

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.02.0149

· 论 著 ·

## 巴戟天环烯醚萜苷类成分的制备及其对破骨细胞骨吸收的抑制作用

沈 毅<sup>1,2,3</sup>, 何玉琼<sup>1</sup>, 张 奇<sup>2,3</sup>, 刘梦琴<sup>2,3</sup>, 辛海量<sup>1</sup>, 张泉龙<sup>3</sup>, 秦路平<sup>1,3\*</sup>, 张巧艳<sup>1,2,3\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)药学院生药学教研室, 上海 200433

2. 福建中医药大学药学院, 福州 350122

3. 浙江中医药大学药学院生药学教研室, 杭州 310053

**[摘要]** **目的** 研究巴戟天中环烯醚萜苷类成分(*Morinda officinalis* iridoid glycosides, MOIG)的制备方法及其对破骨细胞骨吸收的抑制作用。**方法** 用高效液相色谱(HPLC)法测定 MOIG 中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量;通过对 AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HPD600、HP20、S-8、SP850、XDA-1、XDA-6 等型号大孔吸附树脂进行静态吸附-解吸附实验筛选大孔树脂型号,并优化大孔树脂富集 MOIG 的条件;以小鼠骨髓单核细胞诱导的破骨细胞为模型评价 MOIG 对骨吸收的抑制作用。**结果** 经过优选, XDA-1 型大孔树脂对 MOIG 有较好的吸附和解吸附作用,优化的 XDA-1 型大孔树脂富集 MOIG 的条件为:上样液中 MOIG 的质量浓度为 19.15 mg/mL, pH 值为 1.0, 树脂柱的径高比为 1:7, 上样流速为 2.0 BV/h (1 BV=80 mL), 上样体积为 0.75 BV, 树脂吸附时间为 11 h, 7 BV 水洗脱以除去其他的成分, 10% 乙醇以 3.0 BV/h 流速洗脱 MOIG。验证试验结果表明, 所制备的 MOIG 中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的总含量可达 54% 以上。MOIG 对由小鼠骨髓单核细胞诱导的破骨细胞增殖无显著影响, 但能抑制破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶活性, 抑制破骨细胞的骨吸收( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** XDA-1 型大孔树脂可用于富集 MOIG, 得到的水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸总含量在 54% 以上; MOIG 可抑制破骨细胞的骨吸收。

**[关键词]** 巴戟天; 环烯醚萜苷; 大孔树脂; 破骨细胞; 骨吸收

**[中图分类号]** R 931.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0149-08

### Preparation of *Morinda officinalis* iridoid glycosides and the inhibitory effect on bone resorption of osteoclasts

SHEN Yi<sup>1,2,3</sup>, HE Yu-qiong<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>2,3</sup>, LIU Meng-qin<sup>2,3</sup>, XIN Hai-liang<sup>1</sup>, ZHANG Quan-long<sup>3</sup>, QIN Lu-ping<sup>1,3\*</sup>, ZHANG Qiao-yan<sup>1,2,3\*</sup>

1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

**[Abstract]** **Objective** To study the preparation method of *Morinda officinalis* iridoid glycosides (MOIG) and to explore the inhibitory effect on bone resorption of osteoclasts. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) was applied to determine the contents of monotropein and deacetyl asperulosidic acid from MOIG. The static adsorption-desorption test was used to screen the types of macroporous resins of AB-8, ADS-17, D101, HPD400, HPD600, HP20, S-8, SP850, XDA-1 and XDA-6, and to optimize the related parameters in process of enriching MOIG using macroporous resins. Furthermore, the osteoclasts induced from mouse bone marrow monocytes were used to evaluate the inhibitory effects of MOIG on osteoclastic bone resorption. **Results** After optimization, XDA-1 macroporous resin had better adsorption and desorption effects on MOIG. The optimized preparation conditions were as follows: mass concentration of MOIG in the sample solutions was 19.15 mg/mL, pH value was 1.0, diameter-height ratio of resin column was 1:7, flow rate of loading samples was 2.0 BV/h (1 BV=80 mL), loading volume was 0.75 BV, and adsorption time was 11 h. 7 BV water was used to remove other constituents, and 10% ethanol was used to elute MOIG in the flow rate of 3.0 BV/h. The total content of monotropein and deacetyl asperulosidic acid in the prepared MOIG was more than 54%. MOIG had no significant effect on proliferation of the osteoclasts induced by mouse bone marrow monocytes, while it could significantly inhibit the tartrate-resistant acid phosphatase activity and the bone resorption of osteoclasts ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

**[收稿日期]** 2018-09-27 **[接受日期]** 2018-11-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金(U1505226). Supported by National Natural Science Foundation of China (U1505226).

**[作者简介]** 沈 毅, 硕士生. E-mail: 18065148122@163.com

\*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871309, E-mail: qinsmmu@126.com; Tel: 021-81871303, E-mail: zqy1965@163.com

**Conclusion** XDA-1 macroporous resin can be used to enrich MOIG, with more than 54% total content of monotropein and deacetyl asperulosidic acid. The MOIG can significantly inhibit the bone resorption of osteoclasts.

**[Key words]** *Morinda officinalis*; iridoid glycosides; macroporous resin; osteoclasts; bone resorption

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 149-156]

巴戟天为茜草科植物巴戟天 (*Morinda officinalis* How.) 的干燥根, 主产于我国广东、广西和福建, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的作用<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 巴戟天含有多糖、寡糖、环烯醚萜苷和蒽醌类化学成分, 具有抗抑郁、免疫调节、抗骨质疏松、抗类风湿性关节炎、抗炎镇痛和抗氧化等多种生物活性<sup>[3-7]</sup>。巴戟天中环烯醚萜苷类成分 (*Morinda officinalis* iridoid glycosides, MOIG) 的含量较高, 可达到 2.0% 左右, 且具有抗炎镇痛、抗类风湿性关节炎、抗骨质疏松等多种药理作用<sup>[8-10]</sup>。特别是 MOIG 中的水晶兰苷可抑制去卵巢和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠骨丢失<sup>[11]</sup>, 显示出抗骨质疏松和抗炎作用。然而, 关于 MOIG 的富集和纯化研究尚未见报道。因此, 本实验在课题组前期研究<sup>[12]</sup>的基础上, 应用大孔吸附树脂富集 MOIG, 并评价其对破骨细胞性骨吸收的作用, 为 MOIG 的开发利用提供科学依据。

## 1 材料和方法

**1.1 仪器** Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (包括四元泵、手动进样器、柱温箱、DAD 检测器), 美国 Agilent 公司; AG285 型电子分析天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司; W2-100SP 型旋转蒸发仪, 上海申生科技有限公司; HYG-A 型全温摇瓶柜, 苏州培英实验设备有限公司; ELX800 型连续波长酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; DMI3000B 型 Leica 倒置荧光显微镜, 成贯仪器 (上海) 有限公司; TDL80-2B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器制造厂。

**1.2 试药与试剂** 巴戟天药材采自广东肇庆, 由海军军医大学 (第二军医大学) 药学院生药学教研室张巧艳教授鉴定为茜草科植物巴戟天 (*Morinda officinalis* How.) 的干燥根。水晶兰苷标准品 (批号: Z09D6X7027, 纯度 > 98%) 和去乙酰基车

叶草苷酸标准品 (批号: Z26D6B8130, 纯度 > 98%) 购于上海源叶生物科技有限公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 美国 Gibco 公司; 萘酚 AS-BI 磷酸钠, 美国 Sigma 公司; 小鼠可溶性核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (soluble receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, sRANKL) 和巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF), 美国 PeproTech 公司; Triton X-100, 上海索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒, 大连美仑生物技术有限公司; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 上海碧云天生物技术有限公司;  $\alpha$ -MEM 培养液, 天津灏洋生物制品科技有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯试剂。AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HPD600、HP20、S-8 型大孔树脂, 沧州宝恩吸附材料科技有限公司; SP850 型大孔树脂, 北京绿百草科技发展有限公司; XDA-1、XDA-16 型大孔树脂, 西安蓝晓科技新材料股份有限公司。

**1.3 MOIG 的含量测定** 将巴戟天药材粉碎至粗粉, 过 2 号筛, 用 70% 乙醇渗漉提取, 以 0.8 BV/h (1 BV=80 mL) 的流速收集 16 BV 渗漉液。渗漉液减压浓缩后加适量水定容至质量浓度为 1.0 g/mL, 备用。

精密称取水晶兰苷标准品和去乙酰基车叶草苷酸标准品适量, 用初始流动相分别制备成浓度为 840  $\mu$ g/mL 和 626  $\mu$ g/mL 的对照品储备液。

参考本课题组前期建立的高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 法<sup>[12]</sup>进行测定。艾杰尔 Venusil MP C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 以乙腈 (A) -0.2% 磷酸 + 0.01 mol/L 磷酸氢二钠缓冲盐 (B) 为流动相, 梯度洗脱 0~12 min (1%~2% A), 检测波长为 235 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25  $^{\circ}$ C,

进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。各个目标峰分离度  $>1.5$ 。水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸分别在 3.28~420  $\mu\text{g/mL}$  和 2.45~313  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内线性关系良好 (相关系数分别为 0.999 9 和 1.000 0)。方法学考察结果表明精密度、重复性、样品溶液稳定性、加样回收率均符合含量测定要求。

1.4 MOIG 供试品溶液的制备 取 1.3 项制备的质量浓度为 1.0  $\text{g/mL}$  的巴戟天提取液 300 mL, 定容至质量浓度为 0.5  $\text{g/mL}$  的供试品溶液 (MOIG 质量浓度为 9.57  $\text{mg/mL}$ )。

### 1.5 大孔树脂型号选择

1.5.1 树脂的预处理 取 AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HPD600、HP20、S-8、SP850、XDA-1 和 XDA-16 型大孔树脂适量, 分别用乙醇浸泡 24 h 充分溶胀后, 用 95% 乙醇冲洗, 直至洗出液按 1:3 比例加水无白色浑浊现象, 再用水洗至无醇味。依次用 5% HCl 水溶液浸泡 4 h, 再用蒸馏水洗至中性, 继用 5% NaOH 水溶液重复以上操作, 备用。

1.5.2 静态吸附-解吸附性能的考察 取已处理的 AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HPD600、HP20、S-8、SP850、XDA-1 和 XDA-16 型大孔树脂各 5 g 置于 250 mL 的锥形瓶中, 加入 MOIG 质量浓度为 9.57  $\text{mg/mL}$  的供试品溶液 50 mL, 于恒温摇床中振荡 24 h 后, 将吸附饱和的树脂用 50 mL 纯水振荡 24 h、50 mL 95% 乙醇振荡 24 h 进行解吸附。按 1.3 项方法测定解析液中 MOIG 的含量, 重复 3 次, 计算树脂的平均吸附量和解吸附率。

### 1.6 XDA-1 型大孔树脂富集 MOIG 的性能考察

1.6.1 上样液质量浓度 分别取 5 g XDA-1 型大孔树脂置于 5 个 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 MOIG 质量浓度为 19.15、15.32、11.49、7.66、3.83  $\text{mg/mL}$  的供试品溶液 50 mL, 于恒温摇床中振荡 4 h 后, 按 1.3 项方法测定溶液中 MOIG 的质量浓度, 重复 3 次, 计算树脂平均吸附量以确定最佳上样液质量浓度。

1.6.2 pH 条件 取已处理好的 XDA-1 型大孔树脂, 加入用盐酸和氨水调至 pH 值分别为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 的 MOIG (质量浓度为 19.15  $\text{mg/mL}$ ) 供试品溶液, 于恒温摇床中振荡 4 h, 按 1.3 项方法测定溶液中 MOIG 的吸附量, 重复 3 次, 计算

树脂平均吸附量以确定 pH 值。

1.6.3 静态吸附动力学 取 5 g XDA-1 型大孔树脂置于 250 mL 锥形瓶中, 加 50 mL MOIG 质量浓度为 19.15  $\text{mg/mL}$  的供试品溶液, 室温振荡, 分别于 1、3、5、7、9、11、13、24 h 时按 1.3 项方法测定上样液中 MOIG 的质量浓度, 重复 3 次, 计算树脂对 MOIG 的平均比吸附量, 以确定完全吸附时间。

1.6.4 上样流速 取 5 份 MOIG 质量浓度为 19.15  $\text{mg/mL}$  的供试品溶液各 35 mL, 分别以 1.0、2.0、3.0、4.0 BV/h 的流速通过装有 30 g 树脂的柱子, 按 1.3 项方法测定过柱液中 MOIG 的含量, 重复 3 次, 计算树脂的平均吸附率, 以确定最佳上样流速。

1.6.5 柱径高比 取 5 份 1 BV 体积的 MOIG 供试品溶液 (质量浓度为 19.15  $\text{mg/mL}$ ), 以 2.0 BV/h 的流速分别通过径高比为 1:3、1:5、1:7、1:9、1:11 的树脂柱, 收集过柱液, 按 1.3 项方法测定过柱液中 MOIG 的含量, 重复 3 次, 计算树脂的平均吸附率, 以确定最佳径高比。

1.6.6 上样量 取 XDA-1 型大孔树脂, 按径高比 1:7 装柱 (树脂 70 g, 柱体积 80 mL), 以 2.0 BV/h 的流速加入 MOIG 供试品溶液, 每 20 mL 收集 1 份流出液, 按 1.3 项方法测定流出液中 MOIG 的质量浓度, 绘制泄露曲线, 以选择最大上样量。

1.6.7 洗脱溶剂 按上述优化条件, 取 MOIG 供试品溶液进行试验。吸附完毕后, 依次用水和 10%、30%、50% 乙醇洗脱 (体积流量为 2.0 BV/h), 收集各洗脱液 7 BV, 按 1.3 项方法测定 MOIG 的质量浓度, 重复 3 次, 计算平均累积洗脱率, 以确定最优洗脱溶剂。

1.6.8 洗脱流速 按上述优化条件, 取 MOIG 质量浓度为 19.15  $\text{mg/mL}$  的供试品溶液 50 mL 通过径高比为 1:7 的大孔树脂柱, 先用 7 BV 的水洗脱, 再用 10% 乙醇以 1.0、2.0、3.0、4.0 BV/h 的流速洗脱, 收集并按 1.3 项方法检测洗脱液中 MOIG 的质量浓度, 重复 3 次, 计算平均洗脱率, 以确定最佳洗脱流速。

1.6.9 洗脱溶剂用量 按上述优化条件, 取 MOIG 供试品溶液进行试验。吸附完毕后, 先用 7 BV 的水洗脱, 再用 10% 乙醇洗脱, 洗脱流速为 3.0 BV/h, 每 1 BV 收集 1 份洗脱液, 按 1.3 项方法检测洗脱

液中 MOIG 的质量浓度,重复 3 次,以确定最佳洗脱溶剂用量。

1.6.10 验证试验 按优选条件进行验证:上样液中 MOIG 的质量浓度为 19.15 mg/mL, pH 值为 1.0,树脂柱的径高比为 1:7,上样流速为 2.0 BV/h,上样体积为 0.75 BV,树脂吸附 11 h 后用 7 BV 水洗脱以除去其他成分,10%乙醇以 3.0 BV/h 流速进行洗脱,收集 10%乙醇洗脱部位,减压浓缩得 MOIG。进行 3 次平行试验和 3 次放大试验,按 1.3 项方法分别测定样品中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量,计算转移率。

### 1.7 MOIG 对破骨细胞的作用

1.7.1 MOIG 溶液配制 精密称取按 1.6.10 项方法制备得到的 MOIG 5 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)溶解,定容,得到质量浓度为 0.5 mg/mL 的储备液。

1.7.2 破骨细胞的诱导与培养 取 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠[购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002],脱颈椎处死后,用 75%乙醇浸泡 5~10 min。超净台中取下胫骨和股骨,用 5 mL 注射器吸取  $\alpha$ -MEM 培养液将骨髓腔内的骨髓细胞冲出,收集冲洗液,225×g 离心 10 min,细胞用 PBS 冲洗 2 次,得新鲜骨髓单核细胞<sup>[13]</sup>。用含 5 ng/mL M-CSF 和 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液培养细胞,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。将未贴壁细胞转移至离心管中,225×g 离心 10 min,收集底部细胞用含 30 ng/mL M-CSF 和 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液培养,以  $1 \times 10^5$ /mL (MTT 实验)、 $1 \times 10^6$ /mL (TRAP 染色)细胞密度接种于 96 孔板中。第 3 天换含 30 ng/mL M-CSF 和 50 ng/mL sRANKL 及 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养液培养,每 3 d 换液 1 次,8 d 后破骨细胞分化成熟。

1.7.3 破骨细胞形态观察及鉴定 按照文献[14]方法,用 TRAP 染色试剂盒对诱导的破骨细胞进行染色。

1.7.4 MTT 破骨细胞增殖测定<sup>[15]</sup> 破骨细胞以  $1 \times 10^5$ /mL 细胞密度接种于 96 孔板中。第 3 天换含 30 ng/mL M-CSF 和 1.7.1 项 MOIG 储备液稀释得到质量浓度为 0.1、1、10  $\mu$ g/mL 的 MOIG 的培养液,2 d 后称取 MTT 50 mg 溶于 10 mL PBS 中,避

光震荡 30 min,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌,分装于避光离心管中,4 °C 保存、备用。细胞中加入 100  $\mu$ L 无血清  $\alpha$ -MEM 培养液和 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 h 后,于 450 nm 波长处测定光密度(D)值。

1.7.5 破骨细胞 TRAP 活性的测定<sup>[16-17]</sup> 破骨细胞以  $1 \times 10^6$ /mL 细胞密度接种于 96 孔板中。第 3 天换含 30 ng/mL M-CSF 和 50 ng/mL sRANKL 及 1.7.1 项 MOIG 储备液稀释得到质量浓度为 0.04、0.4、4  $\mu$ g/mL 的 MOIG 的培养液,第 9 天弃去旧液,加入 1% Triton X-100 20  $\mu$ L 室温破细胞膜 30 min 后,加入反应液 100  $\mu$ L (0.02 g 对硝基苯基磷酸二钠,用去离子水溶解,加入 0.1 g 酒石酸钾钠,加水溶解至 7.5 mL, HCl 调节 pH 至 3.5,加水定容至 10 mL),于 37 °C 孵育 30 min 后,迅速加入 1 mol/L NaOH 溶液 100  $\mu$ L 终止反应,于 405 nm 波长处测定 D 值。以对硝基苯酚溶液作标准线,TRAP 活性用每孔破骨细胞生成的对硝基苯酚的纳摩尔数表示。

1.8 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 树脂型号的选择 大孔树脂 AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HPD600、HP20、S-8、SP850、XDA-1 和 XDA-16 的静态吸附-解吸附性能的结果如表 1 所示,XDA-1 型大孔树脂对 MOIG 的吸附量为  $(38.29 \pm 1.31)$  mg/g,水的解吸附率较小,为  $(19.00 \pm 0.82)$ %,而 95%乙醇的解吸附率较大,为  $(75.09 \pm 2.36)$ %,故选择 XDA-1 型大孔树脂富集 MOIG。

### 2.2 XDA-1 型大孔树脂富集 MOIG 的性能考察

2.2.1 上样液质量浓度 上样液中 MOIG 质量浓度为 19.15、15.32、11.49、7.66、3.83 mg/mL 时,XDA-1 型大孔树脂吸附量分别为  $(70.40 \pm 1.13)$ 、 $(62.44 \pm 2.29)$ 、 $(53.78 \pm 0.83)$ 、 $(37.09 \pm 1.12)$ 、 $(20.42 \pm 0.31)$  mg/g,故选择最佳质量浓度为 19.15 mg/mL (按生药计 1.0 g/mL)。

2.2.2 pH 条件 上样液的 pH 值分别为 1.0、3.0、

5.0、7.0、9.0 时, XDA-1 型大孔树脂对 MOIG 的吸附量分别为 (95.42±0.71)、(76.63±0.64)、(74.19±0.61)、(71.18±1.09)、(62.16±

0.33) mg/g, 表明随着 pH 值的降低, XDA-1 型大孔树脂对 MOIG 的吸附量增加, 当 pH 值降到 1.0 时树脂的吸附量最大, 故选择上样液的 pH 值为 1.0。

表 1 10 种大孔树脂对 MOIG 的吸附量和解吸附率

Tab 1 Adsorption capacity and desorption rate of 10 macroporous resins for MOIG

$n=3, \bar{x} \pm s$

Type	Adsorption capacity $w_B/(mg \cdot g^{-1})$	Water desorption rate (%)	95% Ethanol desorption rate (%)
AB-8	19.44±1.20	27.26±1.51	8.30±0.50
ADS-17	14.63±0.34	24.54±0.97	4.97±0.18
D101	15.93±0.78	36.27±1.79	8.06±0.32
HPD400	17.39±1.41	26.60±1.93	8.57±0.72
HPD600	16.95±1.12	27.75±2.04	7.76±0.50
HP20	19.36±0.48	23.32±0.63	7.39±0.98
S-8	16.07±0.08	27.48±1.56	8.08±0.12
SP850	21.46±0.46	28.51±0.54	16.68±1.00
XDA-1	38.29±1.31	19.00±0.82	75.09±2.36
XDA-16	18.28±0.22	26.87±1.34	10.21±0.19

MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides

2.2.3 静态吸附动力学 XDA-1 型大孔树脂在不同时间点吸附 MOIG 的结果见图 1。XDA-1 型大孔树脂在 1 h 内的吸附速率很快, 3 h 后开始变缓, 11 h 基本稳定, 此时总的比吸附量为 (90.18±0.44)

速分别通过径高比为 1:3、1:5、1:7、1:9、1:11 的 XDA-1 型大孔树脂柱时, 其对 MOIG 的吸附率分别为 (79.18±0.84)%、(88.01±2.64)%、(93.04±1.05)%、(96.90±0.51)%、(97.48±0.05)%, 表明随着径高比的增大吸附率逐渐增加, 当径高比大于 1:7 时吸附率增加变缓, 考虑实际操作难度最终选择径高比为 1:7。

mg/g, 因此确定树脂吸附 11 h 后进行洗脱。

2.2.6 上样量 结果显示, 当上样量为 0.75 BV 时 MOIG 基本被树脂吸附, 当上样量大于 0.75 BV 时开始出现泄露, 上样量为 7 BV 时达到动态平衡, 最大动态吸附量为 (97.28±1.94) mg/g, 为确保吸附完全, 选择最大上样量为 0.75 BV。见图 2。

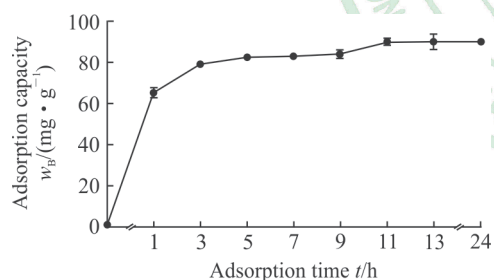


图 1 XDA-1 型大孔树脂在不同时间点对 MOIG 的吸附能力

Fig 1 Adsorption capacity of XDA-1 macroporous resin for MOIG at different time points

MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides.  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.4 上样流速 当上样流速为 1.0、2.0、3.0、4.0 BV/h 时, XDA-1 型大孔树脂对 MOIG 的吸附率分别为 (91.01±0.43)%、(90.62±0.38)%、(84.21±1.77)%、(81.55±0.90)%, 表明吸附率随上样流速的增大而降低。当上样流速在 1.0 BV/h 和 2.0 BV/h 时吸附率均较大, 综合分析选择上样流速为 2.0 BV/h。

2.2.5 柱径高比 MOIG 供试品溶液以 2.0 BV/h 的流

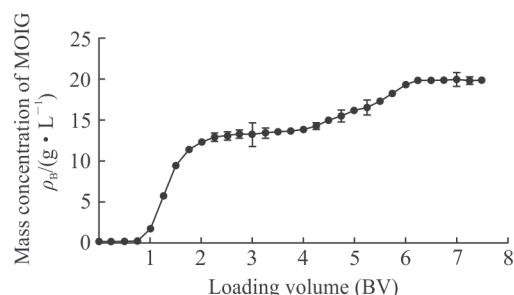


图 2 上样量考察

Fig 2 Investigation of loading amount

1 BV=80 mL. MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides; BV: Bed volume.  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.7 洗脱溶剂 结果显示, 水和 10%、30%、50% 乙醇的累积洗脱率分别为 (18.62±1.11)%、

(94.85±0.95)%、(98.59±1.07)%、(98.74±1.09)%，10%乙醇可以将大部分的MOIG从XDA-1型大孔树脂洗脱，故确定10%乙醇为洗脱溶剂。

2.2.8 洗脱流速和溶剂用量 用10%乙醇以1.0、2.0、3.0、4.0 BV/h的流速洗脱时，MOIG的洗脱率分别为(80.03±2.07)%、(78.36±0.90)%、(77.09±1.56)%、(72.78±2.62)%，1.0~3.0 BV/h下降趋势缓慢，至4.0 BV/h时下降趋势增加，故选择3.0 BV/h作为最佳洗脱流速。

通过监测每1 BV洗脱液中MOIG的质量浓度，发现7 BV以后的洗脱液中MOIG含量极少，故确定洗脱剂用量为7 BV(图3)。

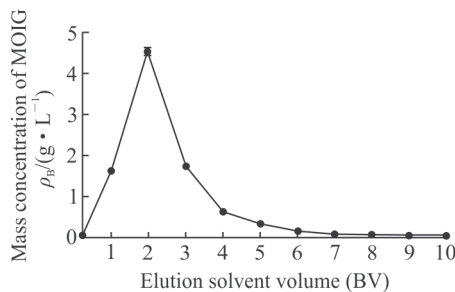


图3 洗脱溶剂用量考察

Fig 3 Investigation of elution solvent volume

1 BV=80 mL. MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides. BV: Bed volume. n=3,  $\bar{x} \pm s$

2.2.9 验证试验 3次平行试验和放大试验的结果(表2)表明，MOIG经XDA-1型大孔树脂纯化后，MOIG中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的总含量达54%以上，表明该优选工艺稳定、可靠。

2.3 MOIG对破骨细胞的作用

2.3.1 MOIG对破骨细胞增殖的影响 成熟的破骨细胞经TRAP染色后，破骨细胞呈油煎鸡蛋形，细胞质染成紫色，细胞内可见多个细胞核，呈现圆形和椭圆形(图4)。MOIG给药浓度分别为0.1、1、10 μg/mL，给药后测得的D值分别为1.11±0.14、1.11±0.18、1.11±0.13，未给药组细胞D值为1.03±0.12，表明任一质量浓度的MOIG对破骨细胞的增殖均无明显影响。

2.3.2 MOIG对破骨细胞TRAP活性的影响 结果显示，空白对照组破骨细胞TRAP活性为100.01±13.92，0.04、0.4、4 μg/mL MOIG给药后测得的TRAP活性分别为62.85±16.80、50.29±1.42、53.13±10.41，分别比空白对照组降低37.16%(P<0.05)、49.71%(P<0.01)、46.88%(P<0.01)。表明MOIG可抑制破骨细胞TRAP活性，从而抑制了破骨细胞的骨吸收。

表2 XDA-1型大孔树脂富集MOIG的相关参数

Tab 2 Related parameters of XDA-1 macroporous resin enriching MOIG

Group	Dosage m/g	MOIG yield m/g	Extract yield (%)	Content of MON from MOIG (%)	Content of DA from MOIG (%)	Total transfer rate of MON and DA (%)
Parallel verification 1	60	1.18	1.97	35.88	25.86	66.91
Parallel verification 2	60	1.24	2.07	31.25	23.26	69.74
Parallel verification 3	60	1.37	2.28	32.80	22.95	70.13
Magnified verification 1	1 000	24.60	2.46	44.80	19.30	76.45
Magnified verification 2	1 000	24.30	2.43	38.57	23.62	76.47
Magnified verification 3	1 000	29.80	2.98	45.40	19.81	82.19

MOIG: *Morinda officinalis* iridoid glycosides; MON: Monotropein; DA: Deacetyl asperulosidic acid

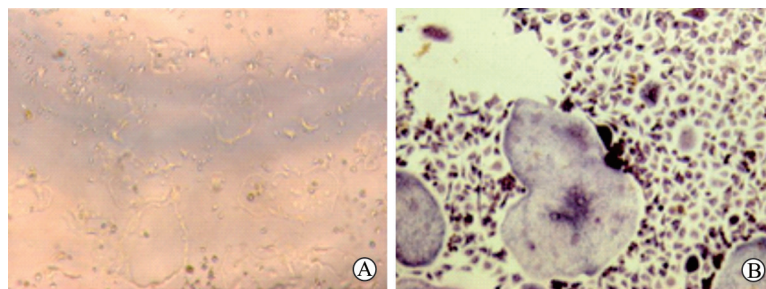


图4 成熟破骨细胞(A)和TRAP染色破骨细胞(B)

Fig 4 Mature osteoclasts (A) and TRAP staining osteoclasts (B)

TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase. Original magnification: ×100

### 3 讨 论

MOIG 的极性较大, 易溶于水和乙醇, 其中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸含量较高, 二者属于同分异构体, 理化性质相似, 母核上均含有羧基, 具有一定酸性。研究表明水晶兰苷单体在酸性条件下存放 3 d 时, 有近 6% 转化为去乙酰基车叶草苷酸, 而去乙酰基车叶草苷酸单体相对稳定<sup>[12,18]</sup>。原药材经 70% 乙醇提取后水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸含量的比值约为 2:1, 经调 pH 值过大孔树脂富集后, 所得 MOIG 中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸含量比值约为 3:2, 研究表明仅有小部分水晶兰苷转化为去乙酰基车叶草苷酸<sup>[19]</sup>。本课题组进行的药效学实验表明巴戟天总提取物和 MOIG 均有抗骨质疏松作用, 故水晶兰苷的部分转化并不影响 MOIG 的药效<sup>[11]</sup>。

本研究观察了 AB-8、ADS-17、D101、HPD400、HP20、SP850、XDA-1 和 XDA-16 等非极性树脂, 以及 S-8 和 HPD600 等极性树脂对 MOIG 的吸附和解吸附作用, 筛选合适的树脂型号。结合本课题组前期正交试验优化的 MOIG 提取工艺<sup>[11]</sup>, 本实验以水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸为指标成分进行研究, 结果表明 XDA-1 型大孔树脂能更好地富集 MOIG, 经大孔树脂富集后 MOIG 中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的总含量达 54% 以上, 浸膏得率为 2% 左右, 转移率达 60% 以上。富集过程中除去了大量杂质, 提高了所得物中 MOIG 的纯度, 从而减少了药物剂量。

王玉磊<sup>[20]</sup>用大孔树脂、活性炭从巴戟天中分离纯化水晶兰苷, 操作过程烦琐, 且含量仅从 2% 提高到 6% 左右。彭朵花等<sup>[21]</sup>先用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取后, 再经 D101 型大孔树脂富集, 操作步骤复杂。而本实验用 XDA-1 型大孔树脂富集后, MOIG 含量从原药材的 2% 提高至 54% 以上, 且实际操作简单, 工艺稳定。

本课题组前期研究表明, MOIG 能减缓佐剂和 II 型胶原诱导的大鼠类风湿性关节炎的发生和骨质丢失, 显示出良好的抗骨质疏松和抗炎作用(未发表资料)。基于上述发现, 我们进行了 MOIG 的富集研究, 以期将其研制成防治炎症性骨丢失的药物。本实验研究了 MOIG 对破骨细胞的增殖

和 TRAP 活性的影响, 结果表明 MOIG 浓度在 0.04~4 μg/mL 范围内均能抑制破骨细胞 TRAP 活性, 降低破骨细胞的骨吸收能力, 抑制骨丢失, 为本课题组后期研究 MOIG 对破骨细胞的作用和抗骨质疏松机制奠定了基础。而制备得到的 MOIG 中仅由其中的环烯醚萜苷类成分发挥药理作用还是其他成分同时发挥作用, 有待于进一步深入研究。

综上所述, XDA-1 型大孔树脂可用于富集 MOIG, 且其含量达 54% 以上, 因此可将其制备成需要的药物剂型, 为进一步的临床应用奠定了基础。MOIG 对破骨细胞性骨吸收的抑制作用也为将中药巴戟天开发成抗骨质疏松的中药新药提供了科学依据。

### [参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 81.
- [2] ZHANG J H, XIN H L, XU Y M, SHEN Y, HE Y Q, HSIEN-YEH, et al. *Morinda officinalis* How. — a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 213: 230-255.
- [3] XU L Z, XU D F, HAN Y, LIU L J, SUN C Y, DENG J H, et al. BDNF-GSK-3β-β-catenin pathway in the mPFC is involved in antidepressant-like effects of *Morinda officinalis* oligosaccharides in rats[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017, 20: 83-93.
- [4] QIU Z K, LIU C H, GAO Z W, HE J L, LIU X, WEI Q L, et al. The inulin-type oligosaccharides extract from *Morinda officinalis*, a traditional Chinese herb, ameliorated behavioral deficits in an animal model of post-traumatic stress disorder[J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31: 1143-1149.
- [5] LIANG J, LIANG J W, HAO H R, LIN H, WANG P, WU Y F, et al. The extracts of *Morinda officinalis* and its hairy roots attenuate dextran sodium sulfate-induced chronic ulcerative colitis in mice by regulating inflammation and lymphocyte apoptosis[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 905-922.
- [6] LEE Y K, BANG H J, OH J B, WHANG W K. Bioassay-guided isolated compounds from *Morinda officinalis* inhibit Alzheimer's disease pathologies[J/OL]. *Molecules*, 2017, 22: E1638. doi: 10.3390/molecules22101638.
- [7] ZHANG H L, LI J, XIA J M, LIN S Q. Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 7-12.

- [8] WANG F, WU L, LI L, CHEN S. Monotropein exerts protective effects against IL-1 $\beta$ -induced apoptosis and catabolic responses on osteoarthritis chondrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23: 575-580.
- [9] ZHANG Z G, ZHANG Q Y, YANG H, LIU W, ZHANG N D, QIN L P, et al. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* increases osteoblastic bone formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 166-172.
- [10] SHIN J S, YUN K J, CHUNG K S, SEO K H, PARK H J, CHO Y W, et al. Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* ameliorates proinflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF- $\kappa$ B inactivation[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 53: 263-271.
- [11] HE Y Q, YANG H, SHEN Y, ZHANG J H, ZHANG Z G, LIU L L, et al. Monotropein attenuates ovariectomy and LPS-induced bone loss in mice and decreases inflammatory impairment on osteoblast through blocking activation of NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 291: 128-136.
- [12] 张建花,许月明,何玉琼,宋洪涛,杜娟,张巧艳. 巴戟天环烯醚萜苷类成分含量测定和提取方法的研究[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35: 328-333.
- [13] HONG J M, KANG K S, YI H G, KIM S Y, CHO D W. Electromagnetically controllable osteoclast activity[J]. *Bone*, 2014, 62: 99-107.
- [14] SONG T F, LIN T, MA J, GUO L, ZHANG L, ZHOU X H, et al. Regulation of TRPV5 transcription and expression by E2/ER $\alpha$  signalling contributes to inhibition of osteoclastogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 4738-4750.
- [15] GRELA E, KOZŁOWSKA J, GRABOWIECKA A. Current methodology of MTT assay in bacteria—a review[J]. *Acta Histochem*, 2018, 120: 303-311.
- [16] YAN X T, LEE S H, LI W, JANG H D, KIM Y H. Terpenes and sterols from the fruits of *Prunus mume* and their inhibitory effects on osteoclast differentiation by suppressing tartrate-resistant acid phosphatase activity[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38: 186-192.
- [17] 张乃丹,蒋益萍,薛黎明,韩婷,张巧艳,辛海量. 仙茅酚苷类成分促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37: 562-568.
- ZHANG N D, JIANG Y P, XUE L M, HAN T, ZHANG Q Y, XIN H L. Phenolic glycosides in *Curculigo orchioides* promotes osteoblastic bone formation and inhibits osteoclastic bone resorption[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2016, 37: 562-568.
- [18] 王玉磊,黄世敬,迟德军,李强,雷海民,崔翰明. 巴戟天中主要环烯醚萜苷的稳定性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17: 65-68.
- [19] SHEN Y, ZHANG Q, WU Y B, HE Y Q, HAN T, ZHANG J H, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of monotropein and deacetyl asperulosidic acid after oral administration of extracts from *Morinda officinalis* root in rats[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18: 288. doi: 10.1186/s12906-018-2351-1.
- [20] 王玉磊. 巴戟天中主要环烯醚萜苷的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.
- [21] 彭朵花,周芳,欧阳文,杜方麓. 巴戟天中水晶兰苷的提取分离及其含量测定[J]. *中南药学*, 2008, 16: 705-707.

[本文编辑] 尹 茶