

赤芍、白芍凉血作用比较研究(Ⅱ) ——抑制脂多糖诱导大鼠肺泡巨噬细胞凋亡的谱效分析

宋玉超, 崔秀荣, 连超杰, 马海波, 张旗, 李强*, 雷海民
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:以 LC-MS 图谱上的峰面积和川赤芍、赤芍、白芍对脂多糖(LPS)刺激的大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 细胞活性的影响为基础进行谱效分析,以此确定川赤芍、赤芍、白芍抑制 NR8383 细胞凋亡的“药效成分组”,并比较差异。方法:采用偏最小二乘回归法(PLSR),对川赤芍、赤芍、白芍 LC-MS 图谱数据和 NR8383 细胞凋亡药效数据之间的内在联系进行谱效分析。结果:LC-MS 图谱上的 $X_8, X_{10}, X_3, X_7, X_{13}$ 这 5 个成分组成的“药效成分组”对川赤芍、赤芍、白芍抑制 NR8383 细胞凋亡药效的贡献较大。结论:“药效成分组”的研究能够较为全面的反映中药的功效,是评价中药质量的关键。

[关键词] 功效成分组; 赤芍; 白芍; 偏最小二乘法; 谱效分析

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0181-04

Comparative Study on Cooling Blood between Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba (Ⅱ) ——Spectrum-effect Analysis on Inhibitory Apoptosis of LPS-stimulated Rat Alveolar Macrophages

SONG Yu-chao, CUI Xiu-rong, LIAN Chao-jie, MA Hai-bo, ZHANG Qi, LI Qiang*, LEI Hai-min
(School of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To study the fingerprints correlated with pharmacological effect on the basis of LC-MS fingerprint and data of Radix Paeoniae Alba and Radix Paeoniae Rubra, in order to definite the effective compounds of decreasing apoptosis induced by lipopolysaccharide in the alveolar macrophages. **Method:** The inherent connections were studied between LC-MS fingerprint and decreasing apoptosis of Radix Paeoniae Alba and Radix Paeoniae Rubra, which was induced by lipopolysaccharide in the alveolar macrophages, with partial least squares regression (PLSR). **Result:** Effective compounds consist of five peaks $X_8, X_{10}, X_3, X_7, X_{13}$ of the fingerprint play the most important role in the decreasing apoptosis induced by lipopolysaccharide in the alveolar macrophages. **Conclusion:** The ‘effective compounds’ are the key of quality evaluation of traditional Chinese medicine and can provide comparatively comprehensive information of Chinese medicine.

[Key words] effective compounds; Radix Paeoniae Rubra; Radix Paeoniae Alba; PLSR; spectrum-effect analysis

2010 年版《中国药典》规定:赤芍为毛茛科植物芍药或川赤芍的干燥根,白芍为毛茛科植物芍药

经去皮水煮后的干燥根^[1]。由此可见,赤芍、白芍来源相近甚至相同,但临床上却不可混用。白芍长于补血,赤芍则重在凉血,故二者的功效差异主要体现在凉血和补血两个方面。其中赤芍、白芍补血作用的比较研究已有结果^[2-3]。本实验则从凉血方面入手,是赤芍、白芍凉血作用比较研究有关谱效分析的部分:采用偏最小二乘回归法对川赤芍、赤芍、白芍 LC-MS 图谱及凉血药效结果进行分析研究,旨在

[收稿日期] 20111104(004)

[基金项目] 北京中医药大学科研创新团队项目

[第一作者] 宋玉超, 硕士, E-mail: yuchaobzy@163.com

[通讯作者] * 李强, 副研究员, 硕士生导师, Tel: 010-84738640, E-mail: lq_cn@126.com

探讨川赤芍、赤芍、白芍抑制 LPS 诱导肺泡巨噬细胞系凋亡的“药效成分组”,比较三者药效物质基础的异同,为有区别的制定质量标准,保证临床与生产用药安全提供参考。

1 材料

1.1 药材 川赤芍、赤芍、白芍均为自购,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为川赤芍为毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根,赤芍、白芍分别为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 未去皮和经去皮水煮后的干燥根,三者芍药苷的含量分别为 2.08%、2.03%、1.90%,符合 2010 年版《中国药典》的规定。

1.2 细胞 大鼠肺泡巨噬细胞系(NR8383)购于中国科学院细胞库,由本室传代后使用。

1.3 仪器与试剂 内毒素(LPS)(Sigma, D127; B8, 10 mg), F12K 培养基(GIBCO, 500 mL), 双抗和胎牛血清(Hyclone, 100mL), 四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Amresco, 50 mg), 二甲基亚砷(DMSO)(Amresco, 500 mL), Agilent 1100 型高效液相色谱仪, Waters 2695 型 HPLC-Waters Q-TOF MS(Waters, America), RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), DZ-2BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特有限公司), KQ-500E 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), HPLC 级乙腈(Merck, Germany), 其余试剂均为分析纯,高纯水为自制。

2 方法

2.1 样本制备

2.1.1 不同提取物的制备 为了获得具有一定差异的谱效分析的足够的样本数,本实验先用 70% 乙醇回流提取原药材,此提取物命名为醇提取物;将药渣晾干后再以水回流提取,此被命名为醇后水提取物;调换溶剂顺序,同上法回流提取,分别得到水提取物和水后醇提取物。最终分别得到川赤芍、赤芍、白芍醇提取物、醇后水提取物、水提取物、水后醇提取物共 12 个样本。

2.1.2 LC-MS 供试品制备 分别精密称取上述各提取物相当于 1.0 g 生药的量,置 10 mL 量瓶中,加入 70% 甲醇水溶液 8 mL 浸泡 60 min,超声(60 Hz) 30 min,取出放至室温,补充溶剂定容至刻度,混匀,静置 30 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2 赤芍、白芍 LC-MS 指纹图谱

2.2.1 色谱分离条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为高纯

水, B 为乙腈;梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 15% B; 15 ~ 25 min, 15% ~ 18% B, 25 ~ 40 min, 18% ~ 40% B, 40 ~ 45 min, 40% ~ 85% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 230 nm。

2.2.2 质谱条件 质量飞行时间质谱: ES 负离子模式检测;碰撞气、鞘气(30)和辅助气(10)为高纯氮;离子喷射电压 -4 500 V,毛细管电压 2 600 V,毛细管温度 300 °C,碰撞能量 -10 eV,扫描质量范围 *m/z* 100 ~ 1 000,采用 lock spray 进行质量数校正。

2.2.3 自变量(X)的选择 为平衡自变量和样本数之间的矛盾,保证统计结果的可靠性,综合各提取物 LC-MS 各峰的响应值,首先仅选择在 ≥ 5 个提取物中均具有一定响应值的峰作为分析对象,经药效实验验证后再讨论是否有必要进行剩余少数峰的分析。为保证矩阵的完整性,对应不出峰的位置用 0 表示,得到谱效分析的 *X*,结果见表 1。

2.3 赤芍、白芍药效实验 待大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 生长状态良好时,吹打消化细胞,用培养液调整细胞密度至 1 × 10⁵ 个/mL,将该细胞液加入 96 孔板中,200 μL/孔,每组设 6 个复孔。实验设川赤芍、赤芍、白芍各提取物(终质量浓度均为 10 mg·L⁻¹)组,孵育 1 h,再加入 LPS(1 mg·L⁻¹)。同时设正常细胞空白对照(不用 LPS 刺激)组、LPS 对照(LPS 刺激后加入 PBS)组。培养 24 h 后,MTT 法检测吸光度(*A*₅₇₀),计算各给药组及 LPS 组对 NR8383 的抑制率,各组实验均重复 3 次。细胞抑制率 = 1 - 药物组/正常细胞对照组 × 100%,以 LPS 诱导 NR8383 细胞 24 h 的抑制率为因变量(*Y*)。结果见表 2。

2.4 谱效相关性分析研究 本文中的药效数据和指纹图谱数据有不同的度量标准,即量纲不同,所以采用标准差标准化,以消除变量量纲之间的差异。以经过标准化处理的指纹图谱中代表化学成分各峰的峰面积为 *X*,以标准化处理后的赤芍、白芍对 NR8383 细胞的抑制率作为 *Y*,采用偏最小二乘回归法,进行谱效相关性分析。计算出各 *X* 对应 *Y* 的回归系数,见图 1。其中回归系数代表各 *X* 对 *Y* 的贡献大小,以此回归系数进行建模,得回归方程 $Y = 0.046 4X_1 - 0.033 5X_2 + 0.492 3X_3 - 0.445 5X_4 - 0.038 X_5 - 0.432 8X_6 + 0.273 5X_7 + 0.606 X_8 + 0.129 X_9 + 0.507 7X_{10} - 0.314 X_{11} - 0.433 1X_{12} + 0.236 4X_{13} - 0.011 3X_{14} - 0.788 5X_{15} + 0.190 3X_{16} - 0.540 4X_{17} - 0.600 1X_{18}$ 。

表1 各样本的 LC-MS 色谱峰对应的峰面积数据

自变量	保留时间 /min	川赤芍				赤芍				白芍			
		醇提	醇后水	水提	水后醇	醇提	醇后水提	水提	水后醇	醇提	醇后水	水提	水后醇
X ₁	2.67	95 180	54 988	317 177	53 434	42 059	14 614	93 133	6 905	54 803	23 289	84 664	7 259
X ₂	4.64	1 895	350	309	0	594	0	0	0	15 277	0	17 084	0
X ₃	5.54	0	0	0	0	1 920	0	1 482	0	1 015	379	1 823	0
X ₄	10.65	0	0	0	0	2 296	348	1 494	532	0	0	362	0
X ₅	12.20	0	0	0	0	14 561	1 275	7 101	2 290	0	0	0	0
X ₆	13.61	2 449	787	1 690	646	1 803	872	1 640	842	0	0	0	0
X ₇	14.23	51 033	487	4 854	2 956	31 737	3 071	0	3 835	3 947	358	1 302	677
X ₈	19.16	2 513	479	1 980	921	2 428	599	1 854	595	2 945	1 968	3 271	1 235
X ₉	20.82	246 939	12 405	98 966	19 484	345 557	33 686	274 096	32 122	109 511	29 796	130 822	12 025
X ₁₀	22.39	231 345	13 773	0	2 821	12 977	1 210	1 335	0	3 281	753	1 113	0
X ₁₁	24.11	1 241	0	2 402	8 438	1 203	0	0	0	0	0	0	0
X ₁₂	28.79	3 140	507	2 653	1 025	4 730	1 402	3 842	1 635	2 847	1 291	2 958	806
X ₁₃	30.35	387 199	814	43 625	54 199	48 328	0	4 097	3 516	0	0	0	0
X ₁₄	32.05	0	0	690	460	828	0	667	0	0	435	1 041	369
X ₁₅	33.20	3 010	2 088	1 595	1 473	902	2 296	1 197	1 105	1 472	1 391	2 040	1 350
X ₁₆	35.34	5 717	485	535	748	0	599	0	319	1 394	308	0	315
X ₁₇	40.28	1 602	0	1 664	970	2 471	1 199	2 005	1 393	1 691	1 838	1 668	693
X ₁₈	41.71	1 700	0	0	801	1 385	0	497	504	1 010	0	520	1 169

表2 MTT 法检测赤芍、白芍醇提取物
对 LPS 所致细胞增殖毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	A ₅₇₀	抑制率/%
空白对照	-	0.537 5 ± 0.11	0
LPS 对照	1	0.244 5 ± 0.05	56.24 ± 10.26
川赤芍醇提取物	10	0.437 3 ± 0.07	22.53 ± 10.03 ¹⁾
川赤芍醇后水提取物	10	0.382 8 ± 0.06	31.61 ± 10.93 ¹⁾
川赤芍水提取物	10	0.314 7 ± 0.12	50.21 ± 8.51
川赤芍水后醇提取物	10	0.354 5 ± 0.05	37.04 ± 6.66
赤芍醇提取物	10	0.351 7 ± 0.06	38.23 ± 7.14
赤芍醇后水提取物	10	0.287 8 ± 0.09	51.81 ± 11.01
赤芍水提取物	10	0.359 0 ± 0.08	36.82 ± 13.25
赤芍水后醇提取物	10	0.347 7 ± 0.11	40.43 ± 18.24
白芍醇提取物	10	0.354 0 ± 0.11	38.64 ± 19.48
白芍醇后水提取物	10	0.249 8 ± 0.04	55.80 ± 5.18
白芍水提取物	10	0.323 0 ± 0.06	43.44 ± 6.72
白芍水后醇提取物	10	0.315 8 ± 0.03	42.73 ± 4.41

注:与 LPS 对照组比较¹⁾P < 0.05。

从图 1 可以看出,在此模型中,18 个自变量 X 对 Y 的回归系数有正也有负,即存在正相关和负相关,其中 X₈, X₁₀, X₃, X₇, X₁₃ 这 5 个自变量具有较大的正相关系数,占正相关系数总和的 80% 以上,为对抑制 NR8383 细胞凋亡的药效成分组。“药效成

分组”在指纹图谱上的相应位置见图 2。

3 结果与讨论

3.1 模型的选择及意义 根据温病卫气营血的理论体系,温病血分证是指温邪深入血分,引起耗血动血、瘀热互结所出现的证候^[4],其多发生于多种急性感染性和传染性疾病的危重阶段,而急性肺损伤(ALI)是此阶段最易出现的一种并发症。ALI 发病机制复杂,至今尚未完全阐明。但是,诸多组织学及病理学研究表明,早期过度的宿主应答反应和后期免疫细胞的异常凋亡是介导 ALI 病理损伤的关键原因^[5-6]。中医对此则认为热毒深入血分,迫血妄行是导致进一步血分证其他病变的原始动因,治疗应首当立足于清热凉血。由此可见,中医凉血的治法应当与机体的免疫异常密切相关。肺泡巨噬细胞在 ALI 的发生、发展及转归的免疫反应中占有重要地位^[7]。鉴于此,本课题选择大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383 细胞炎性损伤模型,观察赤芍、白芍对 LPS 致 NR8383 细胞活性改变的作用。

3.2 讨论 中药的药效是其所含的化学成分协同作用的体现,因此化学成分与药效之间必定存在某种关联。谱-效分析就是利用统计学的方法关联这两方面的数据,以此寻找与药效相关的指纹峰并指认出来的过程,这是目前一种研究中药功能主治与其化学成分之间关系的较为合理的手段。本研究利

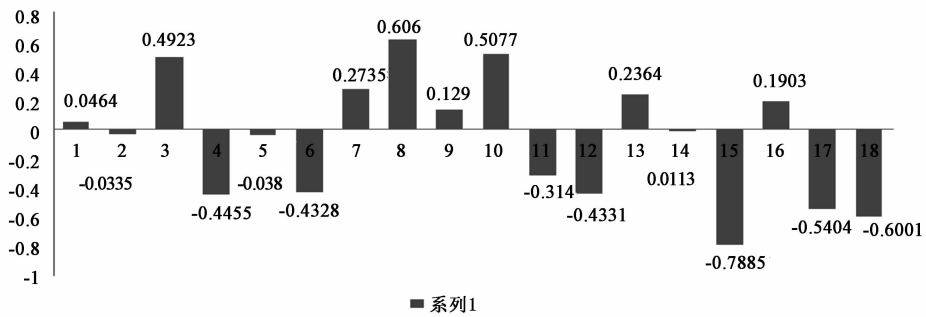


图 1 自变量 X 对 Y 的回归系数柱状示意

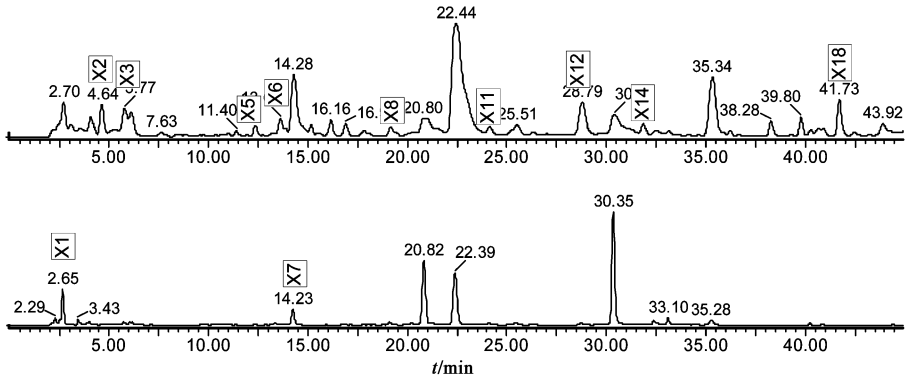


图 2 “功效成分组”在 LC-MS 图谱上的相应位置

用了 PLSR 对川赤芍、赤芍、白芍的化学成分与抑制 LPS 诱导的 NR8383 细胞异常凋亡药效之间的关系进行了谱-效分析,得出了一组“药效相关峰”。

从本实验结果可以看到, $X_8, X_{10}, X_3, X_7, X_{13}$ 这 5 个自变量对抑制 NR8383 细胞凋亡的贡献较大。其中 X_8, X_{10}, X_3, X_7 是川赤芍、赤芍和白芍共有的成分,而 X_{13} 仅在川赤芍和赤芍中能检测到,同时川赤芍和赤芍各提取物中 X_{10}, X_7 的含量明显高于白芍各个提取物。根据 24 h 时川赤芍组、赤芍组与白芍组之间存在显著差异 ($P < 0.05$),可以推测赤芍、白芍凉血功效差的可能原因:一方面 X_{13} 可能是导致川赤芍和赤芍的抑制效果优于白芍的化学成分,即 X_{13} 可能是导致赤芍与白芍凉血功效差异的物质基础之一;另一方面 X_{10}, X_7 的含量差异也可能导致凉血功效的差异。当然,这需要确定“药效成分组”中的每一个化合物,进而将所获得的“药效成分组”与原提取物进行药效对比验证,才能进一步证明分析方法的正确性,这也将是后续研究的重点所在。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:96,147.
 [2] 李强,周荣,杨伟鹏,等.赤芍、白芍补血作用比较研究(I)[J]. 中医药信息,2010,27(6):11.
 [3] 李强,周荣,杨伟鹏,等.赤芍、白芍对环磷酰胺所致的血虚证小鼠补血作用比较研究[J]. 中医药信息,2011,28(1):19.
 [4] 林培政. 温病学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:21.
 [5] 吕进,王希良. 流感病毒感染介导的免疫病理损伤研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(8):961.
 [6] Kitsmura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3Pt1): 762.
 [7] 张伟,蒋耀光,李磊. 肺泡巨噬细胞与急性肺损伤[J]. 创伤外科杂志,2003,5(5):389.

[责任编辑 邹晓翠]