

川牛膝化学拆分组分的制备及其免疫调节作用

孙传鑫, 郭晶, 王秋红, 孟永海, 杨炳友, 匡海学*

(黑龙江中医药大学 北药基础与应用研究教育部重点实验室, 黑龙江省中药
及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:** 制备川牛膝化学拆分组分, 并研究川牛膝水煎液及其各化学拆分组分对免疫调节的影响。**方法:** 采用水煎煮、醇沉、大孔吸附树脂柱色谱分离技术的联合应用, 将川牛膝水煎液的化学成分拆分为成分之间互不交叉的以下几部分: 多糖组分, 20% 乙醇洗脱组分, 甾酮组分和脂肪油组分, 对其进行化学特征研究并运用 HPLC 对各化学拆分组分进行互不交叉性研究。考察川牛膝水煎液及其各化学拆分组分对小鼠碳粒廓清指数和免疫器官的影响及对小鼠血清溶血素抗体生成的影响。**结果:** 建立的川牛膝化学成分拆分方法可行、稳定且重复性好, 能够实现全成分拆分, 各拆分组分间化学成分基本无交叉; 川牛膝具有一定的免疫增强作用。**结论:** 发挥免疫增强作用的药效物质基础为多糖组分和甾酮组分。

[关键词] 川牛膝; 化学拆分组分; 免疫调节作用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016020070

Resolvability of Chemical Components of Cyathulae Radix and Their Immune Regulation Effects

SUN Chuan-xin, GUO Jing, WANG Qiu-hong, MENG Yong-hai, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Northern Medicine Base and Application Under Ministry of Education, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Pharmacodynamic Material Bases of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** Preparing resolvability of chemical components of Cyathulae Radix and investigating water decoction and its chemical detached composition of Cyathulae Radix which impact on immune regulation. **Method:** We adopted the technology of hot water extraction, alcohol sedimentation and macroporous adsorptive resins to establish the split method of chemical components of Cyathulae Radix and four compositions obtained were fatty oils composition, polysaccharide composition, ketosteroid composition and 20% ethanol elution composition, respectively. We adopting the technology of high performance liquid chromatography to study their chemical property and the chemical composition was detached uncross in each composition. Investigating water decoction and its chemical detached composition of Cyathulae Radix which impact the carbon clearance index and the influence of immune organs in mice and in mice serum hemolysin antibody generatin on immune regulation. **Result:** The results indicated that establishing the detached method based on the chemical components of Cyathulae Radix was practicable, steady and good reproducibility. The characteristic of this method was holo-composition which was detached uncross in each. Cyathulae Radix had the certain effect of immunoenhancement. **Conclusion:** The effect of immunoenhancement of Cyathulae Radix which was based on polysaccharide and ketosteroid composition.

[收稿日期] 20150331(005)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531801)

[第一作者] 孙传鑫,在读博士,从事中药性味理论研究, Tel:13895789287, E-mail:sunchuanxin.007@163.com

[通讯作者] *匡海学,博士,教授,博士生导师,从事中药性味理论研究、中药复方药效物质基础及其作用机制研究

[Key words] Cyathulae Radix; chemical separation components; immune regulation effects

川牛膝功效逐瘀通经,通利关节,利尿通淋^[1]。为了阐明川牛膝发挥特定功效的药效物质基础,结合其传统用药方法,笔者采用水煎煮、醇沉和大孔吸附树脂柱色谱分离技术的联合应用将川牛膝化学成分拆分为互不交叉的几种组分并确定其发挥免疫调节作用的药效物质基础。文章报道了川牛膝化学成分拆分的制备方法和化学拆分组分的化学表征及其对免疫功能的影响。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,体重 18 ~ 22 g,合格证号 SYXK(黑)2008001,黑龙江中医药大学安全评价中心提供。

1.2 仪器 1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),ALPHA 1-4 LD plus 型冷冻干燥机(德国 Martin Christ 公司),UV-1601 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),5975C 型气-质联用仪(Agilent 公司)。

1.3 药品及试剂 川牛膝购自哈尔滨市药材公司,经黑龙江中医药大学药学院中药资源学教研室王振月教授鉴定为苋科植物川牛膝 *Cyathula officinalis* 的干燥根,SP825L 型大孔吸附树脂(日本三菱化工有限公司),碳酸氢钠(天津市风船化学试剂有限公司),生理盐水(哈尔滨三联药业有限公司),印度墨汁(德制 Chroma 牌);绵羊红细胞(SRBC,自制),补体(豚鼠血清,临配临用,自制),SA 缓冲液,都氏试剂。

2 方法与结果

2.1 多糖组分的拆分 取干燥川牛膝药材 100 g,煎煮提取 2 h,总提物冷冻干燥得川牛膝水提液干粉 25.12 g。取干粉用 3 BV 水溶解,采用 SP825L 大孔吸附树脂进行柱色谱,分别用 10 BV 水,20% 乙醇,50% 乙醇,95% 乙醇进行洗脱。收集水洗脱组分,冷冻干燥后水溶解至 0.25 g 生药/mL,搅拌水溶液同时加入 95% 乙醇,使上清液乙醇体积分数达 85%,4 ℃ 静置 24 h,离心,分别得醇沉上清液和沉淀,反复醇沉 3 次后分别合并醇沉上清液和沉淀。醇沉上清液浓缩后备用。沉淀用无水乙醇和丙酮交替洗涤除去小分子,截留相对分子质量 3 500 Da 的部分,透析袋透析后,浓缩,冻干,得川牛膝多糖组分。

2.2 川牛膝 20% 乙醇洗脱组分、甾酮组分、脂肪酸酯组分的拆分 取 2.1.1 项下的醇沉上清液和 20% 乙醇洗脱液,回收溶剂,获得 20% 乙醇洗脱组分;收集

50% 乙醇洗脱液,回收溶剂,获得甾酮组分;收集 95% 乙醇洗脱液,回收溶剂,获得脂肪油组分。

2.3 川牛膝化学拆分组分的指纹图谱研究 为评价川牛膝性味物质基础拆分方法的合理性、稳定性、重复性,本文研究了 20% 乙醇洗脱组分、甾酮组分和脂肪油组分 HPLC 指纹图谱。由于多糖极性过大,不溶于甲醇等极性较小的溶液,故其 HPLC 图呈一条直线。

2.3.1 20% 乙醇洗脱组分的 HPLC 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 60 min, 10% ~ 100% A),流速 0.9 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃,检测波长 284 nm。

2.3.2 甾酮组分的 HPLC 色谱条件 检测波长 246 nm,流动相洗脱顺序等其他色谱条件同上。

2.3.3 脂肪酸酯组分的 HPLC 色谱条件 检测波长为 262 nm,流动相洗脱顺序等其他色谱条件同上。

2.4 指纹图谱测定结果

2.4.1 川牛膝药效物质基础的拆分结果 依据川牛膝药效物质基础拆分工艺,分别获得多糖组分 15.18 g,20% 乙醇洗脱组分 9.61 g;甾酮组分 0.26 g,脂肪油组分 0.06 g。

所建立的 20% 乙醇洗脱组分、甾酮组分和脂肪酸酯组分 HPLC 指纹图谱,相似度均 > 0.9,精密度、稳定性良好。

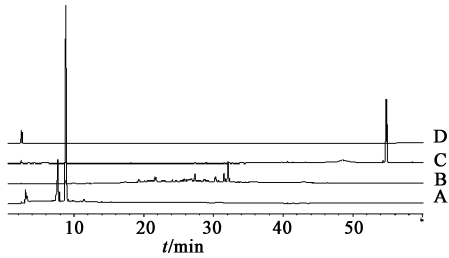
20% 乙醇洗脱组分指纹图谱确定 7 个共有峰,进行 HPLC 分析并检测 UV 光谱,结果在 220 ~ 240, 280 ~ 290 nm 内出现 2 个吸收峰,且 Molish 反应呈阳性,推测其为木脂素苷类化合物。

甾酮组分指纹图谱确定 8 个共有峰,进行 HPLC 分析并检测 UV 光谱,结果在 242 ~ 247 nm 内出现最强吸收峰,此为甾酮类化合物的特征吸收峰。进一步应用 UPLC-Q/TOF-MS 技术对甾酮组分数据采集及处理,根据质谱数据和部分对照品对照,研究发现其成分主要为杯苋甾酮,羟基杯苋甾酮,漏芦甾酮 B,森告甾酮,2,3-异亚丙二氧基杯苋甾酮,牛膝甾酮 A,头花杯苋甾酮和罗汉松甾酮 B。

所建立的脂肪酸酯组分确定 7 个共有峰,进一步进行 GC-MS 分析并检测 UV 吸收光谱,并鉴定了 23 种成分,已鉴定化合物占该组分的 83.76%,其主要含邻苯二甲酸二丁酯、棕榈酸乙酯、邻苯二甲酸、

3,5-二烯豆苗烷、氯烷酸乙酯等化合物。

2.4.2 指纹图谱互不交叉性研究 在各组分 HPLC 条件下对各拆分组分分别进样测试,比较相同保留时间下各组分成分之间的差异,各拆分组分比较结果显示各拆分组分基本无交叉,见图 1~3。



A. 多糖; B. 20% 乙醇洗脱组分; C. 甾酮; D. 脂肪酸脂(图 2,3 同)
图 1 川牛膝不同拆分组分在 20% 乙醇洗脱组分色谱条件下 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms for split compositions from Cyathulae Radix according to 20% ethanol elution composition gradient elution

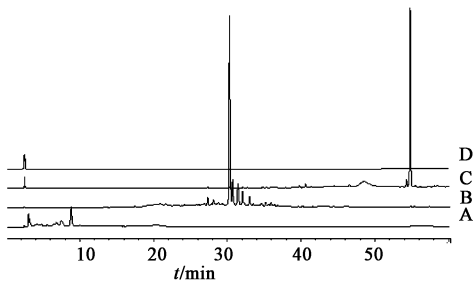


图 2 川牛膝不同拆分组分在甾酮组分色谱条件下 HPLC
Fig. 2 HPLC chromatograms for split compositions from Cyathulae Radix according to ketosteroid composition gradient elution

3 川牛膝各化学拆分组分的免疫作用研究

3.1 川牛膝给药剂量的确定 参照《中国药典》(2010 年版)川牛膝的人用剂量 10 g^[1],按拆分方法所得各拆分组分的比例进行 1,3,6,9 倍给药。结果表明 6 倍量时川牛膝对小鼠碳粒廓清指数和免疫器官的影响最大,故采用 6 倍量进行给药。

3.2 川牛膝各化学拆分组分对小鼠碳粒廓清指数

表 1 川牛膝拆分组分对小鼠脏器指数和廓清指数 K 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	给药剂量/mg·kg ⁻¹	脾指数	胸腺指数	廓清指数 K
空白	-	0.055 6 ± 0.009	0.019 8 ± 0.003	0.027 6 ± 0.004
水煎液	408.24	0.074 1 ± 0.008 ¹⁾	0.022 5 ± 0.002 ¹⁾	0.036 7 ± 0.007 ¹⁾
多糖	252.72	0.098 6 ± 0.011 ²⁾	0.030 1 ± 0.004 ²⁾	0.053 2 ± 0.009 ²⁾
20% 洗脱	150.34	0.056 0 ± 0.015	0.018 8 ± 0.005	0.026 5 ± 0.006
甾酮	4.21	0.073 9 ± 0.014 ¹⁾	0.022 7 ± 0.003 ¹⁾	0.035 9 ± 0.004 ¹⁾
脂肪酸	0.97	0.054 7 ± 0.012	0.019 4 ± 0.007	0.027 5 ± 0.008

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2 同)。

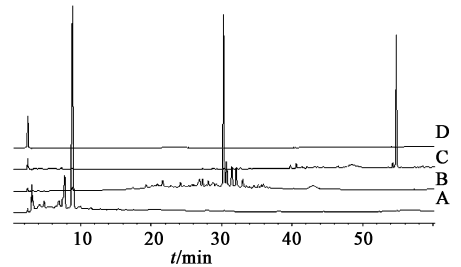


图 3 川牛膝不同拆分组分在脂肪酸酯组分色谱条件下 HPLC
Fig. 3 HPLC chromatograms for split compositions from Cyathulae Radix according to fatty oils composition gradient elution

和免疫器官的影响 取体重 18~22 g 的雌雄各半健康 ICR 小鼠 70 只,按体重随机分为 7 组,每组 10 只,分别为空白对照组、水煎液组、多糖组、20% 洗脱部位组、甾酮组、脂肪油组、阳性药组。按文献方法进行免疫^[2],连续给药 7 d,末次给药 30 min 后小鼠尾静脉注射 1:3 稀释的印度墨水(100 mL·kg⁻¹),待墨水注入后,立即计时。注入墨水后 2,10 min,分别从内眦静脉丛取血 20 μL,并溶于 0.1% 碳酸钠溶液 2.0 mL 中,摇匀并放置 2 h,以碳酸钠溶液作空白对照,于波长 680 nm 处测定光吸光度 A。然后将小鼠颈椎脱臼处死,分别取胸腺和脾脏并称量,计算廓清指数 K,脾指数与胸腺指数。见表 1。

川牛膝水煎液、多糖组分和甾酮组分能够增大免疫器官,升高廓清指数 K,具有增强免疫的作用。与空白对照组比较,多糖组分小鼠的脾指数和胸腺显著升高明显,呈极显著性差异(P < 0.01);水煎液组和甾酮组有显著性差异(P < 0.05);20% 洗脱部位组和脂肪油组与模型对照组比较均无显著性差异(P > 0.05)。

3.3 川牛膝各化学拆分组分对小鼠血清溶血素抗体生成的影响 取体重 18~22 g 的雌雄各半健康 ICR 小鼠 60 只,按体重随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白对照组,水煎液组,多糖组,20% 洗脱部

位组、甾酮组、脂肪油组。按文献方法进行免疫^[3], 连续 14 d。各组的每只小鼠于末次给药后, 腹腔注射绵羊红细胞 (SRBC) 悬液 0.2 mL/只进行免疫。在免疫 6 d 后, 眼眶取血放置 60 min, $2\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 用生理盐水将血清按 1:300 比例稀释。将 SRBC 液 0.5 mL 和稀释后的小鼠血清 1.0 mL 加入试管中, 加入用生理盐水 1:10 稀释的豚鼠血清 1.0 mL, 于 37 °C 温箱中恒温 30 min 后将其放入冰箱 0 °C 恒温 30 min, 离心。取离心后上清液 1.0 mL 和 3.0 mL 都氏液加入试管中, 混匀后静置 10 min, 于 540 nm 处测定吸光度; 另取一试管中加入都氏液 3.75 mL 和 SRBC 0.25 mL, 测定 SRBC 半数溶血时的吸光度。按公式计算样品半数溶血值 HC_{50} 。见表 2。

$$\text{样品 } HC_{50} = (\text{样品吸光度} / \text{羊红细胞半数溶血时的吸光度}) \times \text{稀释倍数}$$

表 2 川牛膝各化学拆分组分对小鼠血清溶血素抗体生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of split compositions from Cyathulae Radix on contents of serum hemolysin in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	HC ₅₀
空白	-	1 740.52 ± 186.43
水煎液	408.24	1 802.23 ± 246.17
多糖	252.72	2 330.41 ± 157.78 ²⁾
20% 洗脱	150.34	1 760.26 ± 270.55
甾酮	4.21	1 991.52 ± 129.46 ¹⁾
脂肪油	0.97	1 720.98 ± 257.67

由表 2 可以看出, 川牛膝水煎液与空白对照组比较, 差异性不显著 ($P > 0.05$), 多糖组分和甾酮组分与空白组比较呈显著性差异 ($P < 0.05$); 20% 洗脱部位组和脂肪油组与模型对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$)。表明多糖组分和甾酮组分对绵羊红细胞所致溶血素生成具有明显增强作用, 其他各组分对绵羊红细胞所致溶血素无生成, 作用不明显。

4 讨论

川牛膝拆分工艺的重要原则是拆分后各组分间化学成分应互不交叉, 研究资料显示^[4], 一类化合物在功效上往往类同; 根据中医传统临床用药主要为水煎液, 结合有效成分的特点, 采用水煎煮、醇沉, 大孔吸附树脂柱色谱分离技术的联合应用, 将川牛

膝的成分拆分为成分之间互不交叉的多糖组分、20% 乙醇洗脱组分、甾酮组分和脂肪油组分, 对川牛膝水煎液进行了全成分拆分, 所拆分的各组分保持了原形, 各拆分组分之总和即为水煎液。由于川牛膝多糖组分与其他化学拆分组分交叉的可能性较小, 因此本研究分别采用 20% 乙醇洗脱组分、甾酮组分和脂肪油组分的 HPLC 指纹图谱条件分析各化学拆分组分。通过考察不同 HPLC 条件下各组分的色谱峰及对应 UV 光谱吸收, 可以较准确地判断组间是否存在化学成分的交叉, 研究结果表明, 川牛膝性味各拆分组分基本不存在化学成分的相互交叉。

现代医学认为中医的肾虚与免疫力下降有关系, 免疫活性均来自于骨髓中多能干细胞, 肾生髓的机能包括免疫活性细胞的生成与调节作用。肾虚时, 免疫活性细胞生成障碍, 造成机体免疫功能低下, 补虚可达到增强免疫的作用^[5]。川牛膝归肝肾二经, 又为足厥阴、少阴之药, 走而能补, 性善下行, 功能活血祛瘀的同时又能补益肝肾, 强筋健骨, 平补肾精使肾精充沛, 具有补肾温阳, 强健腰膝固精止遗, 延缓衰老之功^[6]。本实验研究结果表明, 川牛膝有一定的免疫增强作用。

关于川牛膝多糖的免疫增强作用, 文献有一定报道, 关于川牛膝甾酮的免疫增强作用目前无报道。本研究结果表明, 川牛膝多糖组分和甾酮组分均具有免疫增强作用, 是其发挥免疫增强作用的物质基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 35-36.
- [2] 玉米, 胡元亮, 孟新宇, 等. 蛹虫草多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 135-138.
- [3] 王艳宏, 王秋红, 夏永刚, 等. 麻黄化学拆分组分的性味药理学评价——麻黄化学拆分组分的免疫抑制作用研究[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2044-2047.
- [4] 魏国义, 胡仪吉. 抗病毒药物的化学结构及药理作用[J]. 中国实用儿科杂志, 2001, 16(8): 454-456.
- [5] 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 鲜地黄与干地黄止血和免疫作用比较研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(11): 663.

[责任编辑 顾雪竹]