

健脾益肾丸指标成分的含量测定及其对CRF模型大鼠钙磷代谢和炎症因子的影响^Δ

江霞^{1,2*}, 陈秋谷², 郭丽琴¹, 胡兆流², 黄诗莹², 王佛长², 郑平², 易铁钢², 张尚斌², 李顺民², 陈剑平^{2#}(1.广州市中医医院药学部, 广州 510130; 2.深圳市中医院深圳市医院中药制剂研究重点实验室, 广东深圳 518033)

中图分类号 R961.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2193-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.07

摘要 目的: 建立健脾益肾丸(JYP)中黄芪甲苷、大黄素、大黄酚的含量测定方法, 并探讨JYP对慢性肾衰竭(CRF)模型大鼠钙磷代谢和炎症因子等相关指标的影响。方法: 采用高效液相色谱法进行含量测定。黄芪甲苷以及大黄素、大黄酚的色谱柱分别为Agilent Zorbax SB-C₁₈、Agilent TC C₁₈, 流动相分别为乙腈-水(36:64, V/V)、甲醇-0.1%磷酸溶液(75:25, V/V), 检测器分别为蒸发光散射检测器和二极管阵列检测器(后者检测波长为254 nm), 柱温分别为30、25℃, 流速均为1.0 mL/min, 进样量分别为20、10 μL。将SD大鼠随机分为正常组、模型组、尿毒清组(1.80 g/kg)和JYP低、中、高剂量组(1.71、3.43、6.85 g/kg), 每组10只。除正常组外, 其余组大鼠均采用5/6肾切除方法复制CRF模型。造模4个月后, 正常组和模型组大鼠均灌胃相应体积水, 各给药组大鼠灌胃相应药物, 每日1次, 连续12周。采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、甲状旁腺激素(PTH)和炎症因子[白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)]含量, 采用甲基百里香酚蓝比色法和磷钼酸法检测其血钙、血磷含量, 采用Pearson检验考察炎症因子与钙磷代谢相关指标(血钙、血磷、PTH)的相关性。结果: 黄芪甲苷、大黄素、大黄酚检测质量浓度的线性范围分别为54.537~381.759、2.960~20.720、6.318~44.223 μg/mL ($r > 0.999$), 定量限分别为0.010、0.288、0.216 μg/mL, 检测限分别为0.003、0.096、0.072 μg/mL, 精密性、重复性、稳定性试验的RSD均小于3.0%, 加样回收率为97.18%~102.33% (RSD < 3%, $n = 9$)。造模后(给药前), 模型组和各给药组大鼠血清Scr、BUN含量均较正常组显著升高($P < 0.01$); 给药后, 各给药组大鼠上述指标均较模型组和同组给药前显著降低($P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组大鼠血钙含量显著降低, IL-6、TNF-α含量均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, JYP中、高剂量组大鼠血钙含量均显著升高, 尿毒清组PTH含量, JYP中、高剂量组PTH、IL-6含量以及各给药组TNF-α含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 但JYP对大鼠血磷含量无显著影响, 且其血清炎症因子与钙磷代谢相关指标均无显著相关性($P > 0.05$)。结论: 本含量测定方法简便、专属性强、灵敏度高, 可用于JYP中黄芪甲苷、大黄素、大黄酚的含量测定。JYP可改善CRF模型大鼠的肾功能, 缓解其钙代谢紊乱, 并抑制其炎症因子的表达。

关键词 健脾益肾丸; 黄芪甲苷; 大黄素; 大黄酚; 含量测定; 高效液相色谱法; 慢性肾衰竭; 钙磷代谢; 炎症因子; 大鼠

Content Determination of Indicator Components in Jianpi Yishen Pills and the Effects on Calcium, Phosphorus Metabolism and Inflammatory Factors in CRF Model Rats

JIANG Xia^{1,2}, CHEN Qiugu², GUO Liqin¹, HU Zhaoliu², HUANG Shiyang², WANG Fochang², ZHENG Ping², YI Tiegang², ZHANG Shangbin², LI Shunmin², CHEN Jianping² (1. Dept. of Pharmacy, Guangzhou Hospital of TCM, Guangzhou 510130, China; 2. Shenzhen Key Lab of Hospital TCM Preparation, Shenzhen Hospital of TCM, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of astragaloside IV, emodin and chrysophanol in Jianpi yishen pills (JYP) and to investigate the effects of JYP on calcium, phosphorus metabolism and inflammatory factors in chronic renal failure (CRF) model rats. METHODS: HPLC method was adopted. The determination of astragaloside IV, emodin and chrysophanol was performed on Agilent Zorbax SB-C₁₈, Agilent TC C₁₈ column, respectively; mobile phase consisted of acetonitrile-water (36:64, V/V) and methanol-0.1% phosphoric acid solution (75:25, V/V); the detectors were evaporative light-scattering detector and diode-array detector (detection wavelength of 254 nm); the column temperatures were set at 30 °C and 25 °C at the flow rate of 1.0 mL/min; the sample sizes were 20 and 10 μL. SD rats were randomly divided into normal group, model group, Niaoduqing group (1.80 g/kg) and JYP low-dose, medium-dose and high-dose groups (1.71, 3.43, 6.85 g/kg), with 10 rats in each group. Except for normal group, CRF model of other groups were established by 5/6 nephrectomy in other groups.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81804052); 深圳市科技计划项目(No.ZDSYS201606081515458、JCYJ20160428182041577)

* 副主任中药师。研究方向: 中药学。E-mail: 342593972@qq.com

通信作者: 副主任中药师, 博士。研究方向: 中药制剂研发。E-mail: lycjp@126.com

Four months after modeling, normal group and model group were given constant volume of water intragastrically; administration groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 12 weeks. The levels of serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), parathyroid hormone (PTH) and inflammatory factors (IL-6, TNF-α) were measured

by ELISA. Methyl thymol blue colorimetric method and phosphomolybdic acid method were used to detect the contents of blood calcium and phosphorus. Correlation of inflammatory factors with related calcium and phosphorus metabolism indexes (blood calcium, blood phosphorus, PTH) were investigated with Pearson assay. RESULTS: The linear range of astragaloside IV, emodin and chrysophanol were 54.537-381.759, 2.960-20.720, 6.318-44.223 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The limits of quantitation were 0.010, 0.288, 0.216 $\mu\text{g/mL}$; the limits of detection were 0.003, 0.096, 0.072 $\mu\text{g/mL}$. RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3.0%. The recoveries were 97.18%-102.33% (RSD<3%, $n=9$). After modeling (before medication), serum contents of Scr and BUN in model group and administration group were increased significantly, compared with normal group ($P<0.01$). After medication, above indexes of administration group were decreased significantly, compared with model group and the same group before medication ($P<0.01$). Compared with normal group, the content of blood calcium were decreased significantly, while the contents of IL-6 and TNF- α were increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the content of blood calcium were increased significantly in JYP medium-dose and high-dose groups, while serum content of PTH in Niaoduqing group, serum contents of PTH and IL-6 in JYP medium-dose and high-dose groups as well as serum content of TNF- α in administration group were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). JYP had no significant effect on blood phosphorus in rats, and there was no correlation of inflammatory factors with related calcium and phosphorus metabolism indexes ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The established content determination method is simple, specific and sensitive, and can be used for content determination of astragaloside IV, emodin and chrysophanol in JYP. JYP can improve renal function of CRF model rats, relieve calcium metabolism disorder and inhibit the expression of inflammatory factors.

KEYWORDS Jianpi yishen pills; Astragaloside IV; Emodin; Chrysophanol; Content determination; HPLC; Chronic renal failure; Calcium and phosphorus metabolism; Inflammatory factors; Rat

慢性肾衰竭(Chronic renal failure, CRF)是各种慢性肾病(CKD)进行性进展的终末阶段,可造成肾单位受损和肾功能不全,从而诱发以钙磷代谢紊乱,水、电解质、酸碱平衡异常以及内分泌失调为主要特征的临床综合征^[1]。2012年流行病学调查结果显示,我国CRF的发病率逐年攀升,已成为危害公众健康的常见严重疾病之一^[2]。目前,临床常用的血液透析、腹膜透析以及化学药物治疗等方式虽疗效较好,但毒副作用明显,且容易诱发患者微炎症状态、贫血等并发症,加之治疗费用昂贵,故其临床应用受到一定限制^[3]。中医药治疗CRF立足于整体观,可调节患者脏腑功能,具有多靶点、多层次、双向调节的综合治疗作用,可有效防止和延缓CRF的发生与发展^[4],故筛选并开发疗效确切、作用持久且毒副作用小的中药制剂对CRF的治疗具有重要意义。

健脾益肾丸(Jianpi yishen pills, JYP)是深圳市中医院(以下简称“我院”)经长期临床实践总结并研制的中药复方制剂,由黄芪、大黄、山药、丹参、白术、豆蔻、酒茯苓、炙甘草等8味药材组成,具有健脾益肾、通腑泄浊、活血化瘀的功效^[5]。该药治疗CRF疗效确切,且无明显不良反应^[6]。前期的初步质量标准研究仅对该方中黄芪、甘草、大黄、酒茯苓等4味药材进行了薄层色谱鉴别,并参照2015年版《中国药典》(四部)“丸剂”项下相应检查项进行了检查^[7-8],尚无法满足现代制剂生产和产品检验工作的相关要求。为了更好地提高JYP的质量标准,确保其临床用药的有效性和安全性,本研究在前期质量标准的基础上,根据JYP的制备工艺,建立了君药黄芪和使药大黄指标成分含量测定的高效液相色谱法

(HPLC),并初步探讨了该方对CRF模型大鼠钙磷代谢和炎症因子等指标的影响,以期完善JYP质量标准、阐明其治疗CRF的具体机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

20A型HPLC仪、ELSD-LT II型蒸发光散射检测器、SPD-M20A型二极管阵列(PDA)检测器(日本Shimadzu公司);Varioskan Flash型全波长扫描式多功能酶标仪、TSU300型超低温冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);BS224S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);J3000型动物电子秤(德国G&G公司);DD-2型高频电刀(北京东方神健医疗器械有限公司);3K30型离心机(德国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

JYP及其缺黄芪阴性对照样品、缺大黄阴性对照样品(即按处方工艺制备的缺相应药材的对照样品)均由我院制剂室自制,批号分别为20180615、20180625、20180620,规格均为0.05 g;尿毒清颗粒[阳性对照,康臣药业(内蒙古)有限责任公司,批号:20130628,规格:每袋5 g];黄芪甲苷对照品(批号:110781-201717,纯度:96.9%)、大黄素对照品(批号:110756-201512,纯度:98.7%)、大黄酚对照品(批号:110796-201621,纯度:99.2%)均购自中国食品药品检定研究院;白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、甲状旁腺激素(PTH)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(天津安诺瑞康生物技术有限公司,批号分别为385171104、569171102、468171104);钙、磷测试盒以及血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)测试盒(南京

建成生物工程研究所,批号分别为20171022、20170913、20171024、20171027);乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,雌雄各半,8周龄,体质量180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0002。

2 方法与结果

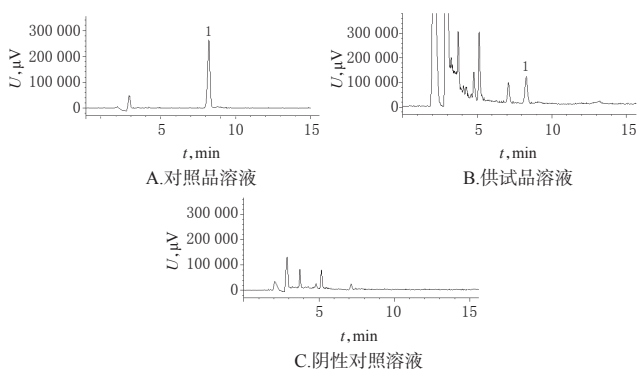
2.1 健脾益肾丸指标成分的含量测定

2.1.1 黄芪甲苷含量测定 由于JYP中的君药黄芪采用水煎煮提取,故针对此工艺路线,本研究建立了黄芪所含指标成分黄芪甲苷^[9]的含量测定方法,以保证其成品质量的稳定均一。

(1)色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测器为蒸发光散射检测器(漂移管温度:55 ℃,氮气压力:360 kPa),流动相为乙腈-水(36:64, V/V),柱温为30 ℃,流速为1.0 mL/min,进样量为20 μL。

(2)溶液的制备:①取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成质量浓度为0.2 mg/mL的对照品溶液。②取JYP样品适量,粉碎,精密称定10 g,加入甲醇50 mL,加热回流1 h,滤过,残渣用甲醇洗涤3次,每次20 mL;合并洗涤液,蒸干,残渣用水50 mL溶解,用经水饱和的正丁醇振摇萃取4次,每次40 mL;合并正丁醇萃取液,用经正丁醇饱和的水洗涤3次,每次40 mL,再用1%氢氧化钠溶液洗涤3次,每次40 mL;合并洗涤液,蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至5 mL量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。③取缺黄芪阴性对照样品10 g,精密称定,按上述供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。

(3)专属性试验:精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1.1(1)”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,对照品溶液和供试品溶液在相同位置有同一色谱峰,且阴性对照溶液无干扰,表明本方法专属性良好,详见图1。



注:1.黄芪甲苷

Note: 1. astragaloside IV

图1 高效液相色谱图(黄芪)

Fig 1 HPLC chromatograms (*Astragalus membranaceus*)

(4)线性关系以及定量限和检测限考察:取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成质量浓度为0.779 1 mg/mL的贮备液。精密吸取上述贮备液0.07、0.14、0.28、0.35、0.42、0.49 mL,置于1 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得质量浓度分别为54.537、109.074、218.148、272.685、327.222、381.759 μg/mL的线性对照品溶液,按“2.1.1(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(μg/mL)的自然对数(x)为横坐标、峰面积的自然对数(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=1.225 4x+8.057 3$ ($r=0.999 7$),表明黄芪甲苷检测质量浓度线性范围为54.537~381.759 μg/mL。另以信噪比10:1,3:1测得定量限、检测限分别为0.010、0.003 μg/mL。

(5)精密度、重复性、稳定性、回收率考察:①取“2.1.1(2)”项下供试品溶液适量,按“2.1.1(1)”项下色谱条件连续进样测定6次,考察方法精密度。②取同一批JYP样品适量,按“2.1.1(2)”项下方法平行制备6份供试品溶液,进样测定,考察重复性。③取上述重复性试验的同一份供试品溶液,分别于室温下放置0、3、6、9、12、18 h时进样测定,考察样品稳定性。④取JYP样品4份,分别由两位研究者按前述方法制备供试品溶液,以同一仪器进样测定,考察中间精密度。⑤取9份已知含量的JYP样品5 g,精密称定,分别按质量比1:0.5、1:1、1:1.5加入黄芪甲苷对照品适量,再按前述方法制得低、中、高质量浓度样品溶液,进样测定,并计算加样回收率。结果,精密度、重复性、稳定性试验中黄芪甲苷含量(以标准曲线法计算)的RSD均小于2.0%;低、中、高质量浓度样品的平均加样回收率分别为101.80%、100.37%、101.51%,RSD分别为2.13%、2.08%、1.23%。

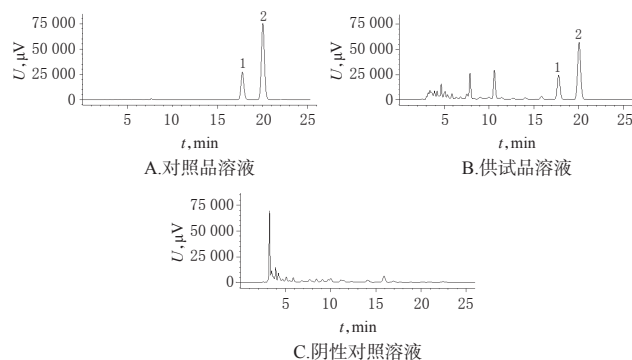
(6)样品含量测定:取JYP样品10 g,平行3份,按“2.1.1(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按标准曲线法计算得黄芪甲苷的平均含量为0.102 mg/g;按公式[转移率=JYP样品中黄芪甲苷的含量/(黄芪药材中黄芪甲苷的含量×每克JYP中黄芪药材的质量)×100%]计算得转移率为47.13%[其中,按2015年版《中国药典》(一部)“黄芪”项下黄芪甲苷含量测定方法^[10]测得黄芪药材中黄芪甲苷的含量为0.402 mg/g,每克JYP中含黄芪药材0.538 4 g]。

2.1.2 大黄素和大黄酚含量测定 由于JYP中的大黄、白术[2015年版《中国药典》(一部)中无含量测定指标成分]、豆蔻(含量测定指标成分按油精具有挥发性,稳定性欠佳)等药味均经粉碎后入药,故针对此工艺路线,本研究建立了大黄所含指标成分大黄素、大黄酚^[11]的含量测定方法,以保证其成品质量的稳定均一。

(1)色谱条件:色谱柱为Agilent TC C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测器为PDA检测器,检测波长为254 nm,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(75:25, V/V),柱温为25 ℃,流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL。

(2)溶液的制备:①取大黄素、大黄酚对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解,制得质量浓度分别为12、24 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。②取JYP样品适量,粉碎,精密称定1.5 g,加入甲醇25 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液5 mL,挥去溶剂,残渣加8%盐酸溶液10 mL,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理2 min,再加三氯甲烷10 mL,加热回流1 h;放冷,置分液漏斗中,用三氯甲烷振摇萃取3次,每次10 mL;合并三氯甲烷萃取液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇复溶并定容至10 mL量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。③取缺大黄阴性对照样品1.5 g,精密称定,按上述供试品溶液制备方法制得阴性对照溶液。

(3)专属性试验:精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1.2(1)”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,对照品溶液和供试品溶液在相同位置有同一色谱峰,且阴性对照溶液无干扰,表明本方法专属性良好,详见图2。



注:1.大黄素;2.大黄酚

Note:1. emodin;2. chrysophanol

图2 高效液相色谱图(大黄)

Fig 2 HPLC chromatograms (*Rheum palmatum*)

(4)线性关系以及定量限和检测限考察:取大黄素、大黄酚对照品各适量,精密称定,用甲醇溶解,制成质量浓度分别为0.118 4、0.180 5 mg/mL 的单一贮备液。精密吸取上述大黄素贮备液0.25、0.50、1.00、1.25、1.50、1.75 mL,大黄酚贮备液0.35、0.70、1.40、1.75、2.10、2.45 mL,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得大黄素质量浓度分别为2.960、5.920、11.840、14.800、17.760、20.720 $\mu\text{g/mL}$,大黄酚质量浓度分别为6.318、12.635、25.270、31.588、37.905、44.223 $\mu\text{g/mL}$ 的混合线性对照品溶液,按“2.1.2(1)”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以待测物质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得大黄素、大黄酚的回归方程分别为 $y=43\ 557.7x-29\ 724.5$ ($r=0.999\ 1$)、 $y=59\ 374.6x-70\ 701.2$ ($r=0.999\ 6$),表明大黄素、大黄酚检测质量浓度线性范围分别为2.960~20.720、6.318~44.223 $\mu\text{g/mL}$ 。另以信噪比10:1、3:1测得大黄

素、大黄酚的定量限分别为0.288、0.216 $\mu\text{g/mL}$,检测限分别为0.096、0.072 $\mu\text{g/mL}$ 。

(5)精密度、重复性、稳定性、回收率考察:①取“2.1.2(2)”项下供试品溶液适量,按“2.1.2(1)”项下色谱条件连续进样测定6次,考察方法精密度。②取同一批JYP样品,按“2.1.2(2)”项下方法平行制备6份供试品溶液,进样测定,考察重复性。③取上述重复性试验的同一份供试品溶液,分别于室温下放置0、1、2、3、6、9、12、18、24 h时进样测定,考察样品稳定性。④取JYP样品4份,分别由两位研究者按前述方法制备供试品溶液,以同一仪器进样测定,考察中间精密度。⑤取9份已知含量的JYP样品0.75 g,精密称定,分别按质量比1:0.5、1:1、1:1.5加入大黄素、大黄酚对照品适量,再按前述方法制得低、中、高质量浓度样品溶液,进样测定,并计算加样回收率。结果,精密度、重复性、稳定性试验中大黄酚、大黄素含量(以标准曲线法计算)的RSD均小于3.0%;大黄素低、中、高质量浓度样品溶液的加样回收率分别为99.78%、98.91%、97.18%,RSD分别为1.55%、0.76%、0.51%;大黄酚低、中、高质量浓度样品溶液的加样回收率分别为98.29%、102.33%、98.94%,RSD分别为1.02%、0.32%、0.70%。

(6)样品含量测定:取JYP样品1.5 g,平行3份,按“2.1.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按标准曲线法计算得大黄素和大黄酚的含量分别为0.341、0.770 mg/g ,两者总含量为1.111 mg/g ;按“2.1.1(6)”项下公式计算得转移率为97.90%[其中,按2015年版《中国药典》(一部)“大黄”项下总蒽醌含量测定方法^[10]测得药材中大黄素和大黄酚的总含量为6.322 mg/g ,每克JYP中含大黄药材0.179 5 g]。

2.2 JYP对CRF模型大鼠钙磷代谢和炎症因子等指标的影响

2.2.1 分组 所有大鼠均适应性喂养7 d,然后随机分为正常组、模型组、尿毒清组以及JYP低、中、高剂量组,每组10只,雌雄各半。

2.2.2 给药剂量确定 按照《中药药理研究方法学》中的“体表面积比换算法”^[12]换算,分别以尿毒清1.80 g/kg (按成人临床等效剂量的1倍换算而得)以及JYP 1.71、3.43、6.85 g/kg (分别按成人临床等效剂量的1/4、1/2、1倍换算而得)作为后续实验的给药剂量。

2.2.3 模型复制 采用5/6肾切除方法复制大鼠CRF模型^[13-14]:腹腔注射10%水合氯醛溶液进行麻醉,从右背部切开腹腔,用静脉夹夹住肾蒂后,使用高频电刀切除2/3右肾,止血后复位肾脏;2周后同法切除左肾。正常组大鼠仅以相同步骤打开腹腔,暴露肾脏后复位,避免牵拉肾脏。造模4个月后,正常组和模型组大鼠均灌胃相应体积水,各给药组大鼠灌胃相应药物(20 mL/kg,均以水

为溶剂),每日1次,连续12周。

2.2.4 相关指标检测及统计分析 分别于造模后(给药前)和末次给药后1 h取各组大鼠血液并分离血清,采用ELISA法以酶标仪检测血清中Scr、BUN(给药前及给药后)以及PTH、炎症因子(给药后)含量,分别采用甲基百里香酚蓝比色法和磷钼酸法检测其血钙、血磷含量(给药后)。严格按照相应试剂盒说明书操作。采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用SNK或Dunnett's T3法,相关性分析采用Pearson法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,结果见表1、表2。

表1 各组大鼠给药前后血清Scr、BUN含量比较($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{mol/L}$)

Tab 1 Comparison of serum contents of Scr and BUN in rats of each group before and after administration($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{mol/L}$)

组别	给药前		给药后	
	Scr	BUN	Scr	BUN
正常组	72.46 ± 25.30	4.60 ± 0.38	79.38 ± 27.46	1.90 ± 0.32
模型组	151.90 ± 82.25**	11.35 ± 2.74**	243.49 ± 53.54**	5.28 ± 0.89**
尿毒清组	152.34 ± 30.90**	12.09 ± 3.89**	92.76 ± 36.04 ^{###}	3.23 ± 1.44 ^{###}
JYP低剂量组	159.52 ± 29.18**	13.37 ± 6.34**	143.89 ± 37.03 ^{###}	3.56 ± 0.46 ^{###}
JYP中剂量组	162.82 ± 29.10**	10.54 ± 1.47**	75.22 ± 25.31 ^{###}	3.09 ± 0.79 ^{###}
JYP高剂量组	155.83 ± 24.35**	10.03 ± 1.57**	57.97 ± 19.02 ^{###}	3.18 ± 0.45 ^{###}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{###} $P < 0.01$;与同组给药前比较,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ^{###} $P < 0.01$; vs. the same group before administration, ^{##} $P < 0.01$

表2 各组大鼠给药后血钙、血磷和炎症因子含量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Comparison of the contents of blood calcium, phosphorus and inflammatory factors in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	血钙,mmol/L	血磷,mmol/L	PTH,pg/mL	IL-6,pg/mL	TNF- α ,pg/mL
正常组	1.65 ± 0.09	2.12 ± 0.22	253.68 ± 12.93	4.68 ± 1.82	236.7 ± 21.52
模型组	1.39 ± 0.13**	2.52 ± 0.92	257.24 ± 24.38	13.47 ± 1.75**	472.35 ± 63.64**
尿毒清组	1.46 ± 0.19	2.36 ± 0.47	183.01 ± 38.85*	9.55 ± 3.14	196.09 ± 11.89 ^{##}
JYP低剂量组	1.57 ± 0.15	2.16 ± 0.18	188.12 ± 25.95	9.59 ± 3.30	205.19 ± 30.86 ^{##}
JYP中剂量组	1.66 ± 0.10 ^{##}	2.09 ± 0.34	176.42 ± 15.80 ^{##}	8.28 ± 2.10*	185.12 ± 26.23 ^{##}
JYP高剂量组	1.73 ± 0.07 ^{##}	2.15 ± 0.72	161.92 ± 17.26 ^{##}	7.61 ± 2.53 [#]	173.18 ± 13.70 ^{##}

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

由表1可见,造模后(给药前),模型组和各给药组大鼠血清Scr、BUN含量均较正常组显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。给药后,模型组大鼠血清Scr、BUN含量均较正常组显著升高,但各给药组大鼠血清Scr、BUN含量均较模型组和同组给药前显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

由表2可见,与正常组比较,模型组大鼠血钙含量显著降低,IL-6、TNF- α 含量均显著升高,差异均有统计学

意义($P < 0.01$)。与模型组比较,JYP中、高剂量组大鼠血钙含量均显著升高;尿毒清组大鼠血清PTH含量,JYP中、高剂量组PTH、IL-6含量以及各给药组TNF- α 含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但JYP对大鼠血磷含量的影响无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.5 炎症因子与钙磷代谢相关指标的相关性分析 由于CRF患者除钙磷代谢紊乱等临床症状外,通常还伴随不同程度的微炎症状态^[15],故本研究采用Pearson检验考察了各给药组大鼠血清炎症因子与钙磷代谢相关指标的相关性。结果显示,各给药组大鼠的炎症因子IL-6、TNF- α 与血钙、血磷、PTH的相关性均无统计学意义($P > 0.05$),详见表3。

表3 炎症因子与钙磷代谢相关指标的相关性

Tab 3 Correlation between inflammatory factors and related indexes of calcium and phosphorus metabolism

炎症因子	钙磷代谢指标	尿毒清组		JYP低剂量组		JYP中剂量组		JYP高剂量组	
		r	P	r	P	r	P	r	P
IL-6	血钙	-0.22	0.64	0.25	0.60	0.05	0.91	-0.20	0.70
	血磷	-0.57	0.24	0.08	0.87	-0.46	0.44	-1.94	0.76
	PTH	-0.04	0.93	0.46	0.30	0.05	0.91	-0.64	0.17
TNF- α	血钙	0.14	0.72	-0.11	0.81	-0.05	0.90	-0.63	0.10
	血磷	0.57	0.18	-0.41	0.50	0.05	0.93	-0.44	0.45
	PTH	0.29	0.45	-0.62	0.14	0.16	0.69	0.07	0.87

3 讨论

3.1 含量测定指标成分的选择及方法的优化

现代药理研究表明,黄芪甲苷、大黄素和大黄酚具有良好的免疫调节、抑制炎症因子表达、抑制肾组织纤维化、改善肾功能等作用^[16-18];同时,三者作为黄芪、大黄的指标成分,含量较高,性质稳定^[9,11],故结合JYP的制剂工艺,本研究选取君药黄芪中的黄芪甲苷作为水提工艺路线的质控指标,使药大黄中的大黄素和大黄酚作为粉碎入药工艺路线的质控指标,建立其含量测定方法,以完善JYP的质量控制体系。

本研究参照文献[19]建立了黄芪甲苷的含量测定方法,发现若以氨水作为洗涤溶剂,制得的供试品溶液黏度较大,且色谱图基线不平、峰面积波动大、峰形及分离度较差,故将氨水更换为1%氢氧化钠溶液,其余条件不变。结果,黄芪甲苷可达到较理想的分离效果,且峰形较好,色谱图基线平稳,黄芪甲苷转移率高,可用于样品中黄芪甲苷含量的测定。

此外在研究过程中,笔者发现黄芪的另一有效活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷与酒苿蓉中松果菊苷的极性相似,干扰较大,而变换流动相、色谱柱、柱温、流速、供试品制备方法均无法将两者有效分离,故本研究暂未将毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为水提工艺路线的质控指标。

同时,笔者在建立粉碎入药工艺路线指标成分的含量测定方法时发现,由于处方中有多数药材均经粉碎后

入药,导致测定大黄总蒽醌时杂质较多,干扰严重,且除杂操作易导致总蒽醌成分损失,故本研究仅选择了大黄总蒽醌中含量相对较高且性质较为稳定的大黄素和大黄酚作为该工艺路线的质控指标。

方法学考察结果显示,本研究建立的两种HPLC法简便、快速,可用于黄芪甲苷、大黄素、大黄酚的定量分析。在后续研究中,本课题组将进一步优化毛蕊异黄酮葡萄糖苷和总蒽醌的含量测定方法,以期进一步完善JYP的质量控制标准。

3.2 动物实验阳性药物的选择

经临床实践和实验研究证实,尿毒清颗粒是一种有效的中药复方制剂,在我国临床已有20多年的应用历史,对CRF具有良好的疗效^[20],故本研究选择尿毒清颗粒作为阳性对照。本研究结果显示,尿毒清颗粒可显著降低CRF模型大鼠血清Scr、BUN含量,改善其肾功能,下调其血清PTH的含量,抑制炎症因子TNF- α 的表达,与已有文献的结果^[20]基本一致。

3.3 JYP对CRF模型大鼠相关指标的影响

JYP是基于国医大师邓铁涛教授“五脏相关学说”理论^[21],并结合我院治疗慢性肾衰竭20余年的临床经验总结而得的有效复方制剂。该方重用黄芪益气健脾升阳运枢为君药;白术、山药健脾补肾,以助肾脏气化为臣药;肉苁蓉温肾扶阳、润肠通便,豆蔻温中化湿行气,共为佐药;丹参活血祛瘀,大黄消癥散结、荡涤肠胃、推陈致新,共为使药,可开启脾胃升降之枢,通腑泻浊,清解血分之毒;炙甘草健脾并调和诸药;诸药合用,攻补兼施,共奏健脾益肾、活血化浊之功^[5]。本研究初步探讨了JYP对CRF模型大鼠Scr、BUN、钙磷代谢以及炎症因子等相关指标的影响。结果显示,造模后(给药前),模型组和各给药组大鼠血清Scr、BUN含量均较正常组显著升高,提示大鼠肾功能受到损伤,模型复制成功。给药后,模型组大鼠血清Scr、BUN含量均较正常组显著升高,而各给药组大鼠血清Scr和BUN含量均较模型组 and 同组给药前显著降低,提示JYP可降低CRF模型大鼠血清Scr、BUN含量,改善其肾功能。

本研究结果还显示,与正常组比较,模型组大鼠血钙含量显著降低,IL-6、TNF- α 含量均显著升高,提示CRF可导致大鼠体内钙代谢紊乱、炎症因子表达增加。与模型组比较,JYP中、高剂量组大鼠血钙含量均显著升高,尿毒清组大鼠血清PTH含量,JYP中、高剂量组PTH、IL-6含量以及各给药组TNF- α 含量均显著降低,提示JYP可减轻大鼠体内钙代谢紊乱,并抑制炎症因子的表达。但本研究并未发现JYP对大鼠血磷含量的影响,其具体机制有待后续研究予以探索。

由于CRF患者在疾病的不同阶段中伴有不同的微炎症症状^[15],故本研究进一步考察了炎症因子含量与钙磷代谢相关指标的相关性。结果显示,炎症因子IL-6、

TNF- α 与钙磷代谢相关指标无显著相关性,这与已有文献的结果^[22]基本一致。但值得注意的是,也有研究得出了不同的结论,如吴金庆^[23]研究发现,CKD 4~5期患者血清钙磷乘积与炎症因子(IL-6、超敏C反应蛋白)有关,而在CKD 1~3期患者中却未发现类似相关性。由此可见,本研究结论尚有待进一步确证。

综上所述,本研究建立的HPLC法简便、专属性强、灵敏度高,可用于JYP中黄芪甲苷、大黄素、大黄酚的含量测定以及JYP的质量控制;JYP可改善CRF模型大鼠的肾功能,缓解其钙代谢紊乱,并抑制炎症因子的表达。

参考文献

- [1] 王靖,宁重博,张翠娥,等.临床药师参与1例慢性肾衰竭患者药物治疗的实践与分析[J].中国药房,2016,27(26):3729-3732.
- [2] 刘东伟.慢性肾脏病流行病学和危险因素变迁及其系统评价[D].郑州:郑州大学,2015.
- [3] 罗进辉.血液灌流频率差异对行维持性血液透析患者炎症细胞因子水平、钙磷代谢及感染风险的影响[J].河北医药,2017,39(6):850-853.
- [4] 王丽芳,郝丛莉.中医药治疗慢性肾衰竭概况[J].实用中医内科杂志,2016,30(7):116-118.
- [5] 陈剑平,郑平,李中桂,等. HPLC-MS法同时测定健脾益肾丸中8个成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(6):962-967.
- [6] 韩鹏勋,王天星,易无庸.健脾益肾方的基础与临床研究评述[J].新中医,2009,41(9):94-95.
- [7] 何泰东,李曙光.健脾益肾方的质量控制初步研究[J].按摩与康复医学,2017,8(11):75-78.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:11-13.
- [9] 曹玉冰.黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J].现代药物与临床,2017,32(5):954-960.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:23-24,302-303.
- [11] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等.大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):227-234.
- [12] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1012.
- [13] 陈剑平,陈秋谷,胡兆流,等.基于药效筛选和正交试验优化健脾益肾丸的制备工艺[J].中草药,2018,49(24):5817-5822.
- [14] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:562.
- [15] 门雯瑾,丁致民.不同血液净化方式对血液透析患者微炎症与营养状况的影响[J].中国临床医生杂志,2015,43(10):20-23.
- [16] 曹耀辰,任国庆,胡佳琳,等.黄芪甲苷肾保护作用机制的最新研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(75):102.

eEF2K 蛋白同源模建及其抑制剂小分子的虚拟筛选研究[△]

黎玉梅^{1*}, 孔研², 于大永¹, 宋昱¹, 唐川^{1#a}, 史丽颖^{3#b} (1. 大连大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116622; 2. 大连市第三人民医院肿瘤科, 辽宁大连 116033; 3. 大连大学药物研究所, 辽宁大连 116622)

中图分类号 R914.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2199-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.08

摘要 目的: 筛选潜在的真核生物延伸因子2激酶(eEF2K)抑制剂小分子, 为eEF2K抑制剂的设计和研发提供参考。方法: 采用同源模建技术构建eEF2K蛋白晶体结构模型, 并进行Loop优化和分子动力学优化, 借助SAVES在线服务器从Verify_3D、EERAT和拉氏图等3个方面对上述模型进行评估。收集55个eEF2K抑制剂小分子, 使用Insight II软件以其中的28个(编号为奇数, 设为训练集)为基础构建具有活性预测能力的Hypogen药效团模型, 以另外27个(编号为偶数, 设为测试集)进行验证, 通过拟合活性[即半数抑制浓度的负对数(pIC₅₀)]预测值与真实值并借助Ligand profiler热图筛选最优药效团模型。结合上述药效团模型和Lipinski五规则、分子对接方法进行eEF2K抑制剂小分子的虚拟筛选。结果与结论: 所建eEF2K蛋白晶体结构模型的整体质量因素得分为93.697, 其中83.33%的氨基酸Verify_3D得分≥0.2, 且位于不允许区的氨基酸占氨基酸总数的1.7%, 其氨基酸构象及骨架结构合理, 模型可靠性高。共构建了9个具有活性预测功能的Hypogen药效团模型(02~10号), 其中03号药效团模型包含2个氢键受体和2个共轭芳香环, 可更好地区分活性及非活性分子, 其pIC₅₀预测值与真实值拟合最好(相关系数为0.6653), 具有较好的预测能力和较高的可靠性。通过虚拟筛选最终获得9个潜在的eEF2K抑制剂小分子(pIC₅₀预测值为1.074~1.185, 分子与蛋白相互作用的Docking-score得分为-9.730~-7.467), 其中Pro268、Asp267、Gln171、Phe121、Glu212可能是eEF2K抑制剂与靶点蛋白相互作用的关键氨基酸, 作用方式包括氢键、盐桥、疏水等。上述分子有望成为eEF2K抑制剂研发的先导化合物。

关键词 真核延伸因子2激酶; 抑制剂小分子; 同源模建; Hypogen药效团; 分子对接; 虚拟筛选

Study on Homology Modeling of eEF2K Protein and Virtual Screening of Its Inhibitors Molecules

LI Yumei¹, KONG Yan², YU Dayong¹, SONG Yu¹, TANG Chuan¹, SHI Liying³ (1. School of Life Sciences and Technology, Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China; 2. Dept. of Oncology, Dalian Third People's Hospital, Liaoning Dalian 116033, China; 3. Institute of Materia Medica, Dalian University, Liaoning Dalian 116622, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To screen potential eEF2K inhibitor molecules, and to provide reference for the design and R&D of eEF2K inhibitor. METHODS: The eEF2K crystal structure model was constructed by homology modeling technique. The model was optimized by Loop optimization and molecular dynamics. With the help of SAVES online server, the above models were evaluated from three aspects such as Verify_3D, EERAT and Laplace diagram. Totally 55 eEF2K inhibitor molecules were collected. Hypogen pharmacophore model with activity prediction ability was constructed based on 28 of them (odd number, as training set) by Insight II software and validated by other 27 (even number, as test set). The optimal pharmacophore model was screened by fitting the predicted and experimental values of activity [i.e. negative logarithm of half inhibitory concentration (pIC₅₀)] and using Ligand profiler thermogram. The virtual screening of small molecules of eEF2K inhibitors was carried out by combining

[17] 龚小军, 郜朝霞, 王传明. 大黄素对急性胰腺炎大鼠相关性因子表达的影响[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2095-2098.

[18] 孙东东, 刘丽萍, 沈卫星, 等. 补肾活血方有效组分及部分化合物的体外抗炎活性研究[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(6): 127-130.

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.21606030)

* 硕士研究生。研究方向: 天然活性物质。E-mail: meimei-yu@outlook.com

通信作者a: 副教授, 博士。研究方向: 超临界流体技术。电话: 0411-87402107。E-mail: jiemotc@gmail.com

通信作者b: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 天然活性物质。电话: 0411-87402107。E-mail: shiliying@dlu.edu.cn

[19] 林绪芳, 张礼菊, 邓晓辉. 黄芪甲苷定量检测方法比较[J]. 中国药房, 2007, 18(21): 1670-1671.

[20] 庄振起, 周广宇, 尹敏, 等. 尿毒清治疗慢性肾脏病的基础和临床研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2482-2485.

[21] 刘小斌, 刘友章. 邓铁涛教授五脏相关学说略介[J]. 上海中医药杂志, 2002, 36(7): 36-37.

[22] 茶春丽, 李靖娟, 陈国妹, 等. 透析患者微炎症状态与血脂代谢及钙磷代谢的相关性[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(1): 41-45.

[23] 吴金庆. 慢性肾脏病患者不同分期血清钙、磷、IL-6及hs-CRP相关性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.

(收稿日期: 2018-12-23 修回日期: 2019-06-11)

(编辑: 张元媛)