

大鼠胆汁中黄芩苷代谢物的分离、纯化及其对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响研究[△]

朱亚南^{1,2*}, 张 硕^{2,3}, 张 敏^{2,3}, 孟小夏^{2,3}, 杨七妹², 汤 磊^{2,4}, 张荣平⁵, 高秀丽^{1,2,3#}(1.省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550025; 2.贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 3.贵州省高校微生物与生化药学工程中心, 贵阳 550004; 4.贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004; 5.昆明医科大学药学院, 昆明 650500)

中图分类号 R284.1; R284.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0800-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.07

摘要 目的: 从大鼠胆汁中分离纯化黄芩苷的代谢物, 并研究其对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响。方法: 取 6 只 SD 大鼠, 麻醉后进行胆管插管, 待大鼠清醒后, 灌胃给予黄芩苷(168 mg/kg), 收集灌胃给药后 24 h 的胆汁样品 1, 经处理后, 采用高效液相色谱法进行初步分析; 另取 5 只 SD 大鼠, 同上方法麻醉、插管后, 灌胃给予黄芩苷(400 mg/kg), 并收集灌胃给药后 48 h 的胆汁样品 2, 经处理后, 采用半制备型高效液相色谱法对代谢物进行分离纯化; 采用紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振技术并结合其理化性质对分离得到的代谢物进行鉴定; 采用 MTT 法及高内涵细胞成像分析法研究代谢物对 HepG2 细胞增殖的影响。结果: 黄芩苷通过胆汁主要代谢成代谢物 1 和代谢物 2, 经分离纯化后分别鉴定为千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和黄芩素 6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。MTT 法结果显示, 代谢物 2 对 HepG2 细胞具有显著的增殖抑制作用, 其半数抑制浓度(IC₅₀) 为 90 μg/mL; 高内涵细胞成像分析结果显示, 在一定浓度下, 代谢物 2 可能通过改变 HepG2 细胞线粒体分布及膜通透性从而抑制细胞增殖(代谢物 1 的药理活性已有报道, 本研究略去)。结论: 成功分离并鉴定出 2 个黄芩苷的胆汁代谢物, 其中代谢物 2 黄芩素 6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷对 HepG2 细胞具有显著的增殖抑制作用。

关键词 黄芩苷; 代谢物; 千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 黄芩素 6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; 分离纯化; 高内涵细胞成像分析; 肝癌细胞 HepG2

Study on the Isolation and Purification of Baicalin Metabolites from Rat Bile and Its Effect on the Proliferation of Liver Cancer HepG2 Cells

ZHU Yanan^{1, 2}, ZHANG Shuo^{2, 3}, ZHANG Min^{2, 3}, MENG Xiaoxia^{2, 3}, YANG Qimei², TANG Lei^{2, 4}, ZHANG Rongping⁵, GAO Xiuli^{1, 2, 3} (1.State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants Co-constructed by Province and Ministry, Guiyang 550025, China; 2.School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3.Guizhou Provincial College of Microbiology and Biochemical Pharmacy Engineering Center, Guiyang 550004, China; 4.Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang 550004, China; 5.School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To isolate and purify baicalin metabolites from rat bile, and to study its effect on the proliferation of liver cancer HepG2 cells. METHODS: Totally of 6 SD rats were collected, anesthetized and then intubated with bile ducts. They were given baicalin (168 mg/kg) intragastrically after the rats were awake as well as the bile sample 1 was collected during 24 h after intragastric administration. After processed, bile sample 1 was preliminarily analyzed by HPLC. Another 5 SD rats were anesthetized and intubated in the same way as above, and then given baicalin intragastrically (400 mg/kg). The bile sample 2 was collected during 48 h after intragastric administration. After processed, the bile sample 2 was isolated and purified by semi-preparative HPLC. The isolated metabolites were identified by using UV, IR, MS and NMR, as well as based on physical and chemical properties. MTT method combined with high content cell imaging analysis system was used to study the effect of the metabolites on the proliferation of HepG2 cells. RESULTS: Baicalin was mainly metabolized into metabolite 1 and metabolite 2 through bile. After isolation and purification, they were identified as oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide and baicalein 6-O-β-D-glucuronide. The results of MTT assay showed that the metabolite 2 had a significant inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells, and its IC₅₀ was 90

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81160413); 贵州省科技厅项目(No.黔科合转字[2015]5213号); 贵州省普通高等学校工程研究中心课题项目(No.黔教合KY字[2015]338)

* 硕士研究生。研究方向: 新药研发及体内药物分析。E-mail: 2726719792@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 新药研发及体内药物分析。E-mail: gaoxl@gmc.edu.cn

µg/mL; the results of high content cell imaging analysis showed that at a certain concentration metabolite 2 may inhibit proliferation by changing the mitochondrial distribution and membrane permeability of HepG2 cells (studies on the pharmacological activities of metabolism 1 had been reported, it was skipped in this study). CONCLUSIONS: In this study, two baicalin bile metabolites were successfully isolated and identified, of which baicalein 6-*O*-β-*D*-glucuronide has a significant inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells.

KEYWORDS Baicalin; Metabolite; Oroxylin A-7-*O*-β-*D*-glucuronide; Baicalein 6-*O*-β-*D*-glucuronide; Isolation and purification; High content cell imaging analysis; Liver cancer HepG2 cells

黄芩是唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 味苦、性寒, 归肺、心、肝、胆、大肠经, 在我国的应用已有上千年的历史, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效^[1]。黄芩中主要含有黄酮及其苷类、萜类化合物和挥发油等成分^[2]。其中, 属于黄酮类化合物的黄芩苷作为黄芩最主要的有效成分, 在黄芩中的含量为 9%~14%^[3]。近年来, 随着对黄芩苷的深入研究, 发现其具有保肝、利胆、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗糖尿病、抗病毒和抗氧化等药理作用^[4-8]。

已有研究表明, 黄芩苷进入大鼠体内后, 先在肠道菌群分泌的 β-葡萄糖醛酸苷酶 (GUS) 作用下水解为其苷元黄芩素, 然后在肝部位经尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 作用转化成黄芩苷及其他代谢物后主要经胆汁排泄^[9]。另有研究发现, 黄芩苷可抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖, 具有浓度和时间的依赖性, 并可诱导 HepG2 细胞的凋亡^[10-12]。但黄芩苷经肝代谢产生的代谢物对肝是否具有毒副作用尚不清楚。因此, 本研究首先使用高效液相色谱法初步确定了黄芩苷在胆汁中的主要代谢物, 然后利用半制备型高效液相色谱法分离纯化主要代谢物, 并鉴定其结构; 采用 MTT 法及高内涵细胞成像分析法分析代谢物对 HepG2 细胞增殖的影响, 以期为黄芩苷及其代谢物后续研究提供试验基础。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱-TSQ、Quantum 型三重四极杆串联质谱 (MS) 仪 (美国 Finnigan 公司); UV 2700 型紫外可见分光光度计 (日本岛津公司); FT-IR 型红外光谱 (IR) 仪 (美国赛默飞公司); JE-OL-ECS-400MHz 型核磁共振 (NMR) 波谱仪 (日本电子株式会社); 1100 型半制备型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); N-1300S 型旋转蒸发器 (长春乐璞科技有限公司); CKX53 型倒置显微镜 (奥林巴斯中国有限公司); MCO-18AC 型二氧化碳培养箱 (日本松下公司); Allegra BHR 型超高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); VI-BRAX VXR basic 型自动漩涡振荡仪 (德国 IKA 公司); D101 型氮吹仪 (杭州蓝焰科技有限公司); 2XZ-1 型旋片式真空泵 (浙江黄岩黎明实业有限公司); AB104-N Mettler 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); 800TS 型酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); BBS-V800 型超净

工作台 (苏州净化设备总厂); Operetta 型高内涵细胞成像分析系统 (美国 Perkin Elmer 有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷对照品 (陕西昊辰生物科技有限公司, 批号: HQ190916, 纯度: ≥98%); 聚乙二醇 400 (PEG400, 广东西陇化工有限公司, 批号: 141025); 5-氟尿嘧啶 (5-FU, 美国 Sigma 公司, 批号: 0598); 胎牛血清 (批号: 1809249)、DMEM 培养基 (批号: 8119220)、胰蛋白酶消化液 (批号: 25200-056)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号: 821D031)、青霉素-链霉素溶液 (批号: 20181222)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号: 20181217)、MTT (批号: 1015D059) 均购自北京索莱宝科技有限公司; Bobo-3 膜通透性染料 (批号: QC217869)、DAPI 核染料 (批号: QC217870)、线粒体绿色荧光探针 (批号: QC217868) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 乙腈、甲醇为色谱纯, 乙酸乙酯为分析纯, 水为纯净水。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 (300 ± 20) g, 购自贵州医科大学实验动物中心, 动物使用许可证号: SYXK (黔) 2018-0001。大鼠严格按照实验动物护理和使用指南饲养, 将大鼠饲养在室温 (22 ± 2) °C 和湿度 (55 ± 5)% 的环境中, 光照 12 h 循环, 自由饮水。本实验所涉及动物的相关操作均在贵州医科大学实验动物伦理委员会的批准下进行, 并严格遵循相关准则。

1.4 细胞

肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库, 在第 5 次传代后用于后续试验。

2 方法与结果

2.1 大鼠胆汁中黄芩苷代谢物的初步分析

2.1.1 色谱条件 参考本课题组前期研究方法^[13]进行试验, 色谱柱为 Diamosil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 µm); 流动相为 0.2% 磷酸水溶液-甲醇-乙腈溶液 (60:22:18, V/V/V); 流速为 1 mL/min; 柱温为 40 °C; 检测波长为 275 nm; 进样量为 20 µL。

2.1.2 黄芩苷对照品溶液的制备 精密称取适量的黄芩苷对照品, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 即得质量浓度为 10 mg/mL 的黄芩苷对照品溶液, 于 4 °C 下保存, 备用。

2.1.3 大鼠胆汁样品的处理 取 6 只 SD 大鼠, 经水合氯

醛麻醉大鼠,行胆管插管^[4]。待大鼠清醒后,灌胃给予黄芩苷溶液[168 mg/kg,根据黄芩苷在茵栀黄软胶囊(主要活性成分为黄芩苷)中的用量换算而得]。持续收集大鼠24 h的胆汁,作为胆汁样品1,备用。取100 μ L大鼠胆汁样品1于5 mL的离心管中,加入0.5 mol/L盐酸溶液50 μ L,涡旋混合30 s,加入乙酸乙酯2 mL,振荡10 min进行萃取,在4 $^{\circ}$ C下以4 000 r/min离心10 min后,取上清液于40 $^{\circ}$ C下氮气吹干,加甲醇100 μ L复溶,再在4 $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心10 min后,取上清液,备用。

2.1.4 黄芩苷胆汁代谢物初步分析 取大鼠空白胆汁、大鼠空白胆汁+黄芩苷对照品、大鼠灌胃给药后的胆汁各适量,按“2.1.3”项下方法处理后,再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。结果,黄芩苷经过胆汁代谢后,除原型外,主要产生2个代谢物(分别为代谢物1和代谢物2),其中黄芩苷、代谢物1与代谢物2的保留时间分别为8.0、11.2、13.4 min,色谱图详见图1。

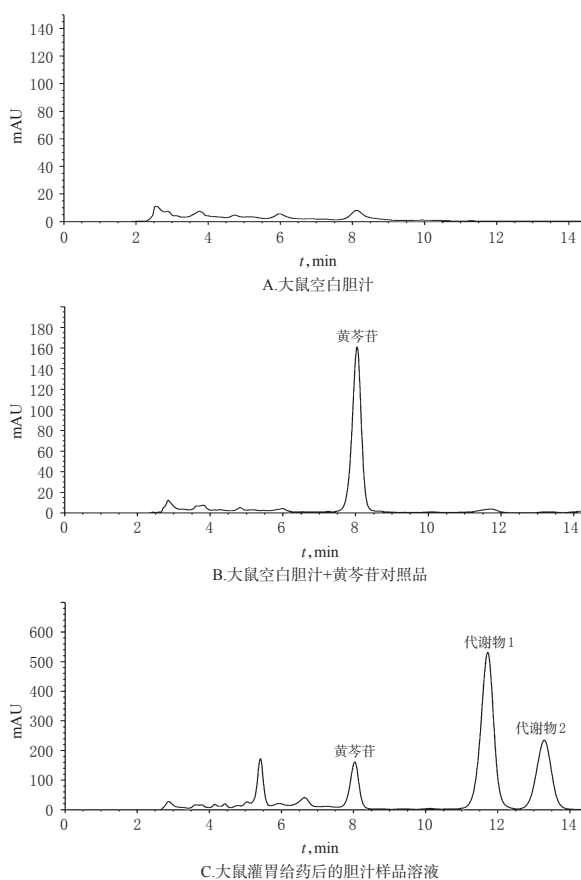


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 大鼠胆汁中黄芩苷代谢物的分离纯化及鉴定

本研究在前期试验基础上建立半制备型高效液相色谱法进行黄芩苷代谢物的分离纯化。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm \times 9.4 mm, 5 μ m)半制备型高效液相色谱柱;流

动相为0.03%三氟乙酸水溶液-甲醇-乙腈溶液(66:21:13, V/V/V);流速为3 mL/min;柱温为40 $^{\circ}$ C;检测波长为275 nm;进样量为40 μ L。

2.2.2 黄芩苷代谢物的分离纯化 取5只大鼠,经水合氯醛麻醉后,同“2.1.3”项下方法麻醉、插管,待大鼠清醒后,灌胃给予黄芩苷溶液(400 mg/kg,根据前期实验中大鼠的最大耐受剂量换算而得,为增加胆汁中代谢物含量所以增加了灌胃剂量)。持续收集大鼠48 h的胆汁,作为胆汁样品2,于-20 $^{\circ}$ C储存,备用。每次取100 μ L胆汁样品2,加入0.5 mol/L盐酸50 μ L涡旋混合40 s,再加2 mL乙酸乙酯,振荡萃取10 min后,在4 $^{\circ}$ C下以4 000 r/min离心10 min,取上清液于氮气下吹干。重复上述操作,将所有胆汁样品富集,最后得到粗品78.59 mg。将富集得到的粗品用一定量甲醇稀释成质量浓度为19.64 mg/mL的溶液,再以12 000 r/min离心10 min后,取上清液40 μ L,按“2.2.1”项下色谱条件进行分离纯化。试验过程中一直将收集馏分的容器置于冰水浴中保持化合物的稳定,再将收集的馏分混合,使用旋转蒸发器将溶剂挥干,得到代谢物1(保留时间为37.5 min)8.51 mg、代谢物2(保留时间为44 min)11.52 mg。半制备型高效液相色谱图详见图2。

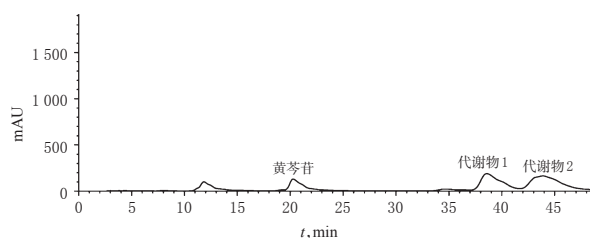


图2 半制备型高效液相色谱图

Fig 2 Semi-preparative HPLC chromatograms

2.2.3 黄芩苷代谢物的结构鉴定 采用紫外光谱(UV)、IR、MS、NMR技术并结合其理化性质对黄芩苷代谢物1、2进行鉴定,结果如下。

代谢物1:淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇和DMSO。ESI-MS m/z : 461.08[M+H]⁺, 459.31[M-H]⁻, 分子式为C₂₂H₂₀O₁₁。熔点:192~194 $^{\circ}$ C。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(log ϵ): 245 sh(4.02), 272(4.41), 310(4.17); 没有观察到代谢物1的NaOAc紫外光谱变化; $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}+\text{AlCl}_3}$ nm(log ϵ): 251 sh(4.01), 283(4.39), 331(4.23)。IR(KBr): 3 455 cm⁻¹(OH), 1 735 cm⁻¹(COOH), 1 657 cm⁻¹(共轭C=O), 1 613 cm⁻¹(芳香C=C)。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ : 3.77(3H, s, C6-OCH₃), 5.35(1H, d, $J=7.0$), 7.07(1H, s, C3-H), 7.12(1H, s, C8-H), 7.59(3H, m, C3', 4', 5' - H), 8.01(2H, m, C2', 6' - H), 12.82(1H, s, C5-OH)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ : 163.6(C-2), 104.8(C-3), 182.3(C-4), 152.6(C-5), 132.6

(C-6), 156.3 (C-7), 94.2 (C-8), 152.4 (C-9), 105.9 (C-10), 130.5 (C-1'), 126.2 (C-2' 6'), 129.2 (C-3' 5'), 131.9 (C-4'), 66.2 (OCH₃), 99.3 (C-1'''), 72.9 (C-2'''), 75.8 (C-3'''), 71.2 (C-4'''), 75.3 (C-5'''), 170.0 (C-6'''). 上述数据与文献方法^[15]报道一致,故推测代谢物1为千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,其结构式详见图3A。

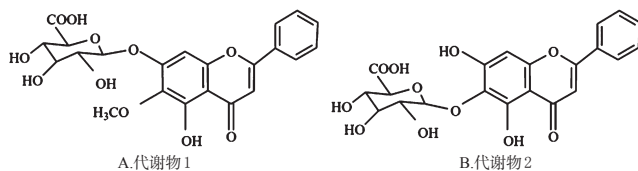


图3 代谢物1和2的结构式

Fig 3 Structural formula of metabolites 1 and 2

代谢物2:淡黄色无定形粉末,易溶于甲醇和DMSO。ESI-MS m/z : 447.09[M+H]⁺, 445.11[M-H]⁻, 分子式为C₂₁H₁₈O₁₁。熔点:195~197℃。UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(log ϵ): 271(4.33), 318(4.01); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH+NaOAc}}$ nm(log ϵ): 267(4.35), 362(3.99); $\lambda_{\max}^{\text{MeOH+AlCl}_3}$ nm(log ϵ): 254(3.98), 282(4.31), 334(4.36)。IR(KBr): 3 370 cm⁻¹(OH), 1 739 cm⁻¹(COOH), 1 657 cm⁻¹(共轭C=O), 1 626 cm⁻¹(芳香C=C)。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.01(1H, d, $J=7.5$), 6.67(1H, s, C8-H), 6.97(1H, s, C3-H), 7.61(3H, m, C3', 4', 5'-H), 8.05(2H, m, C2', 6'-H), 10.62(1H, s, C7-OH), 13.03(1H, s, C5-OH)。¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ : 163.3(C-2), 104.2(C-3), 182.2(C-4), 153.0(C-5), 128.0(C-6), 157.5(C-7), 94.4(C-8), 152.5(C-9), 104.5(C-10), 130.7(C-1'), 126.4(C-2' 6'), 129.1(C-3' 5'), 132.0(C-4'), 103.6(C-1'''), 73.5(C-2'''), 76.0(C-3'''), 71.2(C-4'''), 75.6(C-5'''), 170.1(C-6''')。上述数据与文献方法^[15]报道一致,故推测代谢物2为黄芩素 6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷,其结构式详见图3B。

2.3 代谢物2对HepG2细胞增殖的影响考察

已有研究证实代谢物1(千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷)与黄芩苷具有相似的药理活性^[16],但笔者未见国内外有关代谢物2(黄芩素 6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷)的药理活性报道。基于此,笔者使用MTT法和高内涵细胞成像分析法考察了代谢物2对HepG2细胞增殖的影响。

2.3.1 MTT法检测代谢物2对HepG2细胞增殖的影响 参考相关文献方法^[17],取对数生长期的HepG2细胞,以 5×10^3 个/200 μL 的密度接种于96孔板,将细胞分为代谢物2低、中、高质量浓度组(45、90、180 $\mu\text{g/mL}$)和空白对照组(等体积不含药的DMEM培养基)、5-FU组(阳性对照,30 $\mu\text{g/mL}$),每组设5个复孔,常规培养24 h后,再换用无血清的DMEM培养基继续培养24 h使细胞同步化;分别加入对应浓度的药物孵育24 h;吸弃培

养基,每孔加入无血清的DMEM培养基100 μL 和5 mg/mL的MTT溶液10 μL ,继续培养4 h,加入150 μL DMSO低速振荡10 min溶解结晶。采用酶标仪在490 nm波长处测定吸光度(OD)值,重复3次,计算HepG2细胞的增殖抑制率:增殖抑制率=[1-(OD_{试验组}-OD_{空白对照组})/(OD_{阳性对照组}-OD_{空白对照组})] $\times 100\%$;并根据概率法^[18]计算代谢物2和5-FU的半数抑制浓度(IC₅₀)。各组HepG2细胞增殖抑制率测定结果详见表1。

表1 各组HepG2细胞增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 1 Determination result of proliferation inhibitory rate of HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	给药浓度, $\mu\text{g/mL}$	增殖抑制率, %
空白对照组	0	0
5-FU组	30	90.886 \pm 1.003**
代谢物2低质量浓度组	45	23.154 \pm 4.561*
代谢物2中质量浓度组	90	50.226 \pm 1.142**
代谢物2高质量浓度组	180	62.049 \pm 0.566**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

由表1可知,与空白对照组比较,5-FU组和代谢物2低、中、高质量浓度组细胞增殖抑制率均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明代谢物2对HepG2细胞具有显著的增殖抑制作用。根据概率法计算得5-FU、代谢物2对HepG2细胞的IC₅₀分别为30、90 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 高内涵细胞成像分析法分析代谢物2对HepG2细胞增殖的影响 取对数生长期的HepG2细胞,以 1×10^4 个/mL的密度接种于多聚赖氨酸包被的96孔板,将细胞分为空白对照组和代谢物2低、中、高质量浓度组(45、90、180 $\mu\text{g/mL}$),每组设3个复孔,常规培养24 h后,分别加入对应浓度的含药培养基培养24 h。于培养结束前0.5 h,取出96孔板,轻轻移去上清液,每个孔加入60 μL 活细胞染液(包括Bobo-3膜通透性染料、DAPI核染料和线粒体绿色荧光探针),继续培养0.5 h进行染色;染色后吸弃染液,加入100 $\mu\text{L/孔}$ 的4%多聚甲醛固定液,室温放置20 min进行固定;再吸弃固定液,使用清洗液100 $\mu\text{L/孔}$ 清洗后吸弃,加入100 $\mu\text{L/孔}$ 的透化液,室温避光孵化20 min进行透化;然后吸弃透化液,用清洗液清洗3次后,加入100 $\mu\text{L/孔}$ 的封闭液,室温培养20 min;吸弃封闭液,用清洗液清洗3次后,加入高内涵细胞成像分析系统。设置系统激发/光发射波长为358/461 nm检测DAPI染色的核通道,570/603 nm检测膜通透性,490/516 nm检测线粒体分布,观察代谢物2对HepG2细胞数量的影响,并记录细胞核面积变化、线粒体分布[用荧光强度值(F)表示,数值越大表示线粒体分布越广]和Bobo-3膜通透性(用 F 值表示,数值越大表示膜通透性越

强)^[17]的变化。各组细胞高内涵细胞成像结果详见图4,高内涵分析参数结果详见表2。

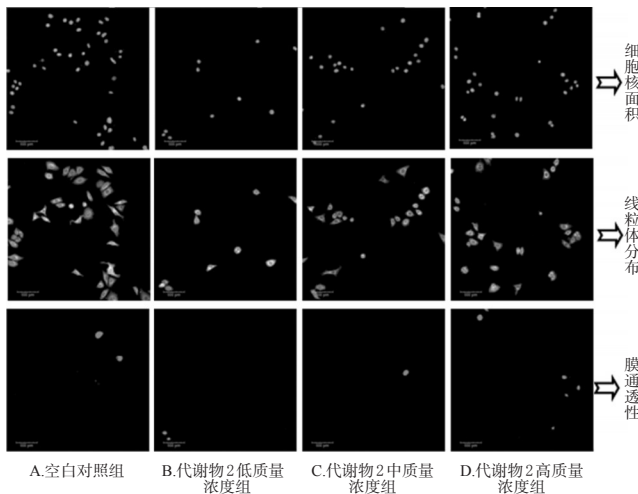


图4 各组 HepG2 细胞高内涵细胞成像结果($\times 200$)
Fig 4 Imaging results of high content cell in HepG2 cells in each group($\times 200$)

表2 各组 HepG2 细胞高内涵分析参数结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 The parameters of high content analysis for HepG2 cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度, $\mu\text{g/mL}$	高内涵分析参数			
		细胞数量(个/视野)	细胞核面积, μm^2	线粒体分布 F 值	膜通透性 F 值
空白对照组	0	300.00 \pm 60.00	177.53 \pm 10.30	4 878.32 \pm 545.82	6.20 \pm 1.12
代谢物2低质量浓度组	45	186.67 \pm 9.61*	172.13 \pm 3.50	6 035.39 \pm 407.41**	13.56 \pm 0.96**
代谢物2中质量浓度组	90	134.00 \pm 3.60**	163.15 \pm 11.10	4 546.71 \pm 559.78	3.19 \pm 0.94*
代谢物2高质量浓度组	180	105.67 \pm 9.01**	144.18 \pm 13.11*	2 609.36 \pm 166.45*	6.80 \pm 0.70

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由图4及表2可知,空白对照组细胞核形态完整,细胞膜通透性低,线粒体分布正常,未观察到明显的凋亡特征。与空白对照组比较,代谢物2低、中、高质量浓度组细胞数量显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);代谢物2高质量浓度组细胞核面积显著降低($P<0.05$);代谢物2低质量浓度组细胞的线粒体分布、膜通透性均显著增加($P<0.01$),而高质量浓度组细胞的线粒体分布显著减少($P<0.05$),中浓度组细胞膜通透性显著降低($P<0.05$)。这提示在一定浓度下,代谢物2可能通过改变细胞线粒体分布及膜通透性影响细胞增殖。

3 讨论

本研究基于半制备型高效液相色谱法从大鼠胆汁中分离纯化出黄芩苷的代谢物1和2,经过UV、IR、MS和NMR技术与其理化性质分别鉴定为千层纸素A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷和黄芩素6-O- β -D-葡萄糖醛酸苷;同时,研究了代谢物2对HepG2细胞增殖的影响,这为黄芩苷代谢物分离纯化提供了新的方法,并为其定性

定量研究提供了物质基础。

目前,关于黄芩苷等黄酮类药物的研究越来越多地关注其活性代谢物,黄芩苷的活性代谢物也是其发挥体内疗效的重要物质基础。本研究首次使用高内涵细胞成像分析系统,从细胞数量、细胞核面积、线粒体分布及细胞膜通透性等方面研究了代谢物2对HepG2肝癌细胞增殖的抑制作用,结果表明,在一定浓度下,代谢物2可能主要通过改变肝癌细胞的线粒体分布及膜通透性来抑制HepG2肝癌细胞的增殖。

综上所述,本研究成功分离并鉴定出2个黄芩苷在大鼠胆汁中的代谢物,其中黄芩素6-O- β -D-葡萄糖醛酸苷对HepG2细胞具有显著的增殖抑制作用,但其作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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,2015:301.
- [2] 杨萍,高维利.中药配方颗粒应用特点[J].山西中医药,2011,27(9):50-51.
- [3] 王本祥.现代中药药理学[M].天津:天津科技出版社,1997:301,299.
- [4] LAI WW, JIA JT, YAN B, et al. Baicalin hydrate inhibits cancer progression in nasopharyngeal carcinoma by affecting genome instability and splicing[J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1):901-914.
- [5] KIM KH, PARK YD, PARK H, et al. Synthesis and biological evaluation of a novel baicalein glycoside as an anti-inflammatory agent[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 744(11):147-156.
- [6] TSANG WK, CHAU KY, YANG HP. Baicalein exhibits inhibitory effect on the energy-dependent efflux pump activity in non-albicans *Candida* fungi[J]. *J Chemotherapy*, 2015, 27(1):61-62.
- [7] GAO L, FANG JS, BAI XY, et al. In silico target fishing for the potential targets and molecular mechanisms of baicalein as an antiparkinsonian agent: discovery of the protective effects on NMDA receptor-mediated neurotoxicity[J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81(6):675-687.
- [8] 丁美林,董宏利,江国荣,等.黄芩-黄连配伍治疗2型糖尿病的研究概述[J].中国药房,2019,30(17):2440-2444.
- [9] 邢杰.黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [10] 习浩,刘荣静,麦飘予,等.黄芩苷对人肝癌细胞HepG2的抑瘤作用[J].广东医学,2013,34(10):1493-1495.
- [11] 周曙,蔡涛,覃兴贵,等. JNK 信号转导通路 在黄芩苷诱导肝癌细胞凋亡中的作用[J].解放军医药杂志,2015,27(4):20-23.
- [12] 梁慧敏,时小燕,和振坤,等.黄芩苷诱导人肝癌 HepG-2

蒲黄不同药用部位的质量比较^Δ

严 华*,魏 锋#,马双成(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

中图分类号 R931.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0805-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.08

摘要 目的:比较草蒲黄和蒲黄花粉的质量差异,为蒲黄质量标准的完善提供科学依据。方法:收集15批次草蒲黄,按照2015年版《中国药典》中蒲黄相关方法筛分出筛下蒲黄花粉和筛上杂质(花丝、花药),通过杂质百分比、性状、显微镜鉴别、薄层色谱鉴别确证草蒲黄和蒲黄花粉、花丝、花药的特征和成分,采用高效液相色谱法测定草蒲黄、蒲黄花粉、筛上杂质(花丝、花药)中异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、香蒲新苷的含量。结果:草蒲黄为蒲黄花粉、花药及花丝的混合物,呈棕黄色絮状;蒲黄花粉呈黄色粉末,手感细腻,气微,味淡,细胞表面略呈条状;花丝和花药呈丝状、短线状,手感粗涩,表面观细胞呈长条形。草蒲黄、蒲黄花粉及蒲黄杂质的薄层色谱鉴别结果具有一致的色谱斑点;含量测定结果显示,异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、香蒲新苷及其二者总含量在蒲黄花粉中均最高(分别为0.42%、0.24%、0.64%),草蒲黄其次(0.22%、0.17%、0.39%),筛上杂质中含量最低(0.19%、0.14%、0.33%);草蒲黄与筛上杂质中异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷和香蒲新苷的总含量均未达到2015年版《中国药典》规定含量限度(不得少于0.50%)。结论:蒲黄的药用成分主要存在于花粉中。建议草蒲黄应作为获取花粉的原料,而不宜直接药用。

关键词 蒲黄;草蒲黄;药用部位;异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷;香蒲新苷;质量标准

Comparison of Medicinal Part Quality of *Typha angustifolia*

YAN Hua, WEI Feng, MA Shuangcheng(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the quality between *Stamen typhae* and pollen of *T. angustifolia*, and provide scientific evidence for the improvement of quality standard of *T. angustifolia*. METHODS: Fifteen batches of *S. typhae* were collected. Pollen minus sieve, impurity plus sieve (filament and anther) were sift out from *S. typhae* according to the identification method of *T. angustifolia* in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition). The characteristics and components of *S. typhae* and pollen, filament and anther of *T. angustifolia* were confirmed by impurity, character examination and microscope, TLC. The contents of isorhamnetin-3-*O*-neohesperidoside and typhaneoside in *S. typhae* and pollen, impurities plus sieve (filament and anther) of *T. angustifolia* were determined by HPLC. RESULTS: *S. typhae* was a mixture of pollen, anther and filament of *T. angustifolia*, in the form of brownish yellow flocculent. The pollen of *S. typhae* was yellow powder with delicate hand feel, slight smell and light taste; the surface of cells was slightly striped. The filaments and anthers were filiform and short-term, rough and astringent, and

- 细胞凋亡作用观察[J].实用肝脏病杂志,2012,15(4):343-345.
- [13] 孟小夏,舒阳,张敏,等.聚乙二醇400对黄芩苷在大鼠体内药动学的影响[J].华西药学杂志,2017,32(2):132-134.
- [14] AKAO T, SATO K, HE JX, et al. Baicalein 6-*O*- β -D-glucopyranuronoside is a main metabolite in the plasma after oral administration of baicalin, a flavone glucuronide of *Scutellariae Radix*, to rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(5):748-753.
- [15] ABE KI, INOUE O, YUMIOKA E. Biliary excretion of metabolites of baicalin and baicalein in rats[J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(1):208-211.
- [16] CAI Y, LI S, LI T, et al. Oral pharmacokinetics of baicalin, wogonoside, oxoxylin A-7-*O*- β -D-glucuronide and their aglycones from an aqueous extract of *Scutellariae Radix* in the rat[J]. *J Chromatogr B*, 2016.DOI: org/10.1016/j.jchromb.2015.11.049.
- [17] 董晶晶.黄芩配方颗粒质量及调控HepG2细胞增殖与凋亡的机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2016.
- [18] SIKANDER M, HAFEEZ BB, MALIK S, et al. Cucurbitacin D exhibits potent anti-cancer activity in cervical cancer [J]. *Sci Rep*, 2016.DOI: 10.1038/srep36594.

Δ 基金项目:国家药典委员会《中国药典》药品标准提高课题

* 副主任药师。研究方向:中药质量控制、质量标准。电话:010-67095432。E-mail:yanhua@nifdc.org.cn

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药质量控制。电话:010-67095432。E-mail:weifeng@nifdc.org.cn

(收稿日期:2019-10-17 修回日期:2020-01-06)

(编辑:唐晓莲)