



海军军医大学学报

Academic Journal of Naval Medical University

ISSN 2097-1338, CN 31-2187/R

《海军军医大学学报》网络首发论文

题目：金茵利胆胶囊的体外抗炎活性评价及其谱效关系
作者：曹凡, 宋忠兴, 陈琳, 唐志书, 倪健, 张德柱
DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220091
收稿日期: 2022-01-24
网络首发日期: 2023-04-13
引用格式: 曹凡, 宋忠兴, 陈琳, 唐志书, 倪健, 张德柱. 金茵利胆胶囊的体外抗炎活性评价及其谱效关系[J/OL]. 海军军医大学学报.
<https://doi.org/10.16781/j.CN31-2187/R.20220091>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

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)

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

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 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞炎症模型, 检测细胞上清中 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, 以高效液相法建立其指纹图谱, 并进行抗炎活性测定; 以细胞上清液中 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) 能降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO、TNF- α 和 IL-6。经对照品比对指出其中 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。抗炎谱效关系结果表明, 23 个共有峰均具有一定的抗炎贡献度, 其中共有峰峰 21 (柚皮苷)、峰 23 (新橙皮苷) 与 3 个细胞炎症指标 (NO、TNF- α 、IL-6) 关联度均大于 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, 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; RAW264.7; 抗炎; 均匀设计; 谱效关系

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

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

CAO Fan¹, SONG Zhong-xing², CHEN Lin²✉, 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 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

收稿日期: 2022-01-24

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项目 (81904047), 陕西省千人计划区域青年人才项目 (2018)。

作者简介: 曹凡, 硕士生。E-mail: 1425913368@qq.com

Fund: 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 of "Thousand Talents" Program of Shaanxi Province (2018).

网络首发时间: 2023-04-13 12:46:21 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2187.R.20230413.1029.001.html>

indexes, and the correlation between the anti-inflammatory spectrum and the common peak area was established by grey correlation 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 RAW264.7 cells. Seven chromatographic peaks were identified by reference substance comparison, which were neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid, *p*-hydroxyacetophenone, naringin, and neoperidin. The 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 common peak 21 (naringin) and peak 23 (nehesperidin) 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 it provides reference for the improvement of the substance basis and quality control of *JinYin LiDan* capsule.

Key words *JinYin LiDan* capsule; RAW264.7; anti-inflammatory; design by uniform distribution; spectrum-effect relation

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、食少纳呆等症状的改善。金茵利胆复方制剂在临床上对非酒精脂肪肝^[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关系, 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的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、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 (NaNO₂, 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, 成都市科隆化学品有限公司); 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 (SW-CJ-2FD, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); CO₂ 细胞培养箱 (型号 311)、多功能酶标仪 (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 数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); VORTEX-5 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% PBS 的完全培养基（含双抗）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/孔密度接种于 96 孔板中。培养 4 h 后，分别加入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 120 μL MTT 工作液（基础培养基：MTT=100：20），培养箱中孵育 4 h 后，弃去培养基，每孔加入 DMSO 150 μL ，多功能微孔板检测仪在 490 nm 波长处测定光密度值，条件设置震荡 3 min。计算细胞存活率，上述实验重复 3 次。选取适宜的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 细胞接种于 96 孔板，每孔接种含 2.0×10^5 个细胞，培养 4 h 后，弃去上清，加入基础培养基和适宜浓度的金茵利胆胶囊工作液，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，除空白组外其余均加入 10 μL 的 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 溶液，刺激 18 h，每组设置 3 个复孔。作用结束后，弃去上清，加入 120 μL (5 mg/mL) MTT 溶液，在培养箱中放置 4 h 后，弃去培养基，加入 150 μL 的 DMSO，在酶标仪上振荡 3 min 后测量各孔在 490 nm 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/孔接种于 96 孔板，细胞悬液 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。空白组每孔重新加入 100 μL 基础培养基，模型组每孔重新加入 90 μL 基础培养基，给药组每孔重新加入 80 μL 基础培养基，并分别给予工作液浓度为 0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊工作液，药物作用 2 h 后，模型组、给药组同时给予 10 μL LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) 刺激细胞。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 处检测细胞培养液中 NO 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 项步骤相同，分组后给药组每孔重新加入 80 μL 基础培养基，给予工作液浓度为 1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊提取物工作液，后续步骤同 1.3.4 项。

1.4 金茵利胆胶囊 UPLC-MS/MS 化学成分表征

1.4.1 分析条件

质谱条件为 ESI 离子源；正、负离子模式采集数据，源喷射电压分别为 5 500、-4 500V，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 (TOF-MS)、子离子的扫描范围均为 m/z 100~2 000。

色谱条件为 ZORBAX SB- C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱，使用 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相，梯度洗脱条件：0~5 min, 2%~5% B；5~10 min, 5%~11% B；10~12 min, 11%~11.5% B；12~16 min, 11.5%~15% B；16~24 min, 15%~23% B；24~36 min, 23%~40% B；36~44 min, 40%~55% B；44~46 min, 55%~70% B；46~53 min, 70%~80% B；53~55 min, 80%~2% B；柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ ；流量 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 °C), 放冷后, 70% 甲醇补足, 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

UPLC-Q-TOF-MS/MS 检测金茵利胆胶囊化学成分, 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 稀释配制终浓度为 20 mg/mL 供试品储备溶液 (DMSO 含量不超过 0.2%), 4 °C 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 1.00 mg/mL, 稀释 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 mg

Sample	Oriental wormwood	<i>Lysimachia christinae</i> Hance	Radix curcumae	Fructus aurantii
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

色谱柱 InertSustain C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相 0.05% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~12% B; 8~14 min, 12%~15% B; 14~26 min, 15%~27% B; 26~30 min, 27%~28% B; 30~41 min, 28%~40% B; 41~54 min, 40%~80% B; 54~55 min, 80%~5% B; 55~65 min, 5% B, 后运行 5 min; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长为 282 nm; 进样量 5 μL。

1.5.3 溶液的制备

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, 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, 配成稀释后各对照品质量浓度分别为 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 °C 保存, 备用。

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 °C), 放冷后, 70% 甲醇补足, 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 项。

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 项。

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

TNF- α 和 IL-6 的检测方法同 1.3.5 项, NO 的检测方法同 1.3.4 项。

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 - 对照组 NO 含量) / 模型组 NO 含量] \times 100%; TNF- α 抑制率 (%) = [(模型组 TNF- α 含量 - 对照组 TNF- α 含量) / 模型组 TNF- α 含量] \times 100%; IL-6 抑制率 (%) = [(模型组 IL-6 含量 - 对照组 IL-6 含量) / 模型组 IL-6 含量] \times 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 的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 X_i (i 表示共有峰编号 1、2、3、...、23), 各比较数列与参考数列的关联系数 $A_i(k)$ 可由下列公式计算: $A_i(k) = [\Delta i(k)_{\min} + \rho \times \Delta i(k)_{\max}] / [\Delta i(k) + \rho \times \Delta i(k)_{\max}]$, 其中 $\Delta i(k) = Y(k) - X_i$, 分辨系数 $\rho = 0.5$ 。

关联系数 $A_i(k) \geq 0.9$ 表示有显著影响; $0.9 > A_i(k) \geq 0.8$ 表示有比较高的影响, $0.8 > A_i(k) \geq 0.7$ 表示有较为明显的影响, $0.7 > A_i(k) \geq 0.6$ 表示影响较小, $A_i(k) < 0.6$ 表示没有影响^[15]。

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, 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对 RAW264.7 细胞毒性的影响

工作液浓度分别为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 时 RAW264.7 细胞存活率分别为 (117.42 \pm 16.71)%、(115.61 \pm 20.89)%、(132.63 \pm 16.87)%、(140.56 \pm 15.95)%、(128.18 \pm 17.70)%, 其中 0.50 mg/mL 浓度下的细胞存活率与对照组 [(100.00 \pm 17.22)%] 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明金茵利胆胶囊提取物对 RAW264.7 细胞无毒性。

2.1.2 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响

与空白对照组 [细胞存活率为 (100.00 \pm 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 \pm 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 \pm 3.88)% ($P > 0.05$)、(96.01 \pm 5.73)% ($P < 0.01$)、(100.42 \pm 5.10)% ($P < 0.01$)、(98.93 \pm 4.31)% ($P < 0.01$)。

2.1.3 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液 NO 含量的影响

与空白组 [(1.13 \pm 0.02) μ mol/L] 相比, 模型组能够诱导 RAW264.7 细胞分泌 NO [(35.64 \pm 0.01) μ mol/L, $P < 0.01$]。与模型组相比, 0.10、0.25、0.50、1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌 NO, 分别为 (34.82 \pm 0.01) μ mol/L ($P > 0.05$)、(30.21 \pm 0.04) μ mol/L ($P < 0.01$)、(29.03 \pm 0.04) μ mol/L ($P < 0.01$)、(19.39 \pm 0.02) μ mol/L ($P < 0.01$)。

2.1.4 金茵利胆胶囊提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 TNF- α 和 IL-6 含量的影响

结果如表 2 所示, 1.00 mg/mL 金茵利胆胶囊提取物的 TNF- α 和 IL-6 水平均低于模型组, 表明其对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液分泌 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 TNF- α and IL-6 secretion of LPS-induced RAW264.7 cells (pg·mL⁻¹), $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Group	TNF- α	IL-6
Contol	24.99 \pm 1.26	17.98 \pm 2.31
Model	1 538.43 \pm 78.20**	393.54 \pm 6.90**
<i>JinYin LiDan</i> capsule	1 104.70 \pm 40.27 $\Delta\Delta$	252.17 \pm 16.20 $\Delta\Delta$

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

2.2 UPLC-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)。

表3 金茵利胆胶囊UPLC-Q-TOF成分表征结果
 Tab 3 Characterization results of UPLC-Q-TOF components of *JinYin LiDan* 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 ₉ H ₁₀ O	134.175 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 4	11.75
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.153 4	13.51
Isochlorogenic acid A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.163 2	14.32
Neoericiotin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596.174 1	17.76
Isochlorogenic acid B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.184 3	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	448.100 6	25.51
Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.535 0	26.30
Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.189 8	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

UPLC-Q-TOF: Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry.

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)》, 得到的 HPLC 叠加色谱图, 与金茵利胆胶囊的色谱峰保留时间相对比并标记 N0~N6 样品中的共有峰, 见图 1。

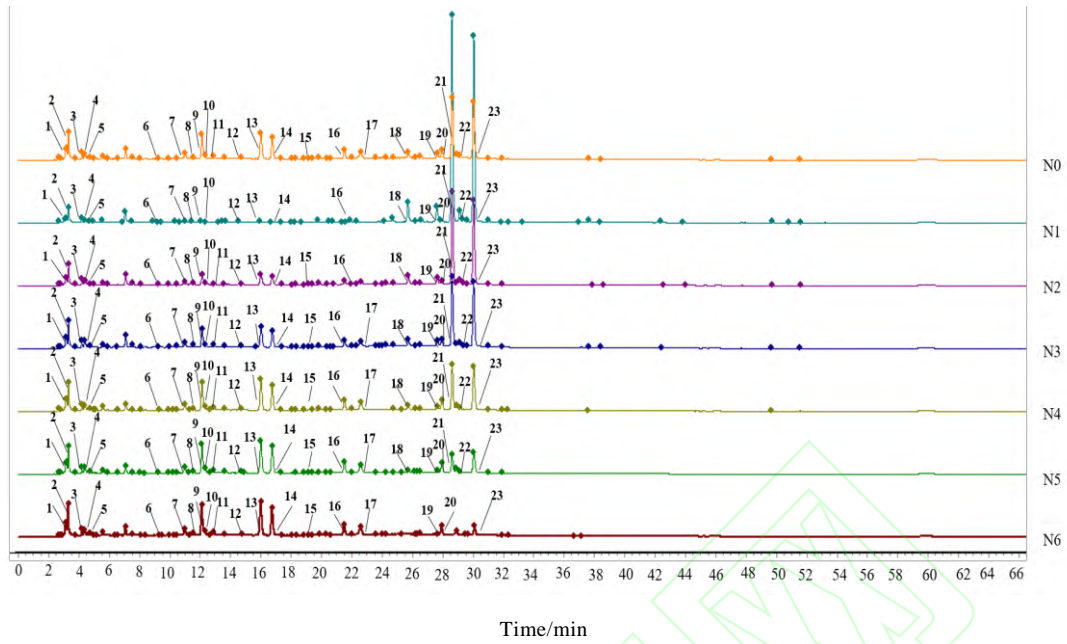


图 1 均匀设计 7 个样品的 HPLC 图
Fig 1 HPLC diagram of uniformly designed 7 samples

N0-N6 were uniformly designed samples. HPLC: High-performance liquid chromatography.

2.3.2 金茵利胆胶囊共有峰的指认

根据 UPLC-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。

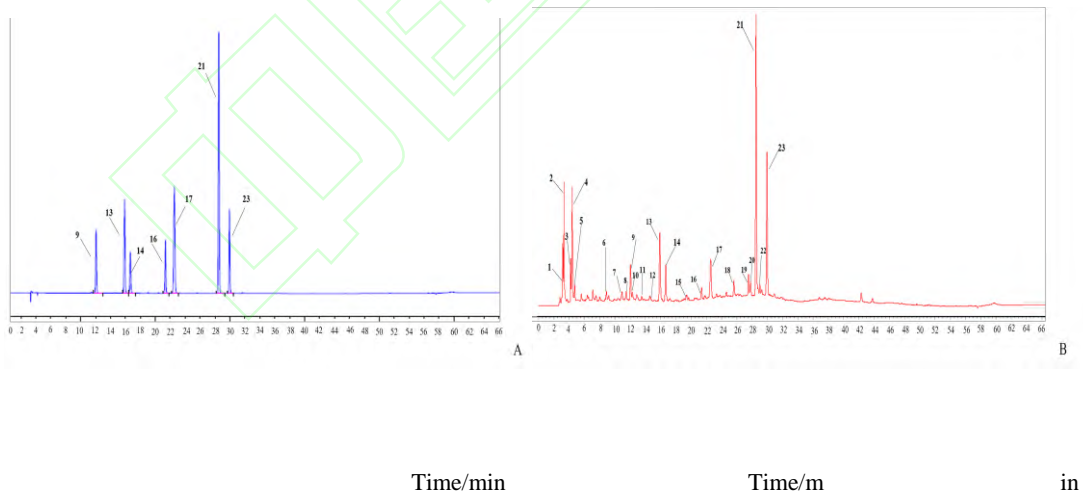


图 2 混合对照品 (A) 和金茵利胆胶囊 (B) 的 HPLC 图
Fig 2 HPLC figures of mixed reference substance (A) and *JinYin LiDan* capsule (B)

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

2.3.3 均匀设计样品对 RAW264.7 细胞毒性的影响

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。

表4 均匀设计样品N0~N6对细胞活力的影响

Tab 4 Effect of N0-N6 on cell viability of uniformly designed samples

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

Concentration/(mg · mL ⁻¹)	N0	N1	N2	N3	N4	N5	N6
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±3.65	114.68±3.53	130.92±26.68	153.37±6.16	130.92±26.68	119.27±9.32
0.10	110.52±10.72	107.86±4.32	115.61±22.86	150.39±3.85	148.33±6.56	150.39±3.85	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±4.81	123.09±9.35	133.79±16.93	152.52±22.00	133.79±16.93	168.77±11.64

N0-N6 were uniformly designed samples.

2.3.4 均匀设计样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症损伤的细胞活力对影响

对照组、模型组、均匀设计样品 N0~N6 对 LPS 诱导 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 RAW264.7 的细胞有一定的促增殖作用。

2.3.5 均匀设计样品对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF- α 和 IL-6 含量的影响

结果如表 5 所示，均匀设计样品 N0~N6 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF- α 和 IL-6 含量均有一定的抑制作用。

表5 均匀设计样品N0~N6对LPS诱导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($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	TNF- α ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Control	0.69±0.21	25.28±0.25	17.66±1.73
Model	22.18±0.21**	1551.94±128.97**	416.04±39.27**
N0	17.00±1.99 Δ	1081.87±48.73 $\Delta\Delta$	247.86±13.67 Δ
N1	21.73±1.08	860.47±18.19 Δ	295.74±10.28 Δ
N2	18.70±0.91 $\Delta\Delta$	938.78±84.64 Δ	302.23±17.46 Δ
N3	19.84±1.24 Δ	1291.49±24.66 Δ	326.95±43.15
N4	21.33±0.95	1232.90±112.49	381.82±42.21 Δ
N5	20.69±0.52 Δ	1209.04±46.09	365.31±29.65
N6	23.97±0.99	1858.43±205.85	426.43±2.44

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group. N0-N6 were uniformly designed samples. NO: Nitric oxide; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-6: Interleukin 6.

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 1.7 项下公式进行抗炎指标数据转化，抑制率结果见表 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 (inhibition ratio) of data transformation of anti-inflammatory indexes of uniformly designed samples N0-N6 %, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

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

N0-N6 were uniformly designed samples. NO: Nitric oxide; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; IL-6: Interleukin 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 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响。

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 inhibition rate

Peak No.	Correlation coefficient	Peak No.	Correlation coefficient
F8	0.884	F3	0.773
F12	0.829	F15	0.773
F1	0.796	F5	0.772
F7	0.792	F6	0.771
F20	0.786	F11	0.769
F22	0.784	F17	0.760
F9	0.783	F10	0.758
F16	0.782	F21	0.754
F4	0.779	F19	0.751
F13	0.779	F18	0.750
F14	0.778	F23	0.747
F2	0.777		

N0-N6 were uniformly designed samples. 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 inhibition rate

Peak No.	Correlation coefficient	Peak No.	Correlation coefficient
F23	0.784	F20	0.677
F19	0.776	F5	0.664
F18	0.775	F7	0.663
F21	0.774	F9	0.655
F3	0.739	F16	0.652
F22	0.736	F14	0.650
F12	0.726	F13	0.648
F8	0.722	F17	0.645
F6	0.710	F11	0.638

F2	0.699	F15	0.637
F1	0.690	F10	0.621
F4	0.684		

N0-N6 were uniformly designed samples. HPLC: High-performance liquid chromatography; TNF- α : Tumor necrosis factor α .

表 9 均匀设计样品N0~N6HPLC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 inhibition rate

Peak No.	Correlation coefficient	Peak No.	Correlation coefficient
F8	0.897	F23	0.753
F22	0.827	F5	0.751
F12	0.800	F7	0.739
F3	0.790	F9	0.728
F6	0.788	F16	0.726
F2	0.785	F13	0.723
F1	0.766	F14	0.723
F21	0.766	F15	0.717
F18	0.762	F10	0.715
F19	0.760	F11	0.713
F4	0.756	F17	0.703
F20	0.755		

N0-N6 were uniformly designed samples. 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^[16]。本研究是通过建立 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。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 含量的测定来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够全面评价出金茵利胆胶囊的质量。基于指纹图谱的谱效学研究能够将中药化学成分的量及其药效结合起来, 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^[17]。

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, 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, 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(新橙皮苷)、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, 以评价其

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。

[本文编辑] 尹 茶

[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]//2016 年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集.北京,2016:1902-1907.
- [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,龚焱婷,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,黄速,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] 陈淮臣,刘文,何利,石亚,王冠华,刘巍,等.经典名方桃核承气汤抗炎作用的谱效关系研究[J].时珍国医国药,2021,32:1-5.
- [15] 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.
- [16] 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 EB13 expression[J/OL]. PLoS One, 2013, 8: e63967. DOI: 10.1371/journal.pone.0063967.
- [17] 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.