

基于灰色关联度法探讨蒙药蓝盆花保肝活性成分

韩盟帝¹, 石佳欣¹, 王媛媛¹, 张慧文¹, 董馨¹, 马飞祥¹, 陆景坤², 薛培凤¹(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要: **目的** 基于灰色关联度法探究蒙药蓝盆花保肝活性成分。**方法** 以 Wistar 大鼠为供体, 制备灌胃给药蓝盆花醇提物后 9 个时间点含药血清, 采用高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨率质谱(HPLC-Q-Exactive-MS)分析不同时间点 13 个成分峰面积, 采用 MTT 法检测不同时间点含药血清对 H₂O₂ 致 HL-7702 肝细胞氧化损伤模型存活率的影响。通过灰色关联度法分析不同时间点含药血清中各成分峰面积, 即各成分相对含量与相应细胞存活率的相关性。**结果** 入血的 13 个原型成分与保肝活性关联度均大于 0.75, 说明这些成分均具有不同程度的保肝活性, 其中关联度大于 0.8 的成分有 3,5-二咖啡酰基奎宁酸、对香豆酸、香叶木素、芹菜素、对羟基苯甲酸, 提示这些成分可能表现出相对较高的保肝活性。**结论** 该研究借助灰色关联度法, 从体内代谢同时兼顾药效的角度寻找保肝活性成分, 从蓝盆花含药血清中筛选到 5 个潜在的具有较高活性的保肝药效成分, 该方法有助于快速准确地发现蒙药蓝盆花药效成分(群), 为深入蓝盆花的体内代谢研究奠定基础。**关键词:** 蒙药; 蓝盆花; 灰色关联度法; 保肝作用; 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 含药血清; HL-7702 肝细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)05-0639-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.007

Study on Hepatoprotective Ingredients of Mongolian Medicine Flos Scabiosae Based on the Gray Correlation Method

HAN Mengdi¹, SHI Jiaxin¹, WANG Yuanyuan¹, ZHANG Huiwen¹, DONG Xin¹, MA Feixiang¹, LU Jingkun², XUE Peifeng¹ (1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110 Inner Mongolia, China; 2. College of Basic Medical Science, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110 Inner Mongolia, China)

Abstract: **Objective** To explore the hepatoprotective components of Mongolian medicine Flos Scabiosae based on the gray correlation method. **Methods** Wistar rats were used as donors to prepare medicated serum at 9 time points after intragastric administration of Flos Scabiosae alcohol extract. The peak areas of 13 components at different time points were analyzed by high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry(HPLC-Q-Exactive-MS). The survival rate of H₂O₂ damaged HL-7702 hepatocyte treated with the medicated serum at different time point was evaluated by MTT method. The correlation between the peak area of the components in the medicated serum at different time point and the corresponding cell survival rate was analyzed by grey correlation method. **Results** The correlation between the 13 components in the blood and the liver protection activity was greater than 0.75, indicating that these components have different degrees of liver protection. The components with a correlation degree greater than 0.8 include 3, 5- dicaffeoylquinic acid, p- coumaric acid, diosmetin, apigenin, p-hydroxybenzoic acid, so it is speculated that these components may exhibit relatively high

收稿日期: 2020-07-06

作者简介: 韩盟帝, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中蒙药药效物质基础及质量控制研究。Email: hmdi0603@163.com。通信作者: 薛培凤, 女, 教授, 研究方向: 中蒙药药效物质基础及质量控制研究。Email: xpfde@vip.sina.com。

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2015MS0823); 内蒙古自治区草原英才工程滚动支持计划项目(内组通字[2017]19 号); 内蒙古自治区研究生教育创新计划项目(S20171013204); 国家大学生创新训练项目(201810132005)。

hepatoprotective activity. **Conclusion** Based on the grey correlation method, liver protecting active components were found from the point of view of metabolism *in vivo* and efficacy at the same time, five potential hepatoprotective components were screened from the medicinal serum of Flos Scabiosae. The method is helpful to quickly and accurately identify the effective components (groups) of Flos Scabiosae, and lay a foundation for in-depth metabolic research *in vivo*.

Keywords: Mogolian medicine; flos Scabiosae; gray correlation method; hepatoprotective effect; HPLC-Q-quadrupole-Orbitrap MS; medicated serum; HL-7702 hepatocyte

蒙药蓝盆花主产于内蒙古、黑龙江、吉林等省区, 载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(蒙药分册)中, 在内蒙古地区作为蒙药广泛应用, 其蒙药名“陶森-陶日莫”, 单用治疗发热头痛、肝(肺)热、肝中毒等病症^[1-3], 黄酮类及酚酸类成分为其主要成分^[4-5]。

中药所含化学成分在体内通过吸收、代谢, 以血液为介质输送到靶器官或组织, 并在传送过程中发生质和量的改变, 最终产生药效作用的直接物质^[6-7], 因此, 将人或者动物给药后的含药血清或者血浆作为药效学研究对象, 既可排除大部分不被吸收的无效物质, 也可保留中药多成分综合作用的特点。蒙药血清“谱-效关系”是指尽可能多地获取蒙药血清图谱中的化学成分, 并将其含量(峰面积)与该含药血清的药效借助数理统计和分析进行关联, 通过量-效关系推测其中效应物质^[8-9]。该分析方法有助于准确地推测蒙药中的活性成分群, 为蒙药药效物质基础研究提供新思路^[10-12]。

本课题组前期建立了蒙药蓝盆花醇提物含药血清图谱并明确了其体内外共有原型成分^[13]。本研究采用前期已建立的方法测定大鼠口服蓝盆花醇提物后 9 个时间点的含药血清样品中各成分峰面积, 并以血清药理学方法评价各时间点含药血清的肝细胞保护作用, 通过时-量-效关系分析探讨该蒙药的保肝活性物质。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系 Wistar 大鼠, 雄性, SPF 级, 10 周龄, 体质量(240±20)g, 内蒙古医科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(蒙)2015-0001, 饲养于内蒙古医科大学实验动物研究中心。HL-7702 细胞株由北京中医药大学孙震晓教授赠予。

1.2 药物及试剂 蓝盆花, 购自内蒙古天利药材有限公司, 批号: 1606034, 经内蒙古医科大学药学院薛培凤教授鉴定为川续断科植物华北蓝盆花(*Scabiosa*

tschilliensis Grunning)的干燥花序。RPMI-1640 培养基(批号: C11875500BT)、胎牛血清(批号: SH30087.01B)、0.25%胰酶(批号: 25200056)、PBS(批号: SH30028.01B)、二甲基亚砜(DMSO, 批号: SHSJ0038), 美国 Gibco 公司; MTT 试剂盒, 北京 coolaber 科技有限公司, 批号: C0009; H₂O₂, 批号: SH259, 天津市密欧化学试剂有限公司; 乙醇为国产分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 甲酸为国产色谱纯; 0.5%羧甲基纤维素钠生理盐水(0.5 g 的羧甲基纤维素钠固体粉末溶解于 100 mL 的生理盐水), 实验室自制。

1.3 仪器 Ultimate 3000 高效液相色谱系统, 美国 Dionex 公司; HPLC-Q-Exactive 高效液相色谱-质谱联用系统, 美国 Thermo-Fisher 公司; ACE Excel 3 C₁₈-PFP 色谱柱(100 mm × 3 mm, 3 μm), 广州菲罗门科学仪器有限公司; DZTW 型调温电热套, 北京市永光明医疗仪器有限公司; N-1100 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; LYOQUEST-85 冷冻干燥机, 西班牙 AzbilTelstarTechnologiesS.L.U 公司; 3-18K 高速温控离心机, 德国 SIGMA 公司; MX-S 旋涡混合器, 德国 SCILOGEX 公司; HERACELL 150i 二氧化碳细胞培养箱, 美国 Heal-Force 公司; DFC450Cd 倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; ABI stepone plus real-time pcr system 全自动生化分析仪, 日本 TOSHIBA 公司; Millipore-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; AB135-S 电子天平($d=0.01$ mg), 瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.4 药物制备 蓝盆花药材 100 g, 以 16 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 2.5 h, 提取液减压浓缩后冷冻干燥。冻干粉适量以 0.5% 羧甲基纤维素钠生理盐水配制成含冻干粉 0.865 g·mL⁻¹(相当于蓝盆花生药量 2.486 g·mL⁻¹)的灌胃药液, 封存于 4 ℃冰箱中, 使用前超声 10 min 混匀, 备用。

1.5 含药血清的制备 将 6 只 Wistar 雄性大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白组和给药组, 每组 3 只。

给药前禁食 16 h, 自由饮水。给药组按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于成人临床等效剂量的 50 倍) 灌胃“1.4”项下药液 1 次, 空白组给与等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠生理盐水 1 次。乙醚轻度麻醉, 每只大鼠眼底静脉丛取血 0.5 mL。空白组任意时间点采集全血, 给药组分别于给药后 15、30 min 及 1、1.5、3、4、6、12、24 h 采集全血, 室温放置 30 min 后, 离心 10 min (4°C , 离心半径 5 cm, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 得血清。同组相同时间点血清合并, 得空白血清及不同时间点含药血清。另取各时间点含药血清适量, 等量混合, 得混合含药血清。均保存于 -20°C 冰箱, 用于保肝活性测试及血清样品分析。

1.6 HPLC-MS 分析血清成分

1.6.1 色谱条件 色谱柱为 ACE Excel 3 C_{18} -PFP ($100 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$); 流动相为色谱乙腈(A)–0.1% 甲酸水(B), 梯度洗脱程序为: 0~10 min, 5%~10% A; 10~15 min, 10%~21% A; 15~30 min, 21%~22% A; 30~40 min, 22%~35% A; 流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C 自动进样, 进样量为 $5 \mu\text{L}$, 柱温 45°C 。

1.6.2 质谱条件 ESI 负离子检测, SIM 模式下获取质谱信息。鞘气流速 40 arb, 辅助气流速 2 arb, 喷雾电压 3.2 kV, 毛细管离子传输管温度 375°C , S-lens 电压 50 kV, 加热温度 150°C 。

1.6.3 供试液的制备 分别取“1.5”项下空白血清及不同时间点含药血清各 $100 \mu\text{L}$, 加入含 0.3% 甲酸的乙腈 $350 \mu\text{L}$, 超声处理 2 min, 涡旋处理 2 min 以沉淀蛋白; 离心 10 min (4°C , 离心半径 5 cm, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 后静置 5 min; 将上清液转移至另一 EP 管中, 于真空干燥箱中烘干, 以 60% 甲醇–水溶液复溶, 超声处理 2 min, 涡旋处理 1 min; 再次离心 10 min (4°C , 离心半径 5 cm, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液作为供试液。

1.6.4 血清样品分析及数据处理 将上述供试液, 按上述色谱及质谱条件进行血清样品分析, 记录各时间点各药源性成分色谱峰面积, 采用均值变换法进行无量纲化处理。

1.7 HL-7702 细胞的培养 将 HL-7702 细胞置于含 10% PBS 的 RPMI-1640 培养基中, 在 CO_2 培养箱中培养 (5% CO_2 , 37°C), 1~2 d 换液 1 次, 2~3 d 传代 1 次, 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。细胞计数与接种用 $1 \times$ 胰酶 1 mL 消化处于对数期生长的细胞, 待细胞多数回缩变圆, 3 倍

量培养液终止消化, 离心半径 13.5 cm, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 常温离心 3 min; 更换新培养基吹打混匀, 将细胞用 PBS 稀释 10 倍, 计数。将细胞 (密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) 接种于 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 待细胞贴壁后, 进行实验。

1.8 空白血清和混合含药血清对正常 HL-7702 细胞存活率的影响

1.8.1 分组和给药方法 将细胞分为空白组、空白血清组和混合含药血清组, 每组 5 个复孔。细胞贴壁后, 空白组加入细胞培养液, 其他组对应加入空白血清和混合含药血清, 使每孔血清终浓度为 10%, 培养箱中孵育 24 h。

1.8.2 细胞存活率的测定 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT $10 \mu\text{L}$ 继续孵育 4 h, 吸弃培养基, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO, 震荡使结晶溶解。490 nm 波长处测定 OD 值, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (实验组的 OD 值/空白组 OD 值) $\times 100\%$

1.9 各时间点含药血清对 H_2O_2 损伤的 HL-7702 细胞存活率的影响

1.9.1 分组、给药方法及模型复制 模型复制方法参考相关研究^[14], 细胞存活率与空白组比有明显降低, 差异有统计学意义, 且存活率在 60% 左右时, 视为模型复制成功。将细胞分为空白组、模型组、空白血清组以及各时间点含药血清组, 每组 5 个复孔。待细胞贴壁后, 空白组和模型组加入细胞培养液, 其余对应加入空白血清及各时间点含药血清, 使每孔血清终浓度为 10%, 培养箱中孵育 24 h; 模型组、空白血清组及含药血清组加入 H_2O_2 , 使每孔终浓度为 $281.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 孵育 4 h。

1.9.2 细胞存活率的测定 方法同“1.8.2”项下。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 15.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 Prime 5.0 进行单因素方差分析, 组间比较采用 T 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.11 灰色关联度分析 以各时间点含药血清的保肝活性 (细胞存活率) 为参比序列 $X_0(n)$, 以各时间点含药血清样品中各成分的峰面积数据为比较序列 $X_i(n)$, 进行灰色关联度分析。将所有序列的数据通过均值化变换进行标准化处理, 求其差序列和两级最大差、最小差; 绝对差序列: $\Delta 0_i(n) = |X_0(n) - X_i(n)|$, 找出绝对差数列中的最小值 ($\Delta_{\min}$) 和最大值 ($\Delta_{\max}$); 求绝对差的平均值 Δ 和 $\varepsilon = \Delta / \Delta_{\max}$; 参比序列 $\{X_0(n)\}$ 与比较序列 $\{X_i(n)\}$ 关联系数: ξ_{0i}

(n) = $[\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}] / [\Delta_{0i}(n) + \rho \Delta_{\max}]$, 其中 ρ 称为分辨系数, $0 < \rho < 1$, 本研究均选择 $\rho = 0.5$, 该系数的引入是为了提高关联系数之间的差异明显性^[15]。

2 结果

2.1 HPLC-MS 分析血清成分峰面积 结果显示, 各时间点含药血清中体内外共存的药源性成分有 13 个, 包括香叶木素、木犀草素、芹菜素、木犀草苷, 绿

原酸、新绿原酸、咖啡酸、1,5-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸、秦皮乙素, 各时间点含药血清样品中 13 个成分的峰面积及保留时间见表 1。根据前期研究^[13]发现, 15 min 血样中移行成分最多, 且浓度相对较高, 故从 15 min 总离子流图中提取 13 个成分的离子流图作为代表, 详见图 1。

表 1 不同时间点蓝盆花含药血清中各成分峰面积

Table 1 Peak area of each component in drug-containing serum at different time points

成分	保留 时间/min	峰面积								
		15 min	30 min	1 h	1.5 h	3 h	4 h	6 h	12 h	24 h
咖啡酸	9.2	46 388 295	14 291 082	8 055 438	5 808 499	3 005 305	4 665 224	3 490 655	3 469 712	613 649
新绿原酸	5.0	12 924 725	4 064 642	1 287 505	1 148 983	327 558	222 361	1 862 493	804 121	40 844
绿原酸	8.1	32 445 911	10 948 661	4 097 243	3 852 511	1 226 457	1 345 843	4 927 554	2 004 690	397 823
原儿茶酸	4.1	7 406 225	2 607 677	1 350 315	1 044 699	537 969	732 576	477 602	1 635 595	210 836
秦皮乙素	8.8	2 152 116	3 283 748	460 191	2 066 003	1 323 865	1 448 089	786 348	24 289 987	257 557
香叶木素	36.5	14 319 458	28 853 741	37 953 339	45 866 954	8 274 875	5 315 187	14 190 774	34 960 734	33 853 699
芹菜素	34.1	128 506 211	59 239 763	45 472 290	43 886 887	26 825 554	16 148 364	21 656 762	34 238 944	34 477 369
木犀草素	25.9	366 135 376	522 725 692	486 551 091	391 209 102	113 879 941	29 749 333	74 150 226	79 698 037	73 215 770
木犀草苷	17.3	43 140 395	9 526 320	4 630 255	2 974 675	3 728 203	2 356 317	3 489 286	6 583 913	2 069 692
1,5-二咖啡酰基奎宁酸	18.9	91 525 852	18 413 747	10 169 340	7 207 246	6 352 824	5 250 311	7 327 872	8 450 165	3 306 880
3,5-二咖啡酰基奎宁酸	18.0	9 278 780	15 936 212	7 675 947	5 745 799	4 839 840	3 669 109	6 602 899	7 128 937	2 095 098
对香豆酸	13.1	5 440 663	6 285 266	5 564 702	8 496 221	5 551 268	3 881 692	2 403 258	1 478 237	1 428 788
对羟基苯甲酸	6.3	1 599 120	1 014 692	357 489	444 180	253 516	422 467	153 700	750 900	339 890

2.2 空白血清和混合含药血清对正常 HL-7702 细胞存活率的影响 如表 2 所示, 空白血清组与空白组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 而混合含药血清组对正常肝细胞有促增殖作用($P < 0.01$)。

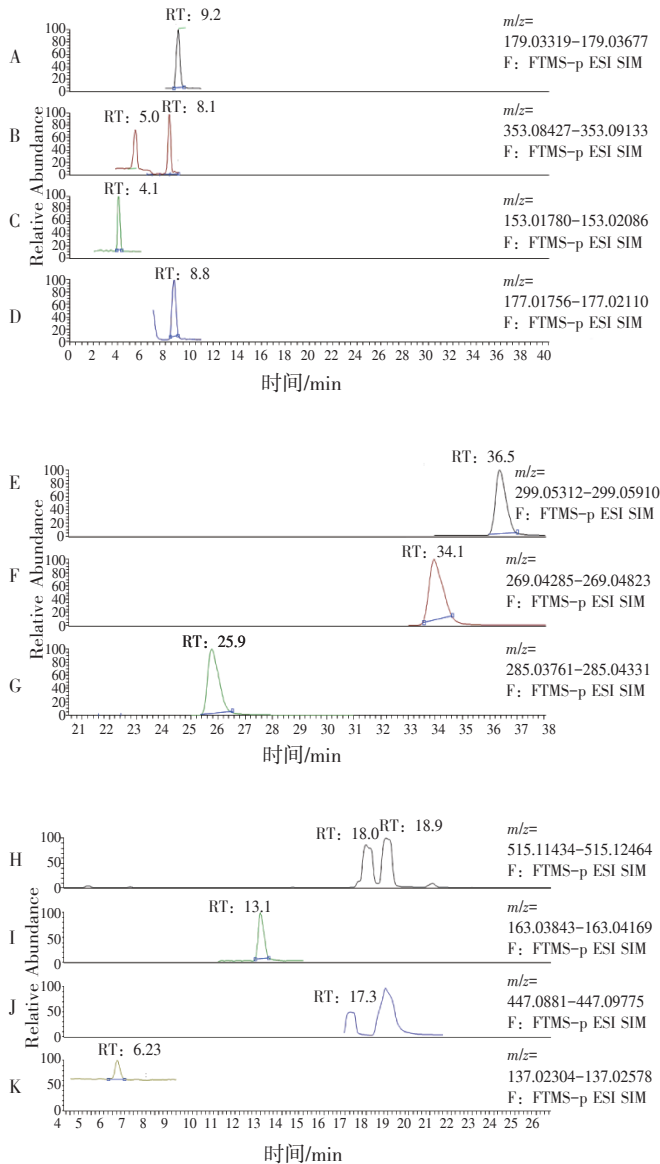
2.3 各时间点含药血清对 H_2O_2 损伤的 HL-7702 细胞存活率的影响 结果见表 3。统计学分析表明, 与空白组比较, 模型组细胞存活率明显降低($P < 0.01$), 表明模型复制成功。与模型组比较, 空白血清组和各时间点含药血清组均可明显提高细胞存活率($P < 0.01$)。与空白血清组比较, 30 min、1 h、12 h、24 h 含药血清组对 H_2O_2 致 HL-7702 肝细胞损伤的拮抗作用更强($P < 0.01$)。

2.4 灰色关联度分析结果 蓝盆花 13 个入血成分与氧化损伤肝细胞存活率的关联度结果见表 4。关联度分析发现, 13 个成分与保肝活性关联度均大于 0.75, 表明这些成分均具有不同程度的抗氧化保肝活性。其中关联度大于 0.8 的成分有 5 个, 分别为 3,5-二咖啡酰基奎宁酸、对香豆酸、香叶木素、芹菜素、对羟基苯甲酸, 提示蓝盆花的这 5 个成分可能

表现出相对较高的抗氧化保肝活性。

针对关联度大于 0.8 的 5 个成分, 以无量纲化后的含药血清样品中各色谱峰峰面积为纵坐标, 时间为横坐标, 建立各成分药时曲线(黑线); 以无量纲化后的细胞存活率为纵坐标, 时间为横坐标, 建立含药血清保肝作用的时效曲线(红线)。由图 2 分析时-量-效间三维关系可知, 0~1.5 h 细胞存活率逐渐升高, 1.5 h 达到最高, 1.5~6 h 呈下降趋势并在 6 h 降至最低, 6~12 h 呈上升趋势, 12~24 h 变化不明显。在多数时间点上, 蓝盆花 5 个成分的峰面积与肝细胞存活率间呈现正相关趋势。对香豆酸和香叶木素峰面积和存活率随时间的变化趋势基本吻合, 且在 1.5 h 峰面积最大时存活率最高, 提示二者发挥着重要的保肝作用。3,5-二咖啡酰基奎宁酸、对香豆酸、香叶木素、芹菜素从 1.5 h 开始, 多数时间点呈现峰面积与存活率正相关趋势, 其中 3,5-二咖啡酰基奎宁酸在 6 h 处峰面积出现小峰值而存活率最低, 推测该成分具有双向调节作用, 当浓度超过一定范围时具有轻微肝细胞毒性。综上分析结果, 关

联度大于 0.8 的蓝盆花 5 个成分对氧化损伤肝细胞具有明显保护作用。



注：A. 咖啡酸；B. 新绿原酸、绿原酸；C. 原儿茶酸；D. 秦皮乙素；E. 香叶木素；F. 芹菜素；G. 木犀草素；H. 3,5-二咖啡酰基奎宁酸、1,5-二咖啡酰基奎宁酸；I. 对香豆酸；J. 木犀草苷；K. 对羟基苯甲酸
图 1 15 min 时蓝盆花含药血清中各成分离子流图

Figure 1 Ion diagram of serum containing drugs at 15 min

表 2 空白血清和混合含药血清对正常 HL-7702 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Effect of blank serum and drug-containing serum on the survival rate of normal hepatocytes HL-7702($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	细胞存活率/%
空白组	100.01 ± 4.34
空白血清组	105.01 ± 3.28
混合含药血清组	113.14 ± 0.94 ^{##}

注：与空白组比，^{##} $P < 0.01$

表 3 各时间点蓝盆花含药血清对 H₂O₂ 损伤的 HL-7702 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of drug-containing serum at different time points on the survival rate of H₂O₂-damaged hepatocytes HL-7702($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	细胞存活率/%
空白组	100.00 ± 5.25
模型组	64.39 ± 5.21 ^{##}
空白血清组	107.12 ± 10.16 ^{**}
15 min 含药血清组	112.99 ± 5.64 ^{**}
30 min 含药血清组	119.02 ± 0.98 ^{**△△}
1 h 含药血清组	128.51 ± 6.92 ^{**△△}
1.5 h 含药血清组	141.01 ± 8.81 ^{**}
3 h 含药血清组	113.85 ± 9.38 ^{**}
4 h 含药血清组	105.83 ± 11.72 ^{**}
6 h 含药血清组	95.63 ± 2.60 ^{**}
12 h 含药血清组	130.13 ± 6.77 ^{**△△}
24 h 含药血清组	128.31 ± 12.04 ^{**△△}

注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与空白血清组比较，^{△△} $P < 0.01$

表 4 蓝盆花 13 个入血成分的量效关联度

Table 4 Dose-effect correlation degree of 13 components in the blood

成分	关联度	成分	关联度
3,5-二咖啡酰基奎宁酸	0.879 8	木犀草素	0.786 1
对香豆酸	0.875 1	1,5-二咖啡酰基奎宁酸	0.781 0
香叶木素	0.866 2	咖啡酸	0.777 4
芹菜素	0.862 6	绿原酸	0.764 6
对羟基苯甲酸	0.829 7	秦皮乙素	0.759 5
原儿茶酸	0.794 1	新绿原酸	0.752 3
木犀草苷	0.788 1		

3 讨论

本研究在前期建立的蒙药蓝盆花醇提物含药血清图谱^[13]基础上，通过灰色关联度分析含药血清样品中 13 个入血原型成分与含药血清保护肝细胞过氧化损伤活性之间的关系，探究蓝盆花保肝活性成分。研究表明，13 个入血原型成分与含药血清的保肝活性间均存在不同程度的相关性，其中 5 个成分(3,5-二咖啡酰基奎宁酸、对香豆酸、香叶木素、芹菜素、对羟基苯甲酸)呈现较强的相关性(量效关联度 > 0.8)，可能在抗氧化保肝活性中发挥较重要作用。香叶木素在 1.5~24 h 内、对香豆酸在 1~6 h 内呈现良好的时-量-效关系，且均在 1.5 h 峰面积最大时具有最强的保肝活性；此外，3,5-二咖啡酰基奎宁酸在 1.5~4 h 内呈现明显的时-量-效关系，提示这 3 个

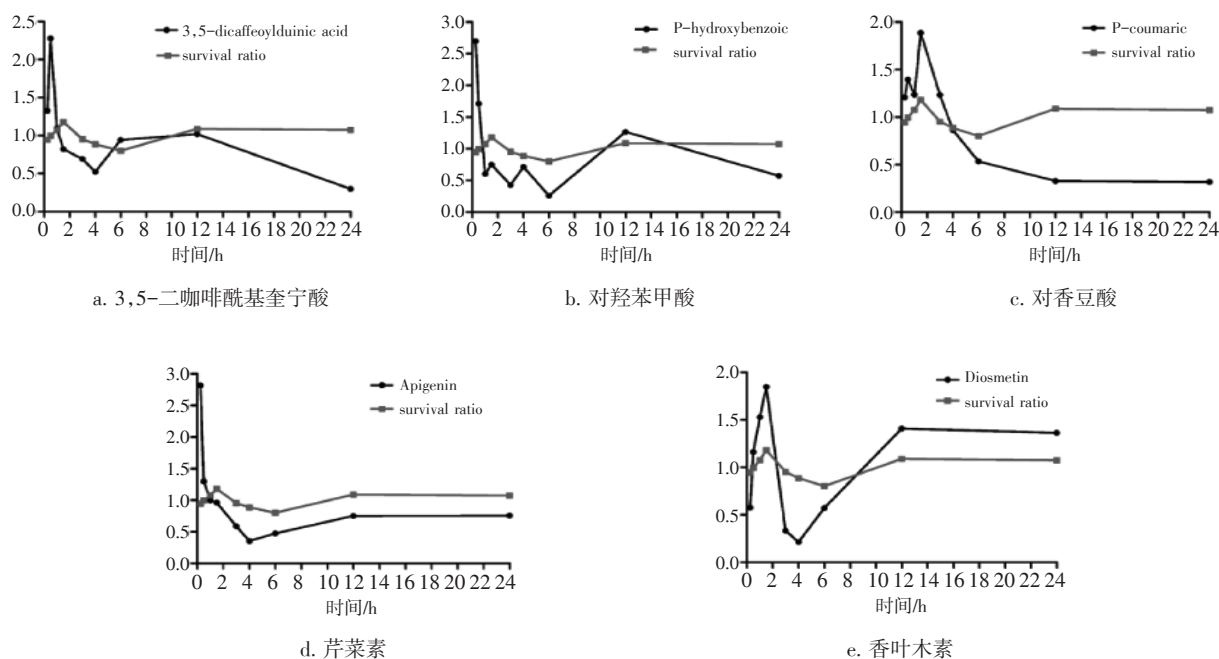


图2 蓝盆花含药血清中部分成分的时-量-效关系

Figure 2 Correlation with time, quality and effect of some components of serum containing drugs

成分在抗氧化保肝活性中可能发挥更重要的作用。

本课题组前期基于网络药理学筛选了蒙药蓝盆花中的保肝活性成分^[16]。本研究基于血清谱效关系和灰色关联度法获得蓝盆花 13 个保肝活性成分,其中有 10 个(芹菜素、木犀草素、咖啡酸、对香豆酸、秦皮乙素、对羟基苯甲酸、原儿茶酸、木犀草苷、新绿原酸、绿原酸)位于网络药理筛选连接度前 20 位,说明本研究分析所得结果与本课题组前期基于网络药理学预测结果基本能够相互印证。麻剑南等^[17]通过 DPPH-UPLC-MS 联用筛选结合体外抗氧化实验获得蓝盆花中 9 个抗氧化活性成分,包含本研究所得 13 个保肝活性成分中的 4 个(木犀草素、木犀草苷、绿原酸、3,5-二咖啡酰基奎宁酸)。以上研究从不同角度研究了蓝盆花中的保肝活性成分,由于网络药理学和血清药理学都考虑了药材中成分的体内吸收和代谢过程,故二者的研究结果具有较高的一致性。血清谱效关系和体外抗氧化活性研究结果吻合度较低,可能有两方面的原因,一是某些体外活性成分由于吸收代谢问题而难以在含药血清中发挥抗氧化作用,二是体外活性筛选供试样品未涵盖某些入血成分。本研究在充分考虑入血成分群综合作用的基础上,从成分体内吸收代谢同时兼顾药效的角度来寻找保肝活性成分,相较网络药理学预测更具有实证性,相较体外活性筛选则更能体现药物成分的体内过程。

有研究^[18-20]表明,蓝盆花醇提物可清除 DPPH 自由基进而发挥保肝作用,推测其中所含黄酮类及酚酸类成分是其抗氧化、清除和抑制自由基的物质基础。 H_2O_2 诱导肝细胞损伤模型是体外研究肝氧化损伤保护作用的经典模型,有学者推测药物可能通过提高肝细胞内 SOD 活性,抑制 MAD 水平增加,增强氧自由基清除能力而发挥对过氧化损伤肝细胞的保护作用^[21]。相关研究^[22-25]表明,3,5-二咖啡酰基奎宁酸对 DPPH 和羟基自由基具有较好的清除作用。对香豆酸可清除活性氧(ROS),终止 ROS 自由链反应^[26]。香叶木素具有抗活性氧自由基、抗炎等作用,并可激活 Nrf2/NQO1-HO-1 信号通路对抗氧化应激,保护 H_2O_2 诱导的 LO₂ 细胞氧化损伤^[27-29]。综上,推断蓝盆花中以香叶木素为代表的黄酮类成分群和以 3,5-二咖啡酰基奎宁酸为代表的酚酸类成分群共同发挥了保肝作用,是蓝盆花治疗肝病的标志性药效物质。本研究可为蓝盆花保肝物质基础研究提供依据,并为其作用机制研究提供参考。

参考文献:

- [1] 奥·乌力吉,布和巴特尔.传统蒙药与方剂[M].赤峰:内蒙古科学技术出版社,2013,273.
- [2] 国家中医药管理局.中华本草·蒙药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2004:385-386
- [3] MA Y H, YUAN H W, JIN R, et al. Flavonoid-rich Scabiosa comosa inflorescence extract attenuates CCL₄-induced hepatic fibrosis

- by modulating TGF- β -induced Smad₃, phosphorylation[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 426-433.
- [4] 黎田儿, 欧阳辉, 杨林军, 等. 蓝盆花属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 226-230.
- [5] 武晓伟, 郝艳艳, 聂春霞, 等. 中药血清药物化学的方法学概述及应用领域研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 173-179.
- [6] 马飞祥, 薛培凤, 王媛媛, 等. 中药血清药物化学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1265-1270.
- [7] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 基于含药血清经时谱-效关系的茵陈蒿汤保肝作用药效物质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(13): 1232-1237.
- [8] 窦志华, 罗琳, 候金燕, 等. 基于方剂配伍含药血清“谱-效关系”的茵陈蒿汤保肝作用药效物质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(22): 1968-1972.
- [9] 潘杰, 刘德胜, 颜贵明. 数据分析应用于中药谱效关系中的研究进展[J]. 中医药学报, 2018, 46(4): 119-122.
- [10] 朱春胜, 聂安政, 王笑, 等. 中药量效关系的研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(7): 1708-1712.
- [11] 吕邵娃, 董书羽, 郭玉岩, 等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 226-230.
- [12] 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584.
- [13] 韩盟帝, 石佳欣, 董馨, 等. 基于HPLC-Q-Exactive-MS法的蒙药蓝盆花血清图谱研究[J]. 中药材, 2019, 42(12): 2843-2849.
- [14] 金明, 王玉娇, 金梅花, 等. 两种细胞建立肝细胞氧化损伤模型比较[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(3): 324-326.
- [15] 陈晓颖, 黄跃前, 陈玉婵, 等. 沉香挥发性成分与其抗肿瘤活性的灰色关联度分析[J]. 中成药, 2018, 40(1): 224-227.
- [16] 王媛媛. 基于网络药理学分析蒙药蓝盆花保肝的作用机制及物质基础[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2018.
- [17] 麻剑南. 苹果梨果皮和蓝盆花的化学成分及生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015.
- [18] 孙媛媛, 焦丹, 董聪聪, 等. 蓝盆花研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2018, 47(3): 299-304.
- [19] 赵宗孝, 好斯巴特, 汤文莉, 等. 五种中药材清除自由基作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(2): 71-72.
- [20] WANG J, LIU K, XU D, et al. Rapid micropropagation system in vitro and antioxidant activity of *Scabiosa tschiliensis* Gruning[J]. Plant Growth Regul, 2013, 69(3): 305-310.
- [21] 沈楠, 黄晓东, 王艳春, 等. 萱草花总黄酮改善肝细胞HL-7702氧化损伤的研究[J]. 中草药, 2015, 46(21): 3208-3213.
- [22] 吴吉, 喻叶楠, 张心怡, 等. 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的稳定性和抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1397-1400.
- [23] 侯彩平, 韩利文, 张凤, 等. 异绿原酸A的抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 72-76.
- [24] FU Z F, TU Z C, ZHANG L, et al. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities[J]. Food Biosci, 2015(15): 11-18.
- [25] MATHEW S, ABRAHAM T E, ZAKARIA Z A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions[J]. J Food Sci Technol, 2015, 52(9): 5790-5798.
- [26] 管西芹, 毛近隆, 唐迎雪, 等. 对香豆酸的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4162-4170.
- [27] 马纳, 李亚静, 范吉平. 香叶木素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 214-217.
- [28] WANG C, LIAO Y, WANG S, et al. Cytoprotective effects of diosmetin against hydrogen peroxide-induced LO₂ cell oxidative damage via activation of the Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 7331-7338.
- [29] YANG Y, GONG X B, HUANG L G, et al. Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice[J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30723-30733.

(编辑: 修春)