疫通路 cGAS-STING 通路与炎症反应的发生具有密切联系，胞质 DNA（病毒 DNA、肿瘤来源 DNA、自身异常 DNA）刺激时，DNA 传感器 cGAS 会催化细胞质中的三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）和三磷酸鸟苷（guanosine triphosphate, GTP）合成第二信使环鸟苷酸-腺苷酸（cyclic GMP-AMP, cGAMP）。cGAMP 结合并激活 STING，触发其从内质网向高尔基体的转运。随后，STING 通过招募并激活 TANK 结合激

酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1), 促使干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 磷酸化并入核, 最终驱动 I 型干扰素 (type I interferon, IFN-β) 的表达^[14]。当用免疫刺激性 DNA (immunostimulatory DNA, ISD) 激活 cGAS-STING 通路时会造成过度的炎症反应, 促进 IFN-β 的大量释放, 抑制 IFN-β 生成是有效减轻炎症损伤的重要手段^[15]。

本研究以淫羊藿体外抗炎活性为切入点, 探索建立基于抗炎生物效价的淫羊藿质量评价方法。首先验证了淫羊藿对 ISD 刺激的 IFN-β 水平升高的抑制效果, 进而以对 IFN-β 的抑制率对标抗炎效果作为生物效价指标, 并按照生物效价检测的要求设计和优化实验条件, 初步建立基于抗炎效价测定的淫羊藿品质评价方法。同时, 对 5 个品种 15 批次淫羊藿的生物效价与特征成分含量进行相关性分析, 旨在考察淫羊藿抗炎和不同成分含量的相关度, 以期初步探明淫羊藿抗炎的药效物质基础, 为淫羊藿品质评价方法作为支撑。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 7~8 周龄, 购自斯贝福北京生物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2024-0001。取其后腿骨提取骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs)。本研究经中国人民解放军总医院第五医学中心审查, 实验动物伦理审查编号为 IACUC-2024-0010。

1.2 药材

不同品种淫羊藿共 15 批 (表 1), 包括朝鲜淫

羊藿 (S1~S3)、粗毛淫羊藿 (S4~S6)、箭叶淫羊藿 (S7~S9)、柔毛淫羊藿 (S10~S12)、淫羊藿 (S13~S15), 经解放军总医院第五医学中心肝病研究所肖小河研究员鉴定分别为朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai、粗毛淫羊藿 *E. acuminatum* Franch.、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim.、淫羊藿 *E. brevicornu* Maxim.。

1.3 药品与试剂

对照品双藜苷 A (批号 24012304)、朝藜定 A (批号 24012904)、朝藜定 B (批号 24012902)、朝藜定 C (批号 23111601)、淫羊藿苷 (批号 23011004)、宝藜苷 I (批号 24010203) 购自成都格利普生物科技有限公司, 质量分数均 ≥ 98%; DMEM 培养基 (批号 PYG0073)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 PYG0040) 购自武汉博士德生物有限公司; 胎牛血清 (批号 C04001-500) 购自上海逍鹏生物科技有限公司; PBS 缓冲液 (批号 CC008) 购自北京中科创腾科技有限公司; 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%, 批号 CC012)、Opti-MEM 培养基 (批号 CT007.500) 购自中科迈晨科技有限责任公司; CCK-8 试剂 (批号 HY-K0301)、STING 抑制剂 H151 (批号 HY-112693)、RT Master Mix For qPCR (批号 HY-K0510A)、集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, 批号 HY-P7085) 购自美国 MCE 公司; IFN-β ELISA 试剂盒 (批号 luex-mifnbv2) 购自法国 InvivoGen 公司; p-IRF3 抗体 (GTX96691) 购自美国 Gentex 公司; IRF3 抗体 (批号 11312-1-AP)、STING 抗体 (批号 19851-1-AP)、热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 抗体 (批号 13171-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司; ISD 为异常双链 DNA 序列, 引物序列由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

1.4 仪器

Waters Arc HPLC 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); SQP-QUINTIX125D-1CN 型十万分之一分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪、HERAcell vios 160i 恒温二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Synergy H1 型多功能酶标仪 (美国博腾有限公司); JJT1300 型生物超净工作台 (北京冠鹏净化设备有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); OV-200 型台式真空冷冻

表 1 15 批淫羊藿信息

Table 1 Information of 15 batches of *Epimedium Folium*

编号	样品	产地
S1	朝鲜淫羊藿	吉林
S2	朝鲜淫羊藿	吉林
S3	朝鲜淫羊藿	吉林
S4	粗毛淫羊藿	贵州
S5	粗毛淫羊藿	贵州
S6	粗毛淫羊藿	贵州
S7	箭叶淫羊藿	河南
S8	箭叶淫羊藿	河南
S9	箭叶淫羊藿	河南
S10	柔毛淫羊藿	四川
S11	柔毛淫羊藿	四川
S12	柔毛淫羊藿	四川
S13	淫羊藿	陕西
S14	淫羊藿	陕西
S15	淫羊藿	陕西

离心浓缩仪(北京吉艾姆科技有限公司); SN510C 型立式压力蒸汽灭菌器(重庆雅马拓科技有限公司); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)系统、TC10 型自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司); 3-18k 型台式冷冻离心机(美国 Sigma 公司); GL-802B 小型真空泵(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); OZ17581 型、OZ13247 型、OZ05171 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司); SK-R1807-S 型摇床(美国 Scilogex 公司); BCD-568WDPF 型对开门冰箱、DW-86L728J 型超低温冰箱(海尔集团公司)。

2 方法

2.1 淫羊藿提取物对 ISD 诱导的小鼠原代巨噬细胞 cGAS-STING 通路的影响

2.1.1 BMDMs 的提取方法 C57BL/6J 小鼠麻醉后处死, 于 75%乙醇中浸泡, 用剪刀剪去小鼠大腿附近的皮毛, 将股骨完全剥离, 留下小腿和膝关节, 用无菌纱布分离表面上的筋膜和肌肉, 将膝关节掰断后暴露出骨髓腔, 用注射器吸取预热的 DMEM 培养基, 在 50 mL 离心管中冲洗骨髓腔, 重复 3 次将骨髓细胞冲洗完全, 加入 25 ng/mL 的 M-CSF, 吹匀后置于细胞皿中进行培养。3 d 后往培养皿中加入含 M-CSF 的培养基, 继续培养 2 d 后可顺利分化为骨髓巨噬细胞, 用于后续的实验。

2.1.2 淫羊藿给药溶液的配制 取适量 S9 箭叶淫羊藿, 用 70%乙醇回流提取, 将提取液冷冻干燥至恒定质量, 于 -20 °C 保存, 备用。给药时, 加入 0.1% DMSO 助溶, 用 Opti-MEM 培养基将淫羊藿冻干粉稀释成高质量浓度的母液, 将母液梯度稀释得到 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL 的淫羊藿溶液。

2.1.3 CCK-8 法检测细胞活力 BMDMs 以 1.1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 0.1 mL, 细胞贴壁完全后, 加入含不同质量浓度(0.125、0.250、0.500、1.000、2.000 mg/mL) 淫羊藿溶液的 DMEM 完全培养基, 另设置对照组加入不含药物的培养基。于 CO₂ 细胞培养箱培养 12 h, 弃去培养基, 避光加入 CCK-8 溶液(CCK-8 试剂-培养基=1:10) 66 μ L, 放入细胞培养箱孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

2.1.4 ISD 诱导 BMDMs 模型的建立与给药 BMDMs 以 1.1×10^6 个/mL 接种于 24 孔板中, 每孔 0.5 mL。设置对照组、模型组和淫羊藿(0.250、0.500、

1.000 mg/mL) 组。细胞贴壁完全后, 弃去培养基, 给药组分别加入含不同质量浓度淫羊藿溶液的 Opti-MEM 培养基, 对照组和模型组加入 Opti-MEM 培养基, 于细胞培养箱孵育 1 h; 模型组和给药组加入含 ISD (2.5 μ g/mL) 的 Opti-MEM 培养基, 对照组加入 Opti-MEM 培养基, 于细胞培养箱孵育 2 h, 于显微镜下观察细胞形态, 收集细胞。

2.1.5 Western blotting 检测 p-IRF3、IRF3、p-STING、STING 蛋白表达 加入裂解液提取蛋白, 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, 封闭后孵育相应抗体, 洗涤后孵育二抗, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 并对条带灰度值进行分析。

2.1.6 qRT-PCR 检测 IFN- β mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取细胞中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因相对表达量。引物序列: IFN- β 上游引物 5'-TCCGAGCAGAGATCTTCAGGAA-3', 下游引物 5'-TGCAACCACCACTCATTCTGAG-3'; ISD 上游引物 5'-TACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACA-3', 下游引物 5'-TGTAGATCATGTACAGATCAGTCATAGATCACTAGTAGATCTGTA-3'。

2.1.7 ELISA 检测细胞上清液中 IFN- β 水平 按照试剂盒说明书测定细胞上清液中 IFN- β 水平。

2.2 淫羊藿抗炎生物效价的检测

2.2.1 溶液的制备

(1) 供试品溶液的制备: 取淫羊藿 S1~S15, 按“2.1.2”项下方法制备提取物冻干粉, 用 Opti-MEM 培养基配制成高质量浓度的母液, 加入 0.1% DMSO 助溶, 用梯度稀释法稀释成 1.0、0.5 mg/mL 的淫羊藿溶液。

(2) 参照物溶液的制备: 精密称取 1.00 mg 阳性对照药 H151, 加入 0.358 0 mL DMSO 溶解, 制备为 10 mmol/L 的储备液, 使用时, 再将其稀释相应的倍数。

2.2.2 生物效价的标化 IFN- β 是 cGAS-STING 通路活化的终产物, 利用 ISD 激活 cGAS-STING 通路导致 IFN- β 释放。故采用 ELISA 法检测 IFN- β 的表达量, 来表征淫羊藿的抗炎生物效价。

以 H151 为阳性对照参照物, 使用 BS200 生物统计软件, 选用量平行线(2.2)法对淫羊藿抑制 BMDMs 中 cGAS-STING 通路异常活化后分泌 IFN-

β 量的效价值进行标化。定义 H151 的生物效价为 100 U/mL, 将抑制率和相应给药质量浓度输入效价计算软件, 得到淫羊藿的抗炎生物效价。

2.2.3 检测方法 设置对照组、模型组、阳性药组和淫羊藿组, 弃去 24 孔板内的 DMEM 培养基, 淫羊藿组分别加入不同质量浓度的淫羊藿溶液 (S1~S15), 阳性药组加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 H151 溶液, 对照组、模型组加入等体积的 Opti-MEM 培养基, 于细胞培养箱中孵育 1 h 后, 模型组、阳性药组和淫羊藿组加入 ISD 刺激, 于细胞培养箱中孵育 8 h。观察细胞形态, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定 IFN- β 水平。

2.2.4 基于抗炎生物效价检测的方法学研究

(1) 可靠性检验: 经量效关系考察, 条件优化后, 选用剂间比为 1:0.5 的低、高质量浓度作为淫羊藿抗炎生物效价测定浓度。使用 BS200 生物统计软件, 选用量平行线 (2.2) 法, 输入 T 估计效价为 100 U/mL, T 的剂量为 10 μmol , S 的最大剂量为 1 mg/mL, 剂间比为 1:0.5, 并输入低、高质量浓度供试品溶液和参照液溶液的抑制率, 计算得到可靠性检验结果。

(2) 精密度考察: 取同一批淫羊藿供试品溶液, 按照上述方法重复进行 6 次测定, 计算得到平均效价和 RSD 值。

(3) 中间精密度考察: 取同一批淫羊藿供试品溶液, 实验室 2 名实验员在不同时间段按照上述方法分别重复进行 3 次测定, 计算得到平均效价和 RSD 值。

(4) 重复性考察: 取同一批次淫羊藿供试品 6 份, 分别制备供试品溶液, 按照上述方法测定, 计算得到平均效价和 RSD 值。

2.3 淫羊藿特征成分含量测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil 100-5-C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 15%~26% A; 5~30 min, 26%~28% A; 30~50 min, 28%~70% A; 50~50.1 min, 70%~100% A; 50.1~55 min, 100% A; 55~55.1 min, 100%~15% A; 55.1~60 min, 15% A。检测波长 270 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL 。

2.3.2 溶液的制备

(1) 混合对照品溶液的制备: 精密称取双藜苷 A、朝藜定 A、朝藜定 B、朝藜定 C、淫羊藿苷、宝

藜苷 I 对照品 10.15、12.18、10.83、31.31、15.47、10.70 g, 先用少量 DMSO 溶解, 再加稀乙醇定容至对应的 25、25、5、5、5、25 mL 量瓶, 作为储备液。精密移取对照品储备液双藜苷 A 0.8 mL、朝藜定 A 2.5 mL、朝藜定 B 2 mL、朝藜定 C 2.5 mL、淫羊藿苷 1.6 mL、宝藜苷 I 10 mL, 至 25 mL 量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得到混合对照品溶液。同时, 精密量取混合对照品溶液 2 mL、1 mL、1 mL、1 mL、60 μL 至相对应 5、5、10、20、20 mL 量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得不同浓度的混合对照品稀释液。

(2) 供试品溶液的制备: 精密称取淫羊藿供试品约 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.3 含量测定方法学考察

(1) 线性关系考察: 分别吸取上述 5 个不同质量浓度的混合对照品溶液稀释液及混合对照品溶液各 10 μL , 按“2.3.1”项下条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (y), 对照品质量浓度为横坐标 (x), 绘制标准曲线。

(2) 精密度试验: 取混合对照品溶液重复进样 6 次, 进样量 10 μL , 按“2.3.1”项下条件测定, 计算 RSD。

(3) 重复性试验: 按“2.3.2”项下方法平行制样 6 份淫羊藿 S13 供试品溶液, 分别吸取 6 个供试品溶液各 10 μL , 按“2.3.1”项下条件测定每份供试品的含量, 计算 RSD。

(4) 稳定性试验: 按“2.3.2”项下方法制备淫羊藿 S13 供试品溶液, 在 0、6、12、24、48 h 下, 按“2.3.1”项下条件测定, 计算 RSD。

(5) 加样回收率试验: 精密移取对照品储备液双藜苷 A 0.8 mL、朝藜定 A 3 mL、朝藜定 B 1 mL、朝藜定 C 2.2 mL、淫羊藿苷 0.8 mL、宝藜苷 I 0.3 mL 至 100 mL 量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为加标溶液。精密称取淫羊藿 S13 约 0.1 g, 分别精密加入 10 mL 加标溶液, 精密加入稀乙醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得加标样溶液。平行制样 6 份, 分别吸取 6 个加标样溶液各 10 μL , 按色谱条件方法检测, 计算回收率。

2.3.4 淫羊藿特征成分含量测定 按“2.3.2”项下制备 15 批淫羊藿供试品溶液,按“2.3.1”下色谱条件检测,记录不同批次淫羊藿色谱图,计算得到供试品中各成分的含量。

2.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 和 Office Excel 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间采用单因素方差分析。使用 SPSS 27.0 软件的双变量相关方法,测定淫羊藿抗炎生物效价与双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 之间的关系,以皮尔斯相关系数 (r) 表示。

3 结果

3.1 淫羊藿提取物抑制 ISD 诱导的小鼠原代巨噬细胞 cGAS-STING 通路

如图 1-A 所示,0.125~2.000 mg/mL 淫羊藿提取物对 BMDMs 活力无明显影响,故后续选取 0.25、0.50、1.00 mg/mL 淫羊藿提取物进行实验。利用 ISD 构建 BMDMs 细胞 cGAS-STING 通路活化模型,利用 Western blotting 检测 cGAS-STING 通路相关蛋白表达情况,结果显示,与模型组比较,各给药组

IRF3 和 STING 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.001$, 图 1-B~F),且呈剂量相关性。利用 ELISA 试剂盒检测 IFN- β 水平,结果显示,与模型组比较,0.50、1.00 mg/mL 淫羊藿提取物显著抑制 IFN- β 的分泌 ($P < 0.001$, 图 1-G),且呈剂量相关性。通过 qRT-PCR 检测 IFN- β 的 mRNA 表达,结果显示,与模型组比较,淫羊藿提取物显著抑制 IFN- β 的 mRNA 表达 ($P < 0.001$, 图 1-H),且呈剂量相关性。

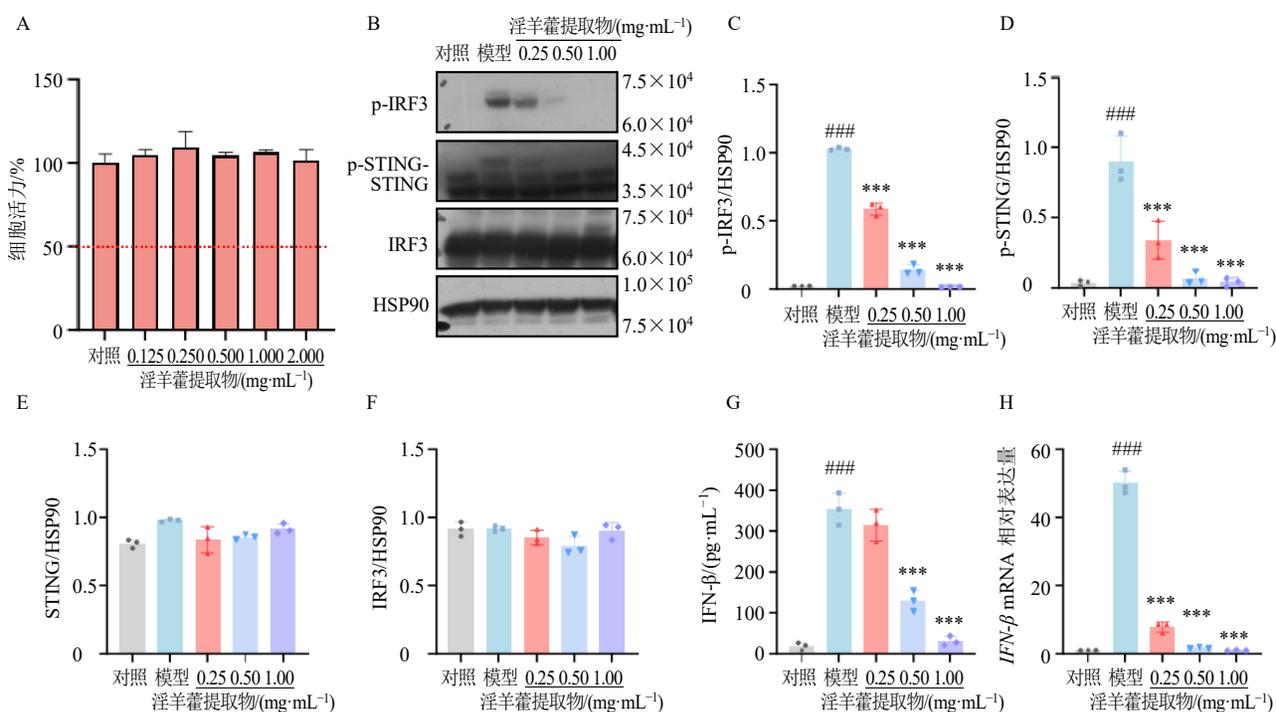
3.2 淫羊藿生物效价检测

3.2.1 方法学研究

(1) 可靠性检验:结果表明,回归项差异显著 ($P < 0.01$),质量浓度的增加与 IFN- β 抑制率呈正向关系。偏离平行不显著,参照物和供试品的剂量曲线呈现平行直线的关系。说明该方法较为可靠。

(2) 精密度考察:结果表明,6 次测定的抗炎效价分别为 845.43、962.73、1 059.10、963.64、1 091.10、1 098.50 U/mL,平均效价为 1 003.42 U/mL, RSD 值为 9.77%,表明精密度良好。

(3) 中间精密度考察:结果表明,6 次测定的抗炎效价分别为 908.82、908.82、952.25、806.19、



A-CCK-8 检测细胞活力; B~F-Western blotting 检测 p-IRF3、p-STING、STING、IRF3 蛋白表达; G-ELISA 检测细胞上清液中 IFN- β 水平; H-qRT-PCR 检测 IFN- β mRNA 表达; 与对照组比较:### $P < 0.001$; 与模型组比较:*** $P < 0.001$ 。

A-cell viability detected by CCK-8; B~F-expression of p-IRF3, IRF3, p-STING and STING proteins detected by Western blotting; G-level of IFN- β in supernatant of cells detected by ELISA; H-expression of IFN- β mRNA detected by qRT-PCR; ### $P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图 1 淫羊藿提取物对 ISD 诱导的小鼠原代巨噬细胞 cGAS-STING 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of *Epimedium Folium* extract on cGAS-STING pathway of ISD-induced BMDMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

964.58、922.56 U/mL，平均效价为 910.54 U/mL，RSD 值为 6.15%，表明中间精密度良好。

(4) 重复性考察：6 份供试品的溶液的抗炎效价为 1 056.00、972.66、1 030.60、1 054.80、1 115.20、1 057.60 U/mL，平均效价为 1049.31 U/mL，RSD 值为 4.45%，表明重复性良好。

3.2.2 淫羊藿生物效价检测分析 淫羊藿的抗炎生物效价结果见表 2，朝鲜淫羊藿 (S1~S3) 的生物效价在 477.71~965.20 U/mL，粗毛淫羊藿 (S4~S6) 的生物效价在 221.05~923.42 U/mL，箭叶淫羊藿 (S7~S9) 的生物效价在 843.88~1 130.50 U/mL，

柔毛淫羊藿 (S10~S12) 的生物效价在 673.62~764.71 U/mL，淫羊藿 (S13~S15) 的生物效价在 670.39~859.52 U/mL。箭叶淫羊藿平均生物效价最高 (951.17 U/mL)，柔毛淫羊藿的生物效价最稳定 (RSD=6.60%)，伪品粗毛淫羊藿生物效价比 4 个正品都低。

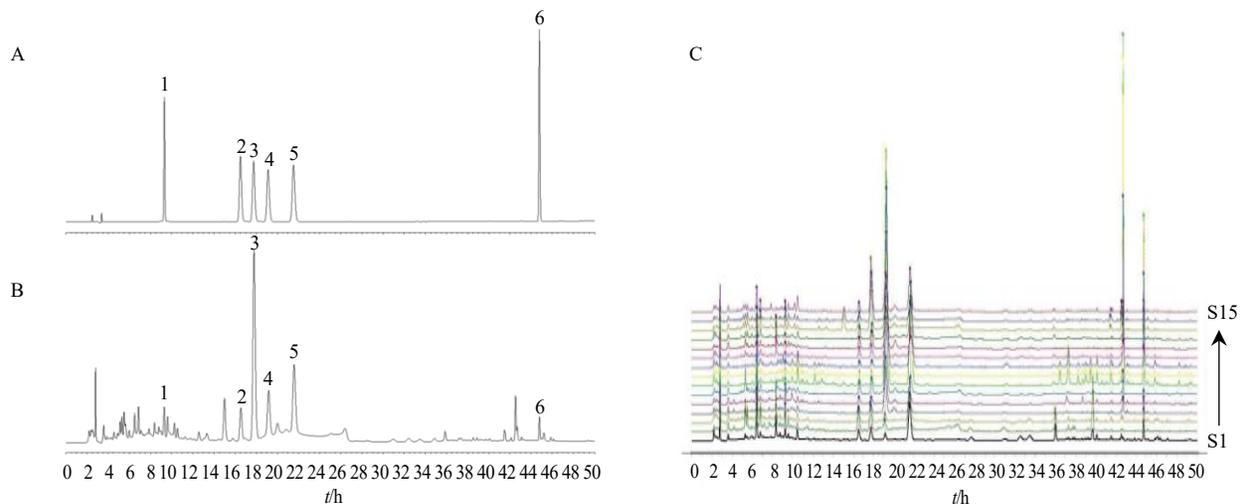
3.3 淫羊藿特征成分含量测定

3.3.1 淫羊藿 HPLC 色谱图 混合对照品色谱图见图 2-A，淫羊藿 S15 色谱图见图 2-B，可观察到 6 种特征成分所对应的峰。5 个品种 15 批淫羊藿色谱图见图 2-C，可见不同品种淫羊藿含量差异较大。

表 2 15 批淫羊藿样本的效价

Table 2 Potency of 15 batches of *Epimedii Folium* samples

批号	估计效价/(U·mL ⁻¹)	可信限率/%	效价/(U·mL ⁻¹)	效价均值/(U·mL ⁻¹)	效价RSD/%
S1	100	35.491	802.23	748.38	33.16
S2	100	31.931	965.20		
S3	100	51.219	477.71		
S4	100	742.110	442.14	528.87	67.90
S5	100	22.631	923.42		
S6	100	242.550	221.05		
S7	100	29.490	1130.50	951.17	16.43
S8	100	55.068	879.14		
S9	100	73.456	843.88		
S10	100	37.725	746.71	728.18	6.60
S11	100	22.501	673.62		
S12	100	53.707	764.20		
S13	100	48.971	670.39	746.71	13.35
S14	100	175.870	710.22		
S15	100	35.349	859.52		



A-混合对照品；B-淫羊藿 S15 样品；C-15 批淫羊藿色谱图；1-双藜苷 A；2-朝藜定 A；3-朝藜定 B；4-朝藜定 C；5-淫羊藿苷；6-宝藜苷 I。
A-mixed specimens; B-*Epimedii Folium* S15 samples; C-chromatograms of 15 batches of *Epimedii Folium*; 1-diphyllouside A; 2-epimedin A; 3-epimedin B; 4-epimedin C; 5-icariin; 6-baohuoside I.

图 2 对照品和 15 批淫羊藿的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of reference substance and 15 batches of *Epimedii Folium*

3.3.2 线性及线性范围考察 如表 3 所示, 双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 在一定质量浓度范围内的线性关系较好, R^2 均大于 0.999。

3.3.3 精密度试验 结果表明, 双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.108%、0.802%、0.054%、0.064%、0.058%、0.063%, 表明精密度良好。

3.3.4 重复性试验 结果表明, 双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 质量分数的 RSD 值分别为 2.85%、0.78%、1.21%、0.66%、1.15%、2.81%, 表明重复性良好。

3.3.5 稳定性试验 结果表明, 双藿苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 峰面积的 RSD 分别为 0.750%、0.392%、0.769%、0.233%、0.730%、1.334%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

3.3.6 加样回收率试验 结果表明, 双藿苷 A、朝

藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的回收率在 92.2%~106.1%, RSD 分别为 3.91%、3.13%、1.91%、1.42%、1.42%、3.50%, 表明方法可靠。

3.3.7 淫羊藿特征成分含量测定结果 如表 4 所示, 同一品种的同一种成分存在较大的差异, 如柔毛淫羊藿 S12 中宝藿苷 I 的质量分数是柔毛淫羊藿 S11 的 16 倍; 不同品种的同一种成分也存在较大的差异, 如淫羊藿 S15 中朝藿定 B 的质量分数是箭叶淫羊藿 S7 的 15 倍。

3.4 相关性分析

淫羊藿抗炎生物效价与特征成分之间的关系见表 5, 仅淫羊藿苷与淫羊藿抗炎生物效价呈显著正相关 ($r=0.540, P=0.038$)。朝藿定 A 与抗炎生物效价呈负相关, 双藿苷 A、朝藿定 B、朝藿定 C、宝藿苷 I 与抗炎生物效价呈正相关, 但无统计学差异, 其中宝藿苷 I 可能限于批次数量问题, 其在淫羊藿抗炎生物效应中也可能发挥着重要作用。

表 3 6 个成分的线性方程及线性范围

Table 3 Linear equations and linear ranges for six components

成分	线性方程	R^2	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
双藿苷A	$y=17\ 581\ 889.408\ 9x+306.191\ 9$	0.999 7	0.000 039~0.012 000
朝藿定A	$y=17\ 791\ 356.014\ 2x+153.989\ 7$	0.999 7	0.000 150~0.047 000
朝藿定B	$y=18\ 381\ 145.859\ 0x+3\ 174.568\ 9$	0.999 7	0.000 520~0.170 000
朝藿定C	$y=17\ 512\ 684.355\ 7x+18\ 766.309\ 4$	0.999 7	0.001 900~0.610 000
淫羊藿苷	$y=21\ 306\ 902.335\ 7x+3\ 636.645\ 8$	0.999 7	0.000 600~0.190 000
宝藿苷I	$y=27\ 448\ 133.780\ 2x+8\ 374.742\ 7$	0.999 7	0.000 520~0.170 000

表 4 15 批淫羊藿样品中 6 种特征成分的含量

Table 4 Contents of six characteristic components in 15 batches of *Epimedii Folium* samples

批号	称样量/g	质量分数/%					
		双藿苷A	朝藿定A	朝藿定B	朝藿定C	淫羊藿苷	宝藿苷I
S1	0.213 20	0.050	0.119	0.152	0.067	0.458	0.069
S2	0.210 87	0.067	0.254	0.362	0.111	0.465	0.010
S3	0.217 49	0.036	0.150	0.202	0.090	0.522	0.078
S4	0.219 50	0.031	0.075	0.092	0.609	0.109	0.011
S5	0.213 64	0.082	0.078	0.074	0.654	0.096	0.023
S6	0.209 66	0.035	0.140	0.198	1.096	0.207	0.012
S7	0.204 91	0.020	0.055	0.064	3.518	1.346	0.668
S8	0.202 34	0.023	0.055	0.064	3.410	1.275	0.625
S9	0.209 80	0.016	0.063	0.074	2.611	1.111	0.353
S10	0.208 52	0.026	0.124	0.163	1.186	0.369	0.044
S11	0.205 02	0.029	0.143	0.228	1.067	0.146	0.003
S12	0.217 80	0.026	0.145	0.192	1.473	0.509	0.048
S13	0.207 63	0.077	0.104	0.635	0.172	0.207	0.034
S14	0.203 62	0.054	0.110	0.518	0.549	0.554	0.040
S15	0.202 54	0.074	0.149	0.969	0.247	0.345	0.031

表5 淫羊藿抗炎效价与6种特征成分相关性分析
Table 5 Correlation analysis of anti-inflammatory potency of *Epimedium Folium* with six characteristic components

成分	<i>r</i>	<i>P</i> 值
双藜苷A	0.131	0.640 4
朝藜定A	-0.115	0.683 8
朝藜定B	0.009	0.975 3
朝藜定C	0.393	0.146 9
淫羊藿苷	0.540*	0.037 9
宝藜苷I	0.513	0.050 4

**P*<0.05.

4 讨论

本研究首先通过细胞实验,证明了淫羊藿提取物能够抑制ISD刺激cGAS-STING通路诱导的IFN-β产生,这一结果从现代分子生物学角度为《本草纲目》所载“祛风除湿”的传统功效提供了科学阐释,提示其可能通过调控固有免疫应答来缓解过度炎症反应。该机制与文献报道的STING通路在自身免疫病中的关键作用也相契合^[16]。

本研究通过对5个品种15批次淫羊藿样品的系统分析,揭示了其抗炎生物效价的显著差异特征。研究结果显示,不同品种间的抗炎效价存在明显梯度差异:箭叶淫羊藿以951.17 U/mL的平均效价位居首位,显著高于朝鲜淫羊藿(748.38 U/mL)、淫羊藿(746.71 U/mL)、柔毛淫羊藿(728.18 U/mL)和粗毛淫羊藿(528.87 U/mL)。特别值得关注的是,箭叶淫羊藿不仅整体表现最优,其单批次最高效价S7(1 130.50 U/mL)较最低效价的粗毛淫羊藿S6(221.05 U/mL)提升了约5.1倍,且该品种的相对标准偏差较低(RSD=16.43%),充分展现了其高效价与稳定性的双重优势。进一步分析发现,抗炎效价的差异不仅存在于品种间,同一品种内也呈现显著波动。如粗毛淫羊藿S5(923.42 U/mL)与粗毛淫羊藿S6(221.05 U/mL)间存在4.2倍的效价差异,这个现象提示除种间差异外,可能与地理分布、生长期、栽培条件等种内变异因素有关^[17]。另外,还测定了淫羊藿抗炎生物效价与其成分双藜苷A、朝藜定A、朝藜定B、朝藜定C、淫羊藿苷、宝藜苷I的相关性,结果表明淫羊藿苷与抗炎生物效价显著正相关(*r*=0.540, *P*<0.05)。同时淫羊藿苷作为淫羊藿中的主要活性成分,其抗炎作用得到了广泛的研究,研究表明其可通过抑制核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)信号通路,降低炎症因子的表达,也可通过调控丝裂原活化蛋白激酶

(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,抑制p38、Janus激酶(Janus kinase, JNK)和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)磷酸化,阻断炎症级联反应^[18-19]。综上,淫羊藿苷可能是淫羊藿抗炎的关键质量标志物。以上发现为淫羊藿的品种筛选和质量控制提供了科学依据。此外,本研究存在一定的局限性:(1)样本方面,仅覆盖5个品种共15个批次样本,后续需要扩大样本数来验证结论的普适性;(2)成分方面,仅检测6种特征成分,可能还存在其他未检成分与之相关,后续可增加其他成分验证抗炎效应;(3)当前抗炎评价体系基于IFN-β抑制模型,后续可以整合肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等多靶点检测进行多维验证;(4)仅从抑制干扰素角度进行了抗炎生物评价,其他功效相关评价还待进一步研究。

针对淫羊藿多基原物种特性及成分复杂等因素导致的药效异质性现象,建立科学完善的质量评价体系具有重要现实意义。现行的质量控制体系中,常规的性状和理化检验有助于判定药物的“真伪”,但是不能将中药和临床紧密联系起来。而生物评价重点突出药材的“优劣”,更能够直接关切临床疗效^[20]。需要强调的是,生物评价并非取代传统方法,而是在化学分析和常规检定确立物质基础的前提下,构建“化学-生物”双维度评价模式,弥补现有体系对“优劣”评判的不足。本研究利用中药质量生物效价方法,以淫羊藿为模式药,建立了基于抗炎生物效价的淫羊藿质量评价方法,初步证实了不同来源淫羊藿在抗炎生物效价方面存在一定差异,为淫羊藿的临床精准用药和质量生物评价标准制定提供基础。

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: 340.
- [2] 王丹, 贾德贤, 李真真, 等. 淫羊藿的安全性评价与风险控制措施探讨[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1715-1723.
- [3] 张萌, 封亮, 贾晓斌. 基于生物活性与效应基准的中药质量评价技术发展现状与展望[J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2234-2239.
- [4] 肖小河, 王伽伯, 鄢丹. 生物评价在中药质量标准化中的研究与应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化,

- 2014, 16(3): 514-518.
- [5] 张利, 李佳莉, 高苑, 等. 淫羊藿素的药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(17): 6069-6077.
- [6] Gao J L, Xiang S Y, Wei X, *et al.* Icaritin promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells through regulating sclerostin and activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6666836.
- [7] Chen F J, Liu B, Wu Q, *et al.* Icaritin delays brain aging in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) model via inhibiting autophagy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 369(1): 121-128.
- [8] Khezri M R, Ghasemnejad-Berenji M. Icaritin: A potential neuroprotective agent in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(10): 2954-2962.
- [9] Hou M T, Li H, He T T, *et al.* Icaritin reduces breast cancer proliferation, apoptosis, invasion, and metastasis probably through inhibiting IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(5): 499-513.
- [10] Bai L, Liu Y P, Zhang X H, *et al.* Osteoporosis remission via an anti-inflammatory effect by icaritin activated autophagy [J]. *Biomaterials*, 2023, 297: 122125.
- [11] Su B F, Ye H, You X H, *et al.* Icaritin alleviates murine lupus nephritis via inhibiting NF- κ B activation pathway and NLRP3 inflammasome [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 26-32.
- [12] 梁锋, 吴仪, 沈思远, 等. NLRP3 炎症小体激活在关节炎性疾病中的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2025, 38(1): 155-160.
- [13] Wang Y, Xu G, Wen J C, *et al.* Flavonoid extracted from *Epimedium attenuate* cGAS-STING-mediated diseases by targeting the formation of functional STING signalosome [J]. *Immunology*, 2024, 172(2): 295-312.
- [14] Zhang C G, Shang G J, Gui X, *et al.* Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1 [J]. *Nature*, 2019, 567(7748): 394-398.
- [15] 李文欣, 张贺峰, 谢作权, 等. cGAS-STING 通路异常激活及其抑制剂在免疫和炎症疾病中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(11): 2001-2005.
- [16] Decout A, Katz J D, Venkatraman S, *et al.* The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(9): 548-569.
- [17] 杨钰颖, 苗水, 李雯婷, 等. 植物代谢组学在根及根茎类中药材中的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6856-6865.
- [18] 杨涛. 淫羊藿苷抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善 LPS 诱导的急性炎症性肝损伤作用及机制研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2023.
- [19] 闫斌. 槲皮素、齐墩果酸和淫羊藿苷及其配伍对高糖培养 SD 大鼠海马神经元凋亡及 p38MAPK、JNK 信号通路影响的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [20] 李寒冰, 鄢丹, 武彦舒, 等. 基于抗病毒活性检测的板蓝根质量生物评价方法及优化研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1560-1565.

[责任编辑 李亚楠]