

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220091

· 论 著 ·

金茵利胆胶囊的体外抗炎活性评价及其谱效关系

曹 凡¹, 宋忠兴², 陈 琳^{2*}, 唐志书^{2,3*}, 倪 健⁴, 张德柱⁵

1. 陕西中医药大学药学院, 西安 712046

2. 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西中医药大学, 咸阳 712083

3. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700

4. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029

5. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 西安 710025

[摘要] **目的** 评价金茵利胆胶囊的体外抗炎活性, 并研究其抗炎谱效关系。**方法** 建立脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7 细胞)炎症模型, 检测细胞培养上清液中一氧化氮(NO)、TNF- α 和 IL-6 等的含量以评价金茵利胆胶囊的抗炎活性。采用均匀设计法制备金茵利胆胶囊组成饮片的不同配伍样本, 采用 HPLC 建立其指纹图谱, 并进行抗炎活性测定; 以细胞培养上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 的抑制率为药效指标, 与共有峰峰面积经灰色关联分析构建抗炎谱效关系。**结果** 金茵利胆胶囊提取物(0.25~1.00 mg/mL)能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO、TNF- α 和 IL-6。经对照品比对指认出其中 7 个色谱峰, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、对羟基苯乙酮、柚皮苷、新橙皮苷。抗炎谱效关系分析结果表明, 23 个共有峰均具有一定的抗炎贡献度, 其中峰 21(柚皮苷)、峰 23(新橙皮苷)与 3 个细胞炎症指标(NO、TNF- α 、IL-6)的关联度均>0.74。**结论** 金茵利胆胶囊发挥抗炎作用是多种成分共同作用的结果。本研究结果可为金茵利胆胶囊抗炎药效物质基础及其质量控制提升提供参考。

[关键词] 金茵利胆胶囊; 单核巨噬细胞; 抗炎活性; 均匀设计; 谱效关系**[中图分类号]** R 286.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2023)04-0418-09

Evaluation for *in vitro* anti-inflammatory activity of Jinyin Lidan capsule and its spectrum-effect relation

CAO Fan¹, SONG Zhong-xing², CHEN Lin^{2*}, TANG Zhi-shu^{2,3*}, NI Jian⁴, ZHANG De-zhu⁵

1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, Shaanxi, China

2. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic *Qin* Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, Shaanxi, China

3. Chinese Medicine Resource Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

4. Beijing Academy of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

5. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co. Ltd., Xi'an 710025, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the *in vitro* anti-inflammatory activity of Jinyin Lidan capsule and study its anti-inflammatory spectrum-effect relation. **Methods** The lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation model of mouse mononuclear macrophages (RAW264.7 cells) was established, and the contents of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) in the supernatant of RAW264.7 cells were determined to evaluate the anti-inflammatory activity of Jinyin Lidan capsule. Different compatible samples of Jinyin Lidan capsules were prepared by uniform distribution design method, their fingerprints were established by high-performance liquid chromatography (HPLC), and their anti-inflammatory activity was determined. The inhibitory rates of NO, TNF- α and IL-6 in the supernatant were used as pharmacodynamic indexes, and the correlation between the anti-inflammatory spectrum and the common peak area was established by grey correlation

[收稿日期] 2022-01-24 **[接受日期]** 2022-04-29

[基金项目] 中药大品种品牌价值提升示范研究项目(202190025), 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21), 咸阳市 2020 年度重大科技专项(2020K01-20), 国家自然科学基金青年科学基金(81904047), 陕西省千人计划区域青年人才项目(2018)。Supported by Demonstration Research Project on Brand Value Enhancement of Large Chinese Medicine Varieties (202190025), Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-21), 2020 Major Science and Technology Project of Xianyang (2020K01-20), National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (81904047), and Regional Youth Talent Project of "Thousand Talents" Program of Shaanxi Province (2018)。

[作者简介] 曹 凡, 硕士生。E-mail: 1425913368@qq.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 029-38182205, E-mail: chanlin24@sina.com; Tel: 029-38185060, E-mail: tzs6565@163.com

analysis. **Results** The *Jinyin Lidan* capsule extract (0.25-1.00 mg/mL) reduced the secretion of NO, TNF- α and IL-6 in LPS-induced inflammatory RAW264.7 cells. Seven chromatographic peaks were identified by reference substance comparison, and they were neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid, *p*-hydroxyacetophenone, naringin, and neohesperidin. The analysis results of anti-inflammatory spectrum-effect relation showed that 23 common peaks had a certain degree of anti-inflammatory contribution, and the correlation degree of peak 21 (naringin) and peak 23 (neohesperidin) with the 3 cellular inflammatory indicators (NO, TNF- α , and IL-6) was greater than 0.74. **Conclusion** The anti-inflammatory effect of *Jinyin Lidan* capsule is the result of the joint action of various components, and the results of our study can provide reference for the improvement of the substance basis and quality control of *Jinyin Lidan* capsule.

[**Key words**] *Jinyin Lidan* capsule; mononuclear phagocyte; anti-inflammatory activity; design by uniform distribution; spectrum-effect relation

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(4): 418-426]

金茵利胆复方制剂金茵利胆胶囊由茵陈、金钱草、郁金和枳壳4种中药饮片加工制成,适用于肝郁气滞及肝胆湿热引起的胁痛、胃痛、食少纳呆等。金茵利胆复方制剂在临床上对非酒精性脂肪肝^[1]、新生儿高胆红素血症^[2]、慢性胆囊炎^[3]、急性梗阻性化脓性胆管炎^[4]等疾病有一定的探索和用药经验。文献中也有对金茵利胆复方制剂的质量控制方法^[5-8],但并不能全面反映金茵利胆胶囊的质量,其抗炎物质基础的研究更是鲜有报道。谱效关系的研究能够较好地表征中药化学成分与药效的关联,是快速筛选活性化合物的一种研究方法。本实验通过建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7细胞炎症模型,以金茵利胆胶囊为基础筛选出适宜的工作浓度,并建立以金茵利胆胶囊组成药材饮片为基础的均匀设计样品HPLC指纹图谱,考察其体外抗炎活性,采用灰色关联分析方法研究其抗炎谱效关系,探讨金茵利胆胶囊发挥抗炎作用的物质基础,为金茵利胆胶囊全面的质量控制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 药品、细胞与试剂 金茵利胆胶囊(批号20201003,陕西盘龙药业集团股份有限公司);小鼠单核巨噬细胞RAW264.7(中国科学院上海细胞库);FBS(货号2120140)、RPMI 1640培养基(货号2049224)、PBS(货号UB150259)均购于以色列Biological Industries公司;LPS(货号L6529,美国Sigma公司);MTT(货号922N053,上海碧云天生物技术有限公司);DMSO(货号HG/T5345-2018,天津市科密欧化学试剂有限公司);无水对氨基苯磺酸(sulfanilic acid anhydrous, SUL;货号DC5BA0731)、N-(1-萘)乙二胺盐酸盐

[N-(1-naphthalene)ethylenediamine hydrochloride, NED; 货号DC07BA1002]均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;亚硝酸钠(NaNO_2 ,天津市科密欧化学试剂有限公司);小鼠TNF- α ELISA检测试剂盒(货号M211216-004a)、小鼠IL-6 ELISA检测试剂盒(货号M211216-102a)均购于深圳欣博盛生物科技有限公司;新绿原酸(货号HR20422B1)、隐绿原酸(货号HR20423B1)、绿原酸(货号HCD21133198)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(货号H0071330198)均购于宝鸡辰光生物科技有限公司,纯度均大于98%;对羟基苯乙酮(货号111897-201602)、柚皮苷(批号110722-201815)、新橙皮苷(批号1108091857-201804)均购于中国食品药品检定研究院,纯度均大于98%;甲醇(分析纯,成都市科隆化学有限公司);甲醇(色谱纯,货号T4AG4H)、乙腈(色谱纯,货号T7SA1H)均购于美国Honeywell公司;磷酸(色谱纯,货号20180404,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2 主要仪器 超净工作台(型号SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); CO_2 细胞培养箱(型号311)、多功能酶标仪(型号Multiskan™GO)均购于美国ThermoFisher Scientific公司;1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Milli-Q纯水/超纯水一体机(美国Millipore公司);万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);VORTEX-5型漩涡混匀仪(海门其林贝尔仪器有限公司)。

1.3 金茵利胆胶囊体外细胞抗炎活性评价

1.3.1 金茵利胆胶囊提取物工作液制备 取金茵利

胆胶囊内容物,加入70%甲醇提取,超声50 min,离心取上清,过0.45 μm 滤膜,挥干。用DMSO复溶后,加PBS稀释配制成终浓度为20 mg/mL的供试品储备溶液(DMSO含量不超过0.2%),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 金茵利胆胶囊提取物对RAW264.7细胞毒性的影响 将RAW264.7细胞接种至含10% FBS的完全培养基(含青-链霉素双抗)中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。传代间隔天数依据细胞成长情况而定。

取对数生长期的RAW264.7细胞,以 1.5×10^5 个/孔的密度接种于96孔板,每孔100 μL 。培养4 h后,分别加入无血清培养基稀释后的金茵利胆胶囊提取物工作液,工作液浓度分别为0、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL,培养箱中培养18 h后,每组设置6个复孔。药物作用结束后,弃去上清,每孔加入5 mg/mL MTT工作液120 μL (无血清培养基与MTT体积比为100:20);培养箱中孵育4 h后,弃去培养基,每孔加入DMSO 150 μL ,采用多功能微孔板检测仪在490 nm波长处测定光密度值,条件设置振荡3 min。计算细胞存活率,上述实验重复3次。选取适宜的药物浓度范围进行后续实验。

1.3.3 金茵利胆胶囊提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞活力的影响 取对数生长期的RAW264.7细胞,以 2.0×10^5 个/孔的密度接种于96孔板,每孔100 μL ,培养4 h后,弃去上清,加入无血清培养基和适宜浓度的金茵利胆胶囊提取物工作液,工作液浓度分别为0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL,药物作用2 h后,除空白对照组外其余均加入10 $\mu\text{g/mL}$ LPS溶液10 μL 作用18 h,每组设置3个复孔。作用结束后,弃去上清,加入5 mg/mL MTT工作液120 μL ,在培养箱中放置4 h后弃去培养基,加入150 μL DMSO,在酶标仪上振荡3 min后测量各孔在490 nm波长处的光密度值。计算各组细胞的存活率,上述实验重复3次。

1.3.4 金茵利胆胶囊提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的影响 取对数生长期的RAW264.7细胞,以 2.0×10^5 个/孔的密度接种于96孔板,每孔100 μL ,4 h后弃去培养基,实验分为空白对照组、模型组、金茵利胆胶囊给药组。空白对照组每孔重新加入100 μL 无血清培养基,模型组每孔重新加入90 μL

无血清培养基,给药组每孔重新加入80 μL 无血清培养基;给药组设多个剂量组,分别给予浓度为0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL金茵利胆胶囊提取物工作液10 μL ,培养2 h后,模型组、给药组同时加入10 μL LPS(10 $\mu\text{g/mL}$)刺激细胞。继续培养18 h后,取上清液,每组设置3个复孔,上述实验重复3次。采用Griess法,依次加入SUL和NED试剂,在546 nm波长处检测细胞培养基的光密度值,优选出NO抑制率最高的金茵利胆胶囊提取物浓度,进行TNF- α 和IL-6指标的检测。

1.3.5 金茵利胆胶囊提取物对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液TNF- α 和IL-6含量的影响 与1.3.4节步骤相同,分组后给药组每孔重新加入80 μL 无血清培养基,给予浓度为1.00 mg/mL金茵利胆胶囊提取物工作液10 μL ,后续步骤同1.3.4节。

1.4 金茵利胆胶囊超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)化学成分表征

1.4.1 分析条件 质谱条件为电喷雾离子源;正、负离子模式采集数据,源喷射电压分别为5 500、-4 500 V,裂解电压 ± 80 V,碰撞能量 ± 10 eV,雾化气和辅助气、辅助加热气均为氮气、344.74 kPa(50 psi),气帘气241.32 kPa(35 psi),雾化温度500 $^{\circ}\text{C}$,采用信息依赖采集、动态背景扣除和高灵敏度模式;母离子(飞行时间质谱)、子离子的扫描范围均为 m/z 100~2 000。

色谱条件为ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm),使用0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱:0~5 min, 2%~5% B; 6~10 min, 5%~11% B; 11~12 min, 11%~11.5% B; 13~16 min, 11.5%~15% B; 17~24 min, 15%~23% B; 25~36 min, 23%~40% B; 37~44 min, 40%~55% B; 45~46 min, 55%~70% B; 47~53 min, 70%~80% B; 54~55 min, 80%~2% B;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流速0.3 mL/min;进样量3 μL 。

1.4.2 供试品溶液制备 称取金茵利胆胶囊内容物约0.3 g,加入70%甲醇9 mL,密塞,称重,超声处理30 min(功率300 W,频率40 kHz,超声温度45 $^{\circ}\text{C}$),放冷后,70%甲醇补足至9 mL,摇匀。离心取上清,过滤,取续滤液,过0.22 μm 滤膜,得供试品溶液。将供试品溶液稀释,过0.22 μm 滤膜,

质谱进样。

1.4.3 谱库检索 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 检测金茵利胆胶囊的化学成分, 经过PeakView 2.2 软件中AB SCIEX master view 1.1.0.0 中药成分数据库 (TCM library 1.0, 包含1 013 种中药成分) 谱库对化合物进行匹配分析, 选取相对峰丰度5 000 以上、综合评分大于80 的化学成分, 结合文献筛选化学成分。

1.5 谱效关系分析

1.5.1 均匀设计样品供试品溶液的制备 按金茵利胆胶囊处方工艺^[8]提取处方中各药材饮片, 对应合并其3 次滤液, 将合并后滤液进行喷雾干燥, 获得4 种单味药材饮片的干燥粉末。采用均匀设计法对其干燥粉末进行4 因素6 水平均匀设计, 得到均匀设计的样品N1~N6, 样品N0 为原处方配比组合, 共计7 个样品配比组 (表1)。根据均匀设计表的配比, 加入一定量的70% 甲醇提取粉末, 超声50 min, 离心取上清, 过0.45 μm 滤膜, 挥干。加入DMSO 复溶, 用PBS 稀释配制成终浓度为20 mg/mL 供试品储备溶液 (DMSO 含量不超过0.2%), 4℃ 保存备用。将终浓度为20 mg/mL 供试品储备溶液 (DMSO 含量不超过0.2%) 稀释成0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 5 个浓度, 过无菌滤膜, 作为细胞给药的样品。

表1 U6 (6⁴) 均匀设计表

Tab 1 U6 (6⁴) uniform design table

Sample	mg			
	Oriental wormwood	<i>Lysimachia christinae</i> Hance	<i>Radix curcumae</i>	<i>Fructus aurantii</i>
N0	1 200	600	600	300
N1	0	200	400	500
N2	400	600	1 000	400
N3	800	1 000	200	300
N4	1 200	0	800	200
N5	1 600	400	0	100
N6	2 000	800	600	0

N0-N6 were uniformly designed samples.

1.5.2 色谱条件 InertSustain C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为0.05% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~12% B; 9~14 min, 12%~15% B; 15~26 min, 15%~27% B; 27~30 min, 27%~28% B; 31~41 min,

28%~40% B; 42~54 min, 40%~80% B; 55 min, 80%~5% B; 56~65 min, 5% B, 后运行5 min; 流速1.0 mL/min; 柱温30℃; 检测波长为282 nm; 进样量5 μL。

1.5.3 溶液的制备 (1) 对照品溶液: 精密称取新绿原酸、隐绿原酸、绿原酸、1,3- 二咖啡酰奎宁酸、对羟基苯乙酮、柚皮苷和新橙皮苷对照品适量, 分别加甲醇配成单一对照品储备溶液。吸取各对照品储备液适量, 配成稀释后质量浓度分别为0.3、0.3、0.167、0.1、0.133、0.6、0.3 mg/mL 的混合对照品储备溶液, 4℃ 保存, 备用。

(2) 供试品溶液: 取金茵利胆胶囊内容物约0.3 g, 精密加入70% 甲醇9 mL, 密塞, 称重, 超声处理30 min (功率300 W, 频率40 kHz, 超声温度45℃), 放冷后, 70% 甲醇补足至9 mL, 摇匀。1 000×g 离心2 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

1.5.4 均匀设计样品对RAW264.7 细胞毒性的影响 实验步骤同1.3.2 节。

1.5.5 均匀设计样品对LPS 诱导的RAW264.7 细胞活力的影响 实验步骤同1.3.3 节。

1.5.6 均匀设计样品对LPS 诱导的RAW264.7 细胞上清液NO、TNF-α 和IL-6 含量的影响 NO 的检测方法同1.3.4 节, TNF-α 和IL-6 的检测方法同1.3.5 节。

1.6 抗炎指标数据转化^[9]与灰色关联分析 NO 抑制率 (%) = [(模型组NO 含量-空白对照组NO 含量) / 模型组NO 含量] ×100%; TNF-α 抑制率 (%) = [(模型组TNF-α 含量-空白对照组TNF-α 含量) / 模型组TNF-α 含量] ×100%; IL-6 抑制率 (%) = [(模型组IL-6 含量-空白对照组IL-6 含量) / 模型组IL-6 含量] ×100%。

采用均值化法将均匀设计样品N0~N6 的抗炎指标的数据转化结果与其共有峰峰面积进行归一化处理^[9-13], 以NO、TNF-α 和IL-6 抑制率作为参考序列Y(k), 抑制率<0 者以0 计算, 23 个共有峰峰面积作为比较序列Xi (i 表示共有峰编号1、2、3、⋯、23), 各比较序列与参考序列的关联系数Ai(k) 可由下列公式计算: $Ai(k) = [\Delta i(k)_{\min} + \rho \times \Delta i(k)_{\max}] / [\Delta i(k) + \rho \times \Delta i(k)_{\max}]$, 其中 $\Delta i(k) = Y(k) - Xi$, 分辨系数 $\rho = 0.5$ 。

关联系数Ai(k) ≥0.9 表示有显著影响, 0.9 >

$Ai(k) \geq 0.8$ 表示有比较大的影响, $0.8 > Ai(k) \geq 0.7$ 表示有较为明显的影响, $0.7 > Ai(k) \geq 0.6$ 表示影响较小, $Ai(k) < 0.6$ 表示没有影响^[14]。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 金茵利胆胶囊体外细胞抗炎活性评价

2.1.1 金茵利胆胶囊提取物影响 RAW264.7 细胞的存活率 金茵利胆胶囊提取物工作液浓度分别为 0 (对照组)、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 时 RAW264.7 细胞存活率分别为 (100.00±17.22) %、(117.42±16.71) %、(115.61±20.89) %、(132.63±16.87) %、(140.56±15.95) %、(128.18±17.70) %, 其中 0.50 mg/mL 浓度下的细胞存活率与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.1.2 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞具有保护作用 与空白对照组 [细胞存活率为 (100.00±4.95) %] 比较, 1 μ g/mL 的 LPS (模型组) 对 RAW264.7 细胞的活力造成了一定的损伤 [细胞存活率为 (88.74±2.18) %, $P < 0.01$]。与模型组相比, 0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞均有一定的保护作用, 细胞存活率分别为 (92.77±3.88) % ($P > 0.05$)、(96.01±5.73) % ($P < 0.01$)、(100.42±5.10) % ($P < 0.01$)、(98.93±4.31) % ($P < 0.01$)。

2.1.3 金茵利胆胶囊提取物能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO 与空白对照组 [(1.13±0.02) μ mol/L] 相比, 模型组 RAW264.7 细胞分泌 NO 增多 [(35.64±0.01) μ mol/L, $P < 0.01$]。与模型组相比, 0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊提取物能够一定程度抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO, NO 含量分别为 (34.82±0.01) μ mol/L ($P > 0.05$)、(30.21±0.04) μ mol/L ($P < 0.01$)、(29.03±0.04) μ mol/L ($P < 0.01$)、(19.39±0.02) μ mol/L ($P < 0.01$)。

2.1.4 金茵利胆胶囊提取物能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 结果如表 2 所示, 给药组的 TNF- α 和 IL-6 水平均低于模型组, 表明 1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导

的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 有抑制作用 (P 均 < 0.01)。

表 2 金茵利胆胶囊 (1.00 mg/mL) 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 的影响

Tab 2 Effect of Jinyin Lidan capsule (1.00 mg/mL) on LPS-induced secretion of TNF- α and IL-6 in RAW264.7 cells

(pg · mL ⁻¹), $n=3, \bar{x} \pm s$		
Group	TNF- α	IL-6
Contol	24.99±1.26	17.98±2.31
Model (LPS)	1 538.43±78.20**	393.54±6.90**
Capsule	1 104.70±40.27 $\Delta\Delta$	252.17±16.20 $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model (LPS) group. LPS: Lipopolysaccharide; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-6: Interleukin 6.

2.2 金茵利胆胶囊 UHPLC-MS/MS 化学成分表征 经谱库检索共筛选得到 24 个化学成分 (表 3)。

2.3 谱效关系

2.3.1 均匀设计样品 HPLC 色谱图 将 7 个样品 (N0~N6) 的 aia 格式文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)》, 得到 HPLC 叠加色谱图, 与金茵利胆胶囊的色谱峰保留时间比对并标记 N0~N6 样品中的共有峰, 见图 1。

2.3.2 金茵利胆胶囊共有峰的指认 根据 UHPLC-MS/MS 成分鉴定结果以及色谱峰保留时间稳定、峰面积相对较高和检测率达 100% 的原则, 与混合对照品谱图对比并指认丰度较高的 7 个共有峰分别为新绿原酸 (9 号峰)、绿原酸 (13 号峰)、隐绿原酸 (14 号峰)、1,3-二咖啡酰奎宁酸 (16 号峰)、对羟基苯乙酮 (17 号峰)、柚皮苷 (21 号峰)、新橙皮苷 (23 号峰)。混合对照品和金茵利胆胶囊样品的 HPLC 图见图 2。

2.3.3 均匀设计样品对 RAW264.7 细胞无毒性作用 结果如表 4 所示, 在 0.05~1.00 mg/mL 范围内均匀设计样品 N0~N6 对 RAW264.7 细胞无毒性作用。

2.3.4 均匀设计样品能促进 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞增殖 空白对照组、模型组、均匀设计样品 N0~N6 组 RAW264.7 的细胞存活率分别为 (100.00±8.15) %、(93.12±3.02) %、(116.61±7.64) %、(114.30±13.22) %、(128.25±17.80) %、(126.40±16.45) %、(127.86±13.44) %、(119.57±9.19) %、(124.04±4.40) %, 表明均匀设计样品对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞有一定的促增殖作用。

表 3 金茵利胆胶囊 UHPLC-MS/MS 成分表征结果

Tab 3 Characterization results of UHPLC-MS/MS components of <i>Jinyin Lidan</i> capsule			
Compound	Formula	Molecular weight	Retention time/min
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 6	2.87
Luteoloside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.377 0	3.35
Cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	7.28
<i>p</i> -hydroxyacetophenone	C ₈ H ₈ O ₂	136.052 1	8.48
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	8.64
Neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	9.11
Cortisol	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	362.244 1	9.45
1,3-dicaffeoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	10.95
4-hydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₃	162.031 7	11.56
<i>p</i> -anisaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	136.052 1	11.75
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 4	13.51
Isochlorogenic acid A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	14.32
Neohesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	596.174 1	17.76
Isochlorogenic acid B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.126 8	23.35
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 8	23.40
Neohesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.561 0	24.14
Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.377 0	25.51
Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.535 0	26.30
Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.561 0	28.72
Hyperin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.131 9	28.73
Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.079 4	29.44
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.084 1	35.66
Citrulline	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	470.194 1	45.62
Curdione	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.177 6	46.13

UHPLC-MS/MS: Ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry.

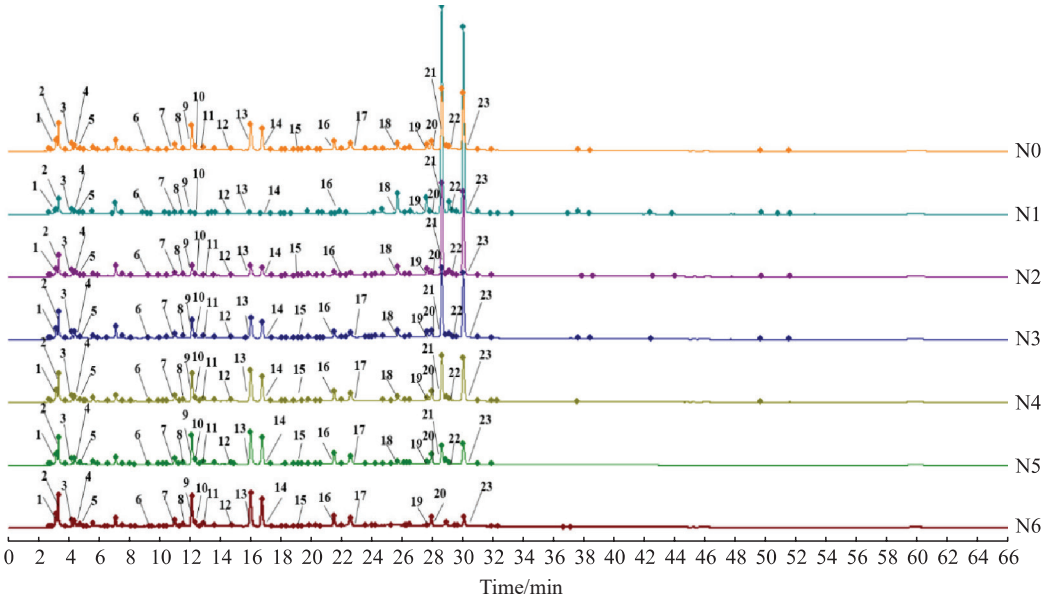


图 1 均匀设计样品 N0~N6 的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC diagram of uniformly designed samples N0~N6

HPLC: High-performance liquid chromatography.

2.3.5 均匀设计样品能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO、TNF- α 和 IL-6 结果如表 5 所示, 均匀设计样品 N0~N5 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF- α 和 IL-6 含量增加均有一定的抑制作用。

2.3.6 抗炎指标的数据转化 将 RAW264.7 细胞分泌的 NO、TNF- α 、IL-6 含量按 1.6 节公式进行抗

炎指标数据转化, 抑制率结果见表 6。

2.3.7 抗炎指标数据的灰色关联分析 灰色关联分析结果 (表 7~表 9) 表明, 23 个共有峰与炎症指标均有一定的相关性, 共有峰对药物的抗炎活性有一定的影响。其中, 共有峰 21 (柚皮苷)、峰 23 (新橙皮苷) 与 NO、TNF- α 、IL-6 3 个炎症指标的关联度均 >0.74 , 对药物的抗炎活性有明显的影

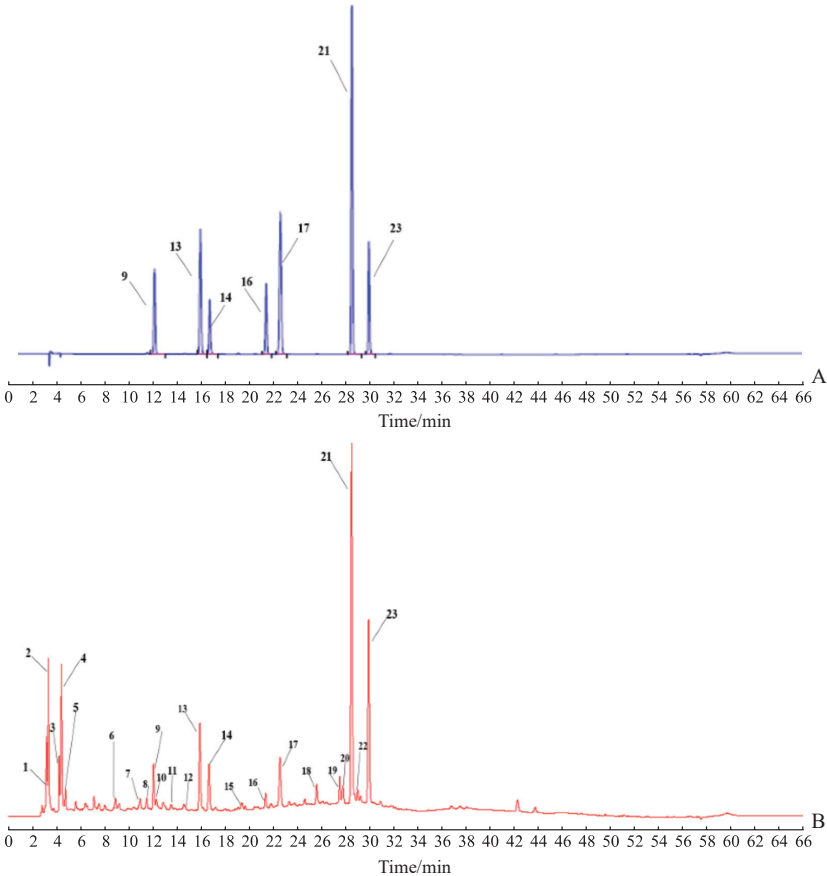


图 2 混合对照品 (A) 和金茵利胆胶囊样品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC diagram of mixed reference substance (A) and *Jinyin Lidan* capsule (B)

HPLC: High-performance liquid chromatography. 9: Neochlorogenic acid; 13: Chlorogenic acid; 14: Cryptochlorogenic acid; 16: 1,3-dicaffeoylquinic acid; 17: *p*-hydroxyacetophenone; 21: Naringin; 23: Neohesperidin.

表 4 均匀设计样品 N0~N6 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Tab 4 Effect of uniformly designed samples N0-N6 on RAW264.7 cell survival rate

%, $n=3, \bar{x} \pm s$							
Concentration ^a / (mg•mL ⁻¹)	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6
0 (control)	100.00±15.83	100.00±15.83	100.00±19.68	100.00±19.68	100.00±10.36	100.00±19.68	100.00±6.97
0.05	109.72±6.87	112.76±13.65	114.68±13.53	130.92±26.68	153.37±16.16	130.92±26.68	119.27±9.32
0.10	110.52±10.72	107.86±14.32	115.61±22.86	150.39±13.85	148.33±6.56	150.39±13.85	119.92±10.61
0.25	126.60±8.32	127.44±24.18	132.63±18.77	131.24±29.03	177.06±12.48	122.70±30.46	139.35±7.71
0.50	146.38±9.24	130.68±13.38	140.56±17.56	163.40±68.70	151.07±18.77	136.88±22.47	169.44±10.28
1.00	123.09±9.35	119.83±14.81	123.09±9.35	133.79±16.93	152.52±22.00	133.79±16.93	168.77±11.64

^a: Concentration of *Jinyin Lidan* capsule.

表 5 均匀设计样品 N0~N6 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF-α 和 IL-6 含量的影响

Tab 5 Effects of uniformly designed samples N0-N6 on NO, TNF-α and IL-6 contents in supernatant of LPS-induced RAW264.7 cells

$n=3, \bar{x} \pm s$			
Group	NO/(μmol•L ⁻¹)	TNF-α/(pg•mL ⁻¹)	IL-6/(pg•mL ⁻¹)
Control	0.69±0.21	25.28±0.25	17.66±1.73
Model (LPS)	22.18±0.21**	1 551.94±128.97**	416.04±39.27**
N0	17.00±1.99 [△]	1 081.87±48.73 ^{△△}	247.86±13.67 [△]
N1	21.73±1.08	860.47±18.19 [△]	295.74±10.28 [△]
N2	18.70±0.91 ^{△△}	938.78±84.64 [△]	302.23±17.46 [△]
N3	19.84±1.24 [△]	1 291.49±24.66 [△]	326.95±43.15
N4	21.33±0.95	1 232.90±112.49	381.82±42.21 [△]
N5	20.69±0.52 [△]	1 209.04±46.09	365.31±29.65
N6	23.97±0.99	1 858.43±205.85	426.43±2.44

** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs model (LPS) group. LPS: Lipopolysaccharide; NO: Nitric oxide; TNF-α:

Tumor necrosis factor α; IL-6: Interleukin 6.

表 6 均匀设计样品 N0~N6 抗炎指标
数据转化结果 (抑制率)

Tab 6 Results (inhibitory rate) of data transformation of anti-inflammatory indexes of uniformly designed samples N0-N6

%			
Group	NO	TNF- α	IL-6
N0	23.33	30.29	40.42
N1	2.02	44.56	28.92
N2	15.70	39.51	27.36
N3	10.54	16.78	21.41
N4	3.81	20.56	8.22
N5	6.72	22.10	12.19
N6	-8.08	-29.16	-2.50

NO: Nitric oxide; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-6: Interleukin 6.

表 7 均匀设计样品 N0~N6 HPLC 指纹图谱共有峰
与 NO 抑制率的关联度

Tab 7 Correlation between common peaks of HPLC fingerprints of uniformly designed samples N0-N6 and NO inhibitory rate

Peak No.	Correlation degree	Peak No.	Correlation degree
8	0.884	3	0.773
12	0.829	15	0.773
1	0.796	5	0.772
7	0.792	6	0.771
20	0.786	11	0.769
22	0.784	17	0.760
9	0.783	10	0.758
16	0.782	21	0.754
4	0.779	19	0.751
13	0.779	18	0.750
14	0.778	23	0.747
2	0.777		

HPLC: High-performance liquid chromatography; NO: Nitric oxide.

表 8 均匀设计样品 N0~N6 HPLC 指纹图谱共有峰
与 TNF- α 抑制率的关联度

Tab 8 Correlation between common peaks of HPLC fingerprints of uniformly designed samples N0-N6 and TNF- α inhibitory rate

Peak No.	Correlation degree	Peak No.	Correlation degree
23	0.784	20	0.677
19	0.776	5	0.664
18	0.775	7	0.663
21	0.774	9	0.655
3	0.739	16	0.652
22	0.736	14	0.650
12	0.726	13	0.648
8	0.722	17	0.645
6	0.710	11	0.638
2	0.699	15	0.637
1	0.690	10	0.621
4	0.684		

HPLC: High-performance liquid chromatography; TNF- α : Tumor necrosis factor α .

表 9 均匀设计样品 N0~N6 HPLC 指纹图谱共有峰
与 IL-6 抑制率的关联度

Tab 9 Correlation between common peaks of HPLC fingerprints of uniformly designed samples N0-N6 and IL-6 inhibitory rate

Peak No.	Correlation degree	Peak No.	Correlation degree
8	0.897	23	0.753
22	0.827	5	0.751
12	0.800	7	0.739
3	0.790	9	0.728
6	0.788	16	0.726
2	0.785	13	0.723
1	0.766	14	0.723
21	0.766	15	0.717
18	0.762	10	0.715
19	0.760	11	0.713
4	0.756	17	0.703
20	0.755		

HPLC: High-performance liquid chromatography; IL-6: Interleukin 6.

3 讨 论

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 是体外研究炎症常用的细胞株系, LPS 能够刺激巨噬细胞合成、释放炎症因子, 进而产生炎症反应^[15]。本研究通过建立 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型来评价金茵利胆胶囊体外抗炎活性。首先通过测定细胞活力和细胞上清液中 NO 的浓度, 筛选出金茵利胆胶囊体外抗炎最佳浓度, 后续选用此浓度进行细胞上清液中 TNF- α 和 IL-6 含量测定评价金茵利胆胶囊的抗炎活性水平。结果表明, 金茵利胆胶囊对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症模型中 NO、TNF- α 和 IL-6 的含量均有一定的抑制作用。

目前, 金茵利胆胶囊现行企业标准^[8]“含量测定”项下, 规定以枳壳中柚皮苷作为检测指标进行含量测定。单一成分的含量测定不能全面评价金茵利胆胶囊的质量。基于指纹图谱的谱效学研究将中药化学成分的量和其药效结合起来, 能够较为全面地反映中药及其制剂中所含化学成分的种类与数量, 进而对药品质量进行整体描述和评价。灰色关联分析对样本量大小没有严格要求, 分析时, 可在不完全的信息中确定各种比较因素与参考因素之间的关联程度, 且能体现中药指纹图谱“整体性”“模糊性”的特点^[16]。

金茵利胆胶囊提取制备工艺已经成熟, 不同批次间金茵利胆胶囊质量差异很小, 因此本实验选取

以金茵利胆胶囊为基础的均匀设计样品进行指纹图谱的研究。本课题组前期通过对色谱条件、提取条件以及方法学考察建立了金茵利胆胶囊检测方法,并应用于均匀设计样品的指纹图谱研究中。均匀设计样品对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症的药效结果表明,均匀设计样品N0~N5都对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型中NO、TNF- α 和IL-6的含量增加有一定的抑制作用。

为了进一步研讨均匀设计样品共有峰与其药效的关联关系,本研究进行了灰色关联度分析,其中峰8、峰12、峰22所代表的成分与抗炎指标NO和IL-6的关联度较大(均>0.78),峰23(新橙皮苷)、峰19、峰18、峰21(柚皮苷)与抗炎指标NO和TNF- α 的关联度较大(均>0.74)。由此表明,峰8、峰12、峰22、峰23、峰19、峰18、峰21所代表的化学成分与金茵利胆胶囊发挥抗炎作用有较强的关联度。由此表明,这些共有峰所代表的化学成分可能是金茵利胆胶囊发挥抗炎药效贡献较大的药效成分群,其他未明确的成分后续将借助高分辨的液质联用进行鉴定,以研究其是否能够作为金茵利胆胶囊质量控制的评价指标之一。本研究在体外进行了细胞模型的抗炎活性评价,不足之处是关联性较强的部分化合物未鉴定出来,均匀设计的样品也未在动物体内进行验证,这些将在后续的研究中继续完善。

综上所述,本研究通过以金茵利胆胶囊为基础的均匀设计样品HPLC指纹图谱并结合灰色关联度分析的统计方法,将其“谱”与“效”进行关联分析,可以为金茵利胆胶囊抗炎活性成分的筛选与确定及其质量控制与评价提供参考。

[参考文献]

- [1] 王伟,刘德宝.金茵利胆胶囊治疗非酒精性脂肪肝50例[J].中国民间疗法,2017,25:49,64.
- [2] 陶立华,胡晓文,廖玲太,豆莉.金茵利胆口服液辅助治疗新生儿高胆红素血症疗效分析[J].中国妇幼保健,2015,30:6157-6159.
- [3] 王武,李佐耀,蒋寅海.金茵利胆汤治疗慢性胆囊炎的疗效观察[J].中国中医药科技,2020,27:960-961.
- [4] 单彪峰,田珂,姚辉,贾重阳,邓英.金茵利胆口服液辅助治疗急性梗阻性化脓性胆管炎38例临床观察[J].甘肃中医药大学学报,2019,36:55-58.
- [5] 王信,潘新波,李彩东.金茵利胆口服液中茵陈等9味药材的薄层色谱鉴别[C]//中国药学会.2016年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集.北京:[出版者不详],2016:1902-1907.
- [6] 李彩东,潘新波,王信,张伟.金茵利胆口服液中柚皮苷、新橙皮苷的含量测定及初步稳定性研究[J].甘肃中医学院学报,2015,32:29-34.
- [7] 李彩东,王信,潘新波,张伟.金茵利胆口服液质量标准研究[J].中国中医药信息杂志,2015,22:87-90.
- [8] 曹凡,陈琳,宋忠兴,唐志书,倪健.金茵利胆胶囊的高效液相色谱指纹图谱及其抗氧化作用的灰色关联分析[J].中南药学,2022,20:574-579.
- [9] 冯月,段飞鹏,李一圣,邱书奇.不同产地金钗石斛醇提物HPLC指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究[J].中国药房,2021,32:1825-1830.
- [10] 张鑫,刘洋,程亚茹,王嘉馨,龚姝婷,李彦萍,等.枸杞多糖分子量分布测定与抗炎活性关联研究[J].北京中医药大学学报,2020,43:959-964.
- [11] 林梦雅,张玉萍,李雅,姜民,庄朋伟,张艳军,等.基于灰色关联度分析的丹参提取物抗炎作用谱效关系研究[J].中草药,2017,48:3447-3452.
- [12] 刘雯,覃洁萍,潘真真,刘云,郭海姣.基于灰色关联分析的藤茶提取物体外抗炎作用的谱-效关系研究[J].中国医院药学杂志,2021,41:2071-2075.
- [13] 张赞,黄遂,张慧,林昊,莫玉焕,谢鹏,等.壮药玉叶金花抗炎镇痛作用的谱效关系研究[J].中国药理学通报,2020,36:870-874.
- [14] 张晓莉,刘宇灵,樊丽姣,王月亮,陈凯,李慧.基于体外抗氧化活性的参芪通脉益智方提取工艺评价及其谱效关系的初步研究[J].中国中药杂志,2016,41:1635-1639.
- [15] ZHENG X F, HONG Y X, FENG G J, ZHANG G F, ROGERS H, LEWIS M A O, et al. Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Candida albicans* mediated up-regulation of EBI3 expression[J/OL]. PLoS One, 2013, 8: e63967. DOI: 10.1371/journal.pone.0063967.
- [16] 李少泓,夏鹏飞,马肖,邵欢.基于灰色关联分析方法评价当归药材质量[J].中药材,2012,35:1742-1746.

[本文编辑] 尹 茶