

基于谱效关系和成分敲除探讨独一味总黄酮 抗类风湿关节炎的关键成分

陈瑞鑫¹, 康点点¹, 詹琥珀², 蒋桂华^{1,3*}, 蒋运斌^{2*}

¹成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137;

²西南大学药学院中医药学院, 重庆 400000; ³成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137

摘要:为探讨独一味总黄酮抗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的关键成分, 阐明独一味治疗 RA 的药效物质基础, 本研究建立了独一味总黄酮的指纹图谱, 13 批独一味总黄酮指纹图谱共标示了 8 个共有峰, 指认了其中 3 个共有峰。同时基于 13 批独一味总黄酮样品对成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)活力的影响, 建立了独一味总黄酮抗 RA 的谱效关系, 结果表明木犀草苷和木犀草素为独一味总黄酮抗 RA 的关键成分。采用成分敲除技术探讨独一味总黄酮中木犀草苷成分抗 RA 的药效, 并比较了等摩尔量木犀草苷和木犀草素对照品分别对 FLS 细胞活力的影响, 结果表明木犀草苷和木犀草素成分均能显著抑制 FLS 细胞活力($P < 0.01$), 且二者抑制率无显著性差异。结合独一味总黄酮 HPLC 图谱中木犀草苷含量明显高于木犀草素, 表明木犀草苷为独一味总黄酮抗 RA 的关键成分之一, 可为临床运用独一味治疗 RA 提供一定的参考。

关键词:独一味; 总黄酮; 类风湿关节炎; 药效物质基础

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1833-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.001

Study on the key components of total flavonoids from *Lamiophlomis Herba* in the treatment of rheumatoid arthritis based on spectrum-effect relationship and component knockout

CHEN Rui-xin¹, KANG Dian-dian¹, ZHAN HU-po², JIANG Gui-hua^{1,3*}, JIANG Yun-bin^{2*}

¹State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; ²College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400000, China; ³School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: This study aimed to explore the key components of total flavonoids from *Lamiophlomis Herba* (LH) against rheumatoid arthritis (RA), which can elucidate the active components of LH against RA. In this work, the fingerprint of 13 batches of the total flavonoids from LH was established, including eight common peaks, of which three were identified. Based on the effect of 13 batches of total flavonoids from LH on the activity of fibroblast-like synoviocytes (FLS), the spectrum-effect relationship was established for the anti-RA effect of total flavonoids from LH. The results showed that luteoloside and luteolin were key components of total flavonoids from LH against RA. Then, the component knockout technique was used to investigate the anti-RA efficacy of the luteoloside component in the total flavonoids from LH, and the effects of luteoloside and luteolin on FLS cell viability were compared. The results showed that luteoloside and luteolin could significantly inhibit FLS cell viability ($P < 0.01$), and there was no significant difference between their inhibition rates. Because the HPLC spectrum of total flavonoids from LH showed that the content of luteoloside was higher than that of luteolin, luteoloside is a key component of total flavonoids

收稿日期: 2023-07-26

接受日期: 2023-10-17

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(82104528); 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0146); 国家重点研发计划(2019YFC1712302)

* 通信作者 E-mail: bbg@cdutcm.edu.cn, yunbinjiang@swu.edu.cn

from LH against RA. This work can provide a certain reference for the clinical application of LH in the treatment of RA.

Key words: Lamiophlomis Herba; total flavonoids; rheumatoid arthritis; pharmacodynamic material basis

中药独一味 (*Lamiophlomis Herba*, LH) 为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的干燥地上部分,系藏族习用药材,也常作中药使用。《中华人民共和国药典》2020 年版载其具有活血止血、祛风止痛的功效,可用于治疗跌打损伤、风湿痹痛、黄水病^[1]。其藏药名“大巴”“打布巴”,先后记载于藏医著作《月王药诊》《四部医典》《晶珠本草》等,迄今已有 1 200 年的应用历史^[2];《晶珠本草》中记载“独一味,固精髓,引流黄水”^[3],表明独一味可应用于“黄水病”的治疗。而根据临床表现,藏医记载的“黄水病”可归属于中医学“痹证”范畴,由“痹证”发展而来的“骨痹”、“历节病”等与现代医学中“类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)”临床特征性表现更为贴近^[4]。因此,独一味具有治疗 RA 的潜力^[5],现有研究也表明了独一味具有抗 RA 的药效^[6-8]。

RA 是一种以慢性、多发性关节炎症为主要表现的自身免疫性疾病,其病理特点表现为滑膜细胞“肿瘤样”增生以及血管翳的形成,其中成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是其主要的效应细胞^[9]。目前,RA 的发病机制尚不明确,其发病率和致残率均较高,且通常潜伏发病,疾病晚期可能导致不同程度无法逆转的残疾,属世界卫生组织规定的现代难治病^[10]。临床上常用于治疗 RA 的化学药物如非甾体抗炎药、免疫抑制剂、糖皮质激素和生物制剂,前 3 种化学药物不良反应明显,而生物制剂昂贵的价格限制了其长期应用^[11]。故开发临床新型低副作用且疗效稳定的抗 RA 药物显得尤为必要。

课题组前期首次采用网络药理学对独一味抗 RA 的药效物质基础和作用机制进行了探讨,发现独一味对 RA 的治疗作用与其 23 种成分相关,其中黄酮类成分数量占比接近 40%,提示黄酮类成分在独一味抗 RA 的过程中发挥了重要作用,尤其是木犀草素;并提出独一味抗 RA 的主要机制可能是通过抑制 PI3K-Akt 信号通路诱导滑膜细胞凋亡^[12]。同时,通过大鼠佐剂性关节炎模型对独一味抗 RA 的作用及药效物质基础进行了研究,结果表明独一味总黄酮具有良好的抗 RA 作用^[13]。独一味总黄酮可能是其抗 RA 的主要药效物质基础之一,但独

一味总黄酮中抗 RA 的关键药效成分还不明确,亟待进一步研究。因此,本研究拟通过谱效关系和成分敲除技术,对独一味总黄酮中抗 RA 的关键成分进行探讨,旨在为临床运用独一味治疗 RA 提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药材及样品制备

13 批不同产地独一味药材样品信息见表 1,所有样品经成都中医药大学药学院蒋桂华教授鉴定为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的干燥地上部分。

独一味总黄酮样品的制备:取独一味药材粉末 100 g 加入渗漉桶中,加入 95% 乙醇水没过粉末,静置 24 h 后开始提取。95% 乙醇水适当流速渗漉,收集渗漉液,于 50 °C 减压旋转蒸发回收溶剂,待回收至约 30 mL 时将浓缩的渗漉提取液与预处理的聚酰胺粉拌匀,在 50 °C 水浴蒸干,上样于已处理好的聚酰胺色谱柱,放置 24 h。先以高纯水 (3 倍柱体积) 洗脱至无色,然后用 70% 乙醇水溶液 (14 倍柱体积) 洗脱,并收集 70% 乙醇水洗脱液,减压浓缩,即得独一味总黄酮。基于该方法课题组制备得到的 13 批独一味总黄酮纯度范围在 55.82% ~ 94.12%,纯度平均值为 80.62%。

1.1.2 仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); KQ-500VDE 双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XSP-37XB 倒置生物显微镜 (上海民仪电子有限公司); SYNERGY H1BioTek 多功能微孔板检测仪 (安捷伦科技有限公司); ZF-90 紫外分析仪 (温州奥利生物医学仪器厂)。

1.1.3 试剂与试药

色谱纯乙腈 (美国 TEDIA 公司); 色谱纯甲酸 (成都市科隆化学品有限公司); 超纯水; 分析纯甲苯、甲酸乙酯、甲酸、三氯化铝 (成都市科隆化学品有限公司); 二甲基亚砜 (河北品科研生物科技有限公司); Fetal Bovine Serum 血清 (天杭生物有限公司); DMEM 高糖培养基 (武汉塞维尔生物科技有限公司)。

对照品木犀草苷(批号 MUST-21111817)、木犀草素(批号:MUST-21072311)、绿原酸(批号:MUST-21070910)购自成都曼思特生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

表 1 独一味样品信息

Table 1 Sample information of LH

样品批次 Sample number	采集地或购买地 Collection or purchase location	收集时间 Collection time
S1	青海省玉树藏族自治州杂多县	2021.08.03
S2	青海省玉树藏族自治州玉树市	2021.08.04
S3	青海省海南藏族自治州泽库县	2021.08.07
S4	青海省果洛藏族自治州久治县	2021.08.07
S5	青海省海南藏族自治州三智藏西医综合诊所	2021.08.08
S6	西藏自治区拉萨市曲水县	2021.07.20
S7	西藏自治区拉萨市达孜县区	2021.07.25
S8	四川省阿坝藏族自治州阿坝县	2021.07.27
S9	四川省甘孜藏族自治州石渠县德荣玛乡	2021.08.13
S10	四川省甘孜藏族自治州石渠县虾扎镇	2021.08.14
S11	四川省甘孜藏族自治州色达县	2021.07.28
S12	云南省迪庆藏族自治州德钦县	2021.08.17
S13	云南省迪庆藏族自治州香格里拉市	2021.08.20

1.1.4 实验细胞

人滑膜组织由中山大学附属第一医院风湿免疫科肖游君副主任医师提供,其取自正在接受膝关节滑膜切除术或全膝关节置换术的活动期 RA 患者(患者年龄在 35 ~ 68 岁之间);中山大学附属第一医院医学伦理委员会批准了本研究中涉及的所有研究方案(No. [2017]-049)。

将取自 RA 患者的滑膜组织精细切成小片,用胶原酶(1 mg/mL)在 37 °C 消化 3 h,终止消化后,分离 FLS 细胞,将其置于 10% FBS(胎牛血清)的 DMEM 高糖培养基于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 独一味总黄酮指纹图谱的建立

1.2.1.1 色谱条件

Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.2% 甲酸水溶液,梯度洗脱(0 ~ 15 min, 8% → 13% A; 15 ~ 25 min, 13% A; 25 ~ 35 min, 13% → 17% A; 35 ~ 55 min, 17% A; 55 ~ 70 min, 17% → 38% A; 70 ~ 80 min, 38% A);检测波长为 245 nm;流速为 1.0 mL/min;柱温为 29 °C;进样量为 10 μL。

1.2.1.2 供试品溶液的制备

取 13 批独一味总黄酮样品各 0.1 g,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇超声溶解,定容,混匀,

过滤,取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

1.2.1.3 对照品溶液的制备

精密称定木犀草苷、木犀草素、绿原酸对照品 3 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇配置成 0.3 mg/mL 的对照品溶液,摇匀过 0.22 μm 滤膜,即得。

1.2.1.4 方法学考察

精密度考察:取独一味总黄酮样品(S1),按“1.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,并记录 HPLC 图谱。

重复性试验:取独一味总黄酮样品(S1)6 份,按“1.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1.1”项下色谱条件进样分析,并记录 HPLC 图谱,考察该方法的重复性。

稳定性试验:取独一味总黄酮样品(S1),按“1.2.1.2”项下供试品溶液制备方法,分别于制样后 0、2、4、8、12、24 h 按“1.2.1.1”项下色谱条件记录 HPLC 图谱,考察样品稳定性。

1.2.2 独一味总黄酮对 RA-FLS 细胞活力的影响

1.2.2.1 样品的制备

取不同批次独一味总黄酮样品,使用前溶解于 DMSO 中,再配制所需浓度的含药细胞培养液。

1.2.2.2 细胞培养与分组

RA-FLS 细胞的分离、培养与鉴定参照已有研究方法^[14,15],设不含细胞和药物的空白组、含细胞不

含药物的对照组和不同批次独一味总黄酮给药组 (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 采用显微镜观察细胞生长状态, 将生长良好的 FLS 细胞进行计数, 并采用 DMEM 高糖培养基调整细胞密度为 5×10^4 个/mL, 将悬浮好的细胞, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板进行培养。给药组加入对应浓度的独一味总黄酮, 空白组和对照组加入等体积的含 DMSO 培养液。

1.2.2.3 独一味总黄酮对 RA-FLS 细胞活力的影响

待细胞生长贴壁, 弃去培养基, 用 0.1% DMSO 溶解独一味总黄酮, 使其在加入细胞培养孔后的浓度为 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔 100 μL , 孵育 48 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中 2 h。使用多功能微孔板检测仪在 450 nm 波长测定吸光度, 按照公式(1)计算细胞活力。

细胞抑制率 =

$$(A_{\text{对照}} - A_{\text{试验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (1)$$

其中, $A_{\text{对照}}$ 为细胞未经药物处理组的吸光度值, $A_{\text{试验}}$ 为细胞经药物处理组的吸光度值, $A_{\text{空白}}$ 为空白组, 即无细胞、无药物组的吸光度值。

1.2.2.4 数据分析方法

采用 SPSS 软件进行数据分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 服从正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 LSD, 当 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

1.2.3 独一味总黄酮抗类风湿关节炎谱效关系的建立

将独一味总黄酮指纹图谱共有峰峰面积和对应 FLS 细胞活力抑制率数据组成原始数据矩阵, 进行灰色关联度分析和偏最小二乘回归分析, 建立独一味总黄酮抗类风湿关节炎的谱效关系。

1.2.4 基于成分敲除研究独一味总黄酮抗类风湿关节炎的关键成分

在基因敲除模式的影响下, 成分敲除技术被逐

渐引入到中药药效物质基础的研究中, 该技术具有明显的中医药特色, 可将中医药理论的整体观、系统观运用于实际, 并突显中医药多成分协同拮抗的丰富内涵^[16]。木犀草素为木犀草苷的糖苷元, 可能是由于天然黄酮类成分常以苷类形式存在^[17], 独一味总黄酮 HPLC 图谱中木犀草苷含量明显高于木犀草素。基于此, 本研究拟采用薄层敲除法对独一味总黄酮中木犀草苷成分进行成分敲除, 考察木犀草苷是否为独一味总黄酮抗类风湿关节炎的关键成分。

1.2.4.1 对照品溶液的制备

取木犀草苷对照品 0.4 mg, 精密称定, 以 70% 乙醇水制备成含木犀草苷 0.04 mg/mL 的对照品备用溶液。

1.2.4.2 供试品溶液的制备

取独一味总黄酮 0.04 g, 置于 10 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇水溶解, 摇匀, 作为供试品溶液。

1.2.4.3 薄层色谱条件

展开剂选用甲苯: 甲酸乙酯: 甲酸 (2: 4: 1), 显色剂应用 5% 的三氯化铝乙醇溶液, 在紫外光灯 (365 nm) 下对木犀草苷予以鉴定。

1.2.4.4 敲除样品的制备

用注射器吸取适量供试品溶液画线于活化的硅胶板, 另用毛细管吸取供试品溶液和对照品溶液分别点于画线条带的两端。将硅胶板放入已用展开剂饱和的层析缸中, 展开, 取出, 晾干。将画线条带部分以玻璃板覆盖, 于硅胶板两端部位喷以显色剂, 加热 1 min 后置紫外灯下检视。

挖取未喷显色剂的目标成分色带部分 (与木犀草苷对照品显相同斑点的色带部分) 并合并其他色带部分得目标成分和目标阴性成分的硅胶混合物, 如图 1。另取硅胶板点样, 展开后刮取全部硅胶, 得独一味总黄酮的硅胶混合物。

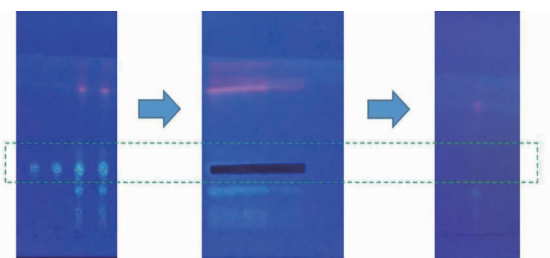


图 1 敲除样品制备图

Fig. 1 Knockout sample preparation chart

注: 样品 S1 及木犀草苷对照品 (左); 去除目标成分条带 (中); 目标阴性成分 (右)。Note: Sample S1 and luteoloside reference substance (left); Stripes for removing target components (middle); Target negative component (right).

1.2.4.5 敲除样品的成分表征

在薄层板上挖取并合并足够量的吸附有目标成分、目标阴性成分和独一味总黄酮全成分样品的硅胶,分别置于具塞锥形瓶中,加入5倍量甲醇,超声提取3次,每次1h,合并提取液。将提取液于8000 r/min离心5 min,合并上清液,浓缩,以甲醇定容至2 mL,过0.22 μm微孔滤膜两次,即得目标成分、目标阴性成分和独一味总黄酮全成分的样品溶液。采用HPLC对目标成分、目标阴性成分和独一味总黄酮全成分样品溶液中的成分进行表征。HPLC色谱条件同指纹图谱研究条件,进样量为60 μL。

1.2.4.6 敲除样品的细胞药效学研究

RA-FLS细胞药效学实验方法同“1.2.2”。

1.2.5 等摩尔量木犀草苷和木犀草素对FLS细胞活力的影响

基于谱效关系结论,通过查阅相关文献^[18],本研究拟对比20 μmol/L的木犀草苷与20 μmol/L木犀草素对FLS细胞活力影响的差异,以更好地阐明独一味总黄酮抗类风湿关节炎的药效物质基础。

1.2.5.1 样品制备

取木犀草苷或木犀草素适量,精密称定,用

0.1% DMSO溶解,使其在加入细胞培养孔后的浓度为20 μmol/L。

1.2.5.2 细胞药效学研究

基于CCK-8法考察20 μmol/L木犀草苷和20 μmol/L木犀草素成分对FLS细胞活力的影响,实验步骤同“1.2.2”。

2 实验结果

2.1 独一味总黄酮指纹图谱的建立

2.1.1 方法学考察结果

方法学考察结果显示重复性、稳定性、精密度RSD均小于3.0%,表明该方法良好,可用于独一味总黄酮指纹图谱的研究。

2.1.2 指纹图谱的建立

将13批独一味总黄酮的HPLC色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012.130723》,设置S3号样品为参照图谱,以中位数为对照指纹图谱生成方法,时间窗口宽度为0.1 min,通过多点校正和自动匹配生成了指纹图谱对照图谱,确定了8个共有峰,13批独一味总黄酮色谱叠加图见图2,样品图和对照品图见图3。

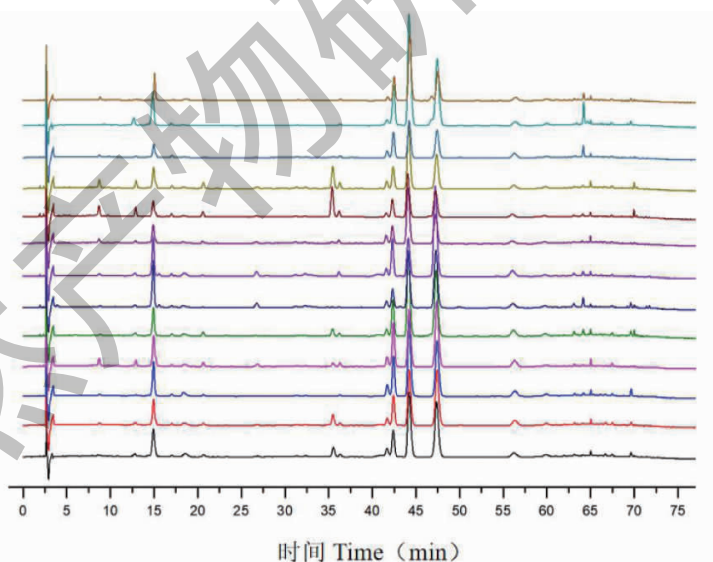


图2 13批独一味总黄酮色谱叠加图

Fig. 2 Chromatogram overlay chart of total flavonoid from 13 batches of LH

2.1.3 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012.130723》对13批独一味总黄酮HPLC指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价,相似度计算结果依次为:0.999、0.996、0.997、0.986、0.998、

0.980、0.909、0.974、0.991、0.983、0.988、0.990、0.969,均大于0.9,表明各批次指纹图谱与对照指纹图谱有较好的相似性。

2.2 独一味总黄酮对RA-FLS细胞活力的影响

统计学分析结果,与对照组比较,各批次独一味

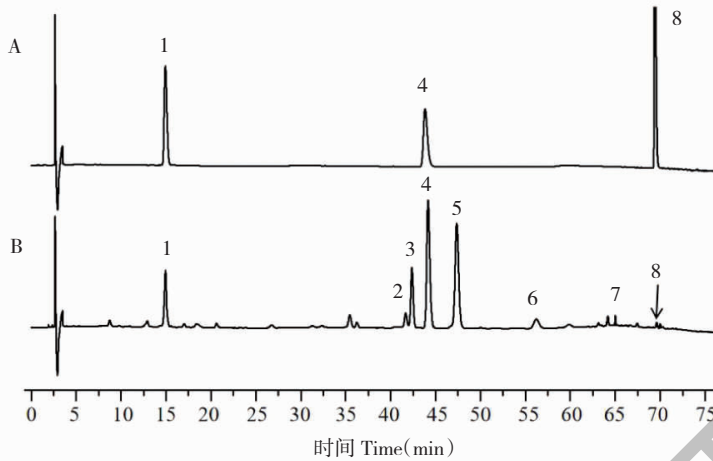


图3 混合对照品及独一味总黄酮样品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatogram of mixed reference substance and total flavonoid sample from LH

注:A:混合对照品;B:独一味总黄酮样品;1:绿原酸;4:木犀草苷;8:木犀草素。Note:A:Mixed reference solution;B:Total flavonoid sample of LH;1:Chlorogenic acid;4:Luteoloside;8:Luteolin

总黄酮均能显著抑制 FLS 细胞的活力,不同批次独一味总黄酮细胞活力抑制率见表 2。

表 2 不同批次独一味总黄酮对 FLS 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Inhibition rate of total flavonoids from different batches of LH on FLS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	抑制率 Inhibition rate (%)
对照组 Control	0.09 ± 0.04
S1	25.14 ± 3.08 ^{##}
S2	50.26 ± 4.64 ^{##}
S3	54.82 ± 8.58 ^{##}
S4	35.17 ± 1.02 ^{##}
S5	42.38 ± 10.15 ^{##}
S6	47.18 ± 7.65 ^{##}
S7	25.94 ± 3.98 ^{##}
S8	50.18 ± 2.51 ^{##}
S9	34.91 ± 6.85 ^{##}
S10	34.15 ± 0.55 ^{##}
S11	59.23 ± 14.40 ^{##}
S12	63.88 ± 8.67 ^{##}
S13	35.67 ± 7.11 ^{##}

注:与对照组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$.

2.3 独一味总黄酮抗类风湿关节炎谱效关系的建立

2.3.1 灰色关联度分析

将 13 批独一味总黄酮共有峰峰面积及对应

FLS 细胞活力抑制率数据导入 SPSSPRO 在线分析平台中,以 13 批独一味总黄酮 8 个共有峰峰面积为母因素,FLS 细胞活力抑制率为子因素,数据转换方式选择标准化,分辨系数取 0.5,计算独一味总黄酮共有峰峰面积和 FLS 细胞活力抑制率的灰色关联度^[19],结果见表 3。

表 3 共有峰峰面积与细胞活力抑制率灰色关联度分析结果
Table 3 Grey correlation analysis results of common peak area and cell activity inhibition rate

共有峰峰号 Common peak number	关联度 Correlation degree(r)	排名 Rank
1	0.691	3
2	0.635	7
3	0.686	4
4	0.727	1
5	0.672	5
6	0.712	2
7	0.665	6
8	0.616	8

独一味总黄酮共有峰峰面积与 FLS 细胞活力抑制率关联度值越大,表明该成分对于独一味总黄酮发挥治疗 RA 的药效越重要。由表可知,8 个共有峰与 RA-FLS 细胞活力抑制率的关联度均在 0.6 以上,表明独一味总黄酮抗 RA 活性是多种成分共同作用的结果,各共有峰对 FLS 细胞活力抑制率的贡献程度为 4 号峰 > 6 号峰 > 1 号峰 > 3 号峰 > 5 号

峰 > 7 号峰 > 2 号峰 > 8 号峰, 其中 4 号峰为木犀草苷, 8 号峰为木犀草素。

2.3.2 偏最小二乘回归分析

以标准化处理后的 8 个共有峰(记为 X1 ~ X8)

峰面积为自变量, 标准化处理后的不同批次独一味总黄酮细胞活力抑制率为因变量, 导入 SIMCA 14.1 作偏最小二乘回归分析(PLS)。变量投影重要性(VIP)值和偏回归系数分别见图 4 和 5。

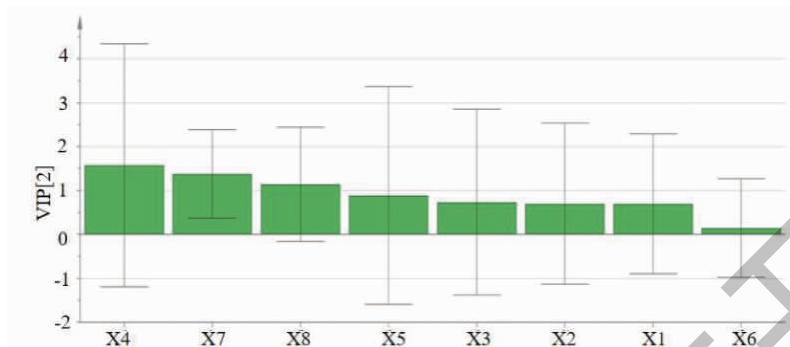


图 4 各共有峰峰面积和细胞活力抑制率 VIP 值

Fig. 4 VIP value of common peak area and cell activity inhibition rate

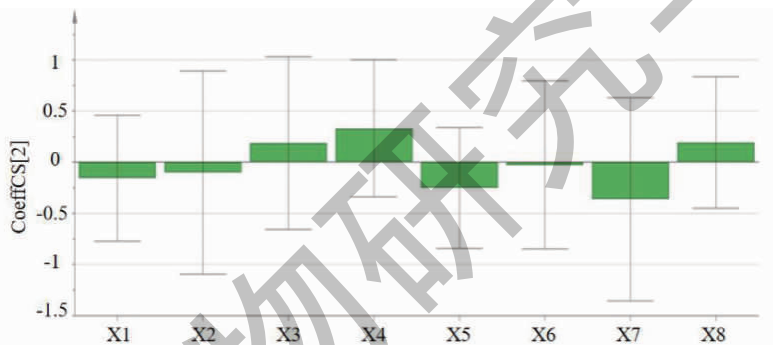


图 5 各共有峰峰面积和细胞活力抑制率偏回归系数

Fig. 5 Partial regression coefficient of common peak area and cell activity inhibition rate

由图可知, 独一味总黄酮指纹图谱中峰 3、4、8 与 FLS 细胞活力抑制率呈正相关; 同时 VIP 值越大 ($VIP > 1$), 表示自变量对因变量的解释能力越强, 以 FLS 细胞活力抑制率为指标, VIP 值从大到小的峰号为峰 4、7、8、5、3、2、1、6, 其中峰 4、7、8 VIP 值均大于 1; 根据 PLS 分析, 4 号峰和 8 号峰为独一味总黄酮中与 FLS 细胞活力抑制率关联较大的化学成分。

2.3.3 谱效关系的建立

通过建立独一味总黄酮指纹图谱, 运用 CCK-8 法检测独一味总黄酮对 RA-FLS 细胞活力的影响, 并结合灰色关联度分析和 PLS 回归分析建立了独一味总黄酮抗 RA 的谱效关系, 揭示了独一味总黄酮中的化学成分与抗 RA 药效之间的关系, 结果表明独一味总黄酮中的木犀草苷和木犀草素成分在其抗 RA 药效中发挥了主要作用。

2.4 基于成分敲除研究独一味总黄酮抗类风湿关节炎的关键成分

2.4.1 敲除样品的成分表征

目标成分、目标阴性成分和独一味总黄酮样品的 HPLC 色谱图见图 6。

由图中可知, 目标阴性成分与独一味总黄酮样品相比, 木犀草苷峰面积明显降低, 且除木犀草苷外其他峰均保留较好, 表明该方法对独一味总黄酮中木犀草苷成分进行了有效敲除。目标成分、目标阴性成分和独一味总黄酮样品中木犀草苷的峰面积分别为: 15.633 6、3.657 0 和 20.497 0, 计算得到木犀草苷敲除率为 76.27%, 回收率为 94.11%。

2.4.2 敲除样品的细胞药效学研究

细胞药效学实验结果见表 4。统计学分析发现, 与对照组比较, 独一味总黄酮全成分组、目标成分组均能显著抑制 FLS 细胞活力 ($P < 0.01$), 而目

标阴性成分组与对照组之间无显著抑制效果。表明木犀草苷在独一味总黄酮发挥治疗 RA 药效的过程

中起到了关键作用。

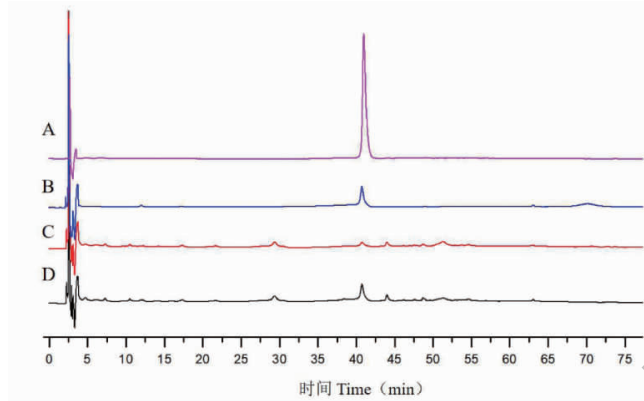


图 6 敲除样品的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatogram of knockout samples

注: A: 木犀草苷对照品; B: 目标成分样品; C: 目标阴性成分样品; D: 薄层制备独一味总黄酮全成分样品。Note: A: Luteoloside reference substance; B: Target component sample; C: Target negative component sample; D: Thin layer preparation of the total flavone sample of LH.

表 4 各组样品对 FLS 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Inhibition rate of FLS cells by each group of samples ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	抑制率 Inhibition rate (%)
对照组 Control group	0.15 ± 0.07
独一味总黄酮全成分组 Complete grouping of total flavonoids in LH	25.03 ± 3.80 ^{##}
目标阴性成分组 Target negative component group	3.87 ± 2.61
目标成分组 Target component group	19.80 ± 5.89 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$.

2.5 等摩尔量木犀草苷和木犀草素对 FLS 细胞活力的影响

细胞药理学实验结果见表 5。统计学分析结果显示, 与对照组比较, 木犀草苷组和木犀草素组均能显著抑制 FLS 细胞活力 ($P < 0.01$); 木犀草苷组和木犀草素组比较对 FLS 细胞活力的影响差异无统计学意义, 但木犀草素抑制率数值有明显升高趋势。

表 5 木犀草苷和木犀草素对 FLS 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Inhibition rate of luteoloside and luteolin on FLS cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	抑制率 Inhibition rate (%)
对照组 Control group	0.00 ± 0.19
木犀草苷组 Luteoloside group	36.86 ± 8.55 ^{##}
木犀草素组 Luteolin group	47.11 ± 8.32 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ^{##} $P < 0.01$.

3 讨论与结论

基于高效液相色谱-二级线性阵列检测器法 (high performance liquid chromatography with diode array detector, HPLC-DAD) 完成了独一味总黄酮指纹图谱的初步研究, 各批次独一味总黄酮样品指纹图谱与建立的对照指纹图谱相似度均大于 0.9, 表明不同批次独一味总黄酮样品中含有的化学成分具有一致性。课题组前期考察了独一味总黄酮不同给药浓度和不同给药时间对 FLS 细胞活力的影响, 基于此采用 CCK-8 法在 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 给药浓度处理 FLS 细胞 48 h 条件下, 考察了不同批次独一味总黄酮样品对 FLS 细胞活力的影响, 结果表明 13 批独一味总黄酮样品均能显著抑制 FLS 细胞活力。基于独一味总黄酮指纹图谱和细胞药理学实验结果, 采用灰色关联度和偏最小二乘 (PLS) 回归分析建立独一味总黄酮抗 RA 的谱效关系, 结果表明独一味总黄酮中的木犀草苷和木犀草素成分在其抗 RA 药效中发挥了主要作用。基于薄层色谱法对独一味总黄酮中含

量较高的木犀草苷成分进行有效敲除,并结合 CCK-8 法测定各样品对 FLS 细胞活力的影响,结果表明全成分和目标成分样品能够显著抑制 FLS 细胞活力,目标阴性成分样品对 FLS 细胞活力无显著抑制效果。同时比较了等摩尔量木犀草苷和木犀草素成分对 RA-FLS 细胞活力的影响,结果表明木犀草苷和木犀草素均能显著抑制 FLS 细胞活力,但木犀草素组与木犀草苷组之间无显著差异。

综上,本研究结果表明木犀草苷和木犀草素成分在独一味总黄酮抗 RA 的药效中发挥了主要作用,结合独一味总黄酮指纹图谱研究中木犀草苷的含量明显高于木犀草素,表明木犀草苷($C_{21}H_{20}O_{11}$)为独一味总黄酮抗 RA 的关键成分。能够为临床运用独一味总黄酮治疗 RA 提供一定的科学依据。木犀草苷广泛存在于多种药用植物中,在抗炎、抗氧化、抗癌、降血糖等方面作用明显,且毒副作用较小^[20]。虽然木犀草苷成分较为常见,但目前关于木犀草苷抗 RA 的相关文献较为匮乏,本研究采用 CCK-8 法考察了木犀草苷对 RA-FLS 细胞活力的影响,明确说明了木犀草苷具有抑制 FLS 细胞活力的作用,后续可进一步通过建立大鼠关节炎模型进行体内药效验证,并对其作用通路进行阐释,为临床运用独一味总黄酮治疗 RA 提供更多的参考和依据。

参考文献

- National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020;274.
- Xie TP, Cui ZJ, Zhang JX, et al. Effects of alpine grassland types and altitudes on the growth and reproduction traits of wild endangered medicinal materials *Lamiophlomis rotata* [J]. Guihaia(广西植物),2021,41:1346-1353.
- Empress Dowager Danzeng Pengcuo of the Qing Dynasty. Jingzhu Bencao(晶珠本草)[M]. Shanghai. Shanghai Scientific and Technical Publishers,1986;137.
- Wang Z, Zheng H, Hao HQ. Research progress of Ermiao San in treatment of rheumatoid arthritis[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志),2019,14:590-592.
- Chen RX, Zhan HP, Kang DD, et al. Overview of traditional chinese and tibetan medicine *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in preventing and treating rheumatoid arthritis [J]. Chin J Modern Appl Pharm(中国现代应用药学),2023,40:856-864.
- Ye F, Yang HB, Xu YX. Clinical observation of 69 cases of arthritis deformans treated with Duiwei capsule [J]. World Chin Med(世界中医药),2007,2:339-340.
- Gao JF. Treatment of 120 cases of knee synovitis with Duiwei capsules [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2002,9:41.
- Wang LJ, Wang Y, Yang J, et al. Experimental study of *Lamiophlomis rotata* preventing and treatment function on rat adjuvant arthritis [J]. J Basic Chin Med(中国中医基础医学杂志),2013,19:763-766.
- Liu H, Zhu Y, Gao Y, et al. NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. Cell Death Dis,2020,11:129.
- Burmester G, Pope J. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis [J]. Lancet,2017,389:2338-2348.
- Wang ZQ, Gong CX, Li ZB. Research progress on mechanism of active components of traditional Chinese medicine in treating rheumatoid arthritis based on signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2019,25:226-234.
- Jiang YB, Zhong M, Long F, et al. Network pharmacology-based prediction of active ingredients and mechanisms of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo against rheumatoid arthritis [J]. Front Pharmacol,2019,10:1435.
- Zhang YF, Chen RX, Yuan MH, et al. Study on effects and active ingredients of Tibetan medicine *Lamiophlomis rotata* against rheumatoid arthritis [J]. China Pharm(中国药房),2021,32:578-583.
- Zou Y, Shen C, Shen T, et al. LncRNA THRIL is involved in the proliferation, migration, and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. Ann Transl Med,2021,9:1368.
- Zhu S, Ye Y, Shi Y, et al. Sonic hedgehog regulates proliferation, migration and invasion of synoviocytes in rheumatoid arthritis via JNK signaling [J]. Front Immunol,2020,11:1300.
- Shao X, Zhu KX, Zhang Q, et al. Application of ingredient knock-out technology in pharmacodynamic material basis research of traditional Chinese medicine [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Mater World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化),2016,18:1563-1566.
- Kuang HX. Chinese Medicinal Chemistry(中药化学)[M]. Beijing:China Traditional Chinese Medicine Press,2017:135.
- Hou Y, Wu J, Huang Q, et al. Luteolin inhibits proliferation and affects the function of stimulated rat synovial fibroblasts [J]. Cell Biol Int,2009,33:135-147.
- Li X, Zhuo BY, Qi XJ, et al. Grey correlation analysis and path analysis between isoflavones content in Astragali Radix and climate factors [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2020,45:3407-3413.
- Wang XF, Yan CG. Effect of luteolin on nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. Chin J General Pract(中华全科医学),2019,17:21-24.