

基于黄酮类成分含量构成特征和体外抗病毒活性的不同产地黄芩的质-效评价研究[△]

李 化*,张明晓,白羽琦,杨 滨[#](中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)10-1166-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.10.03

摘要 目的:评价黄芩道地药材与非道地药材中主要黄酮类成分含量构成特征及其抗病毒活性,以探讨黄芩药材的质-效关系及药效物质基础。方法:制备8批不同产地黄芩(S1~S8)的水提取物冻干粉,采用超高效液相色谱法测定水提取物中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等4种黄酮类成分的含量并计算其含量构成比。按不同产地黄芩的黄酮类成分含量构成比,制备上述4种成分混合物作为对应的黄酮类成分模拟样品(E1~E8)。以利巴韦林为阳性对照,采用MTT法和细胞病变程度法,考察8批黄芩水提取物样品及其对应的模拟样品对人喉癌细胞Hep-2的半数有毒浓度(TD₅₀)和对呼吸道合胞病毒(RSV)的半数抑制浓度(IC₅₀),并计算治疗指数(TI)。采用SPSS 17.0软件对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量与其抗RSV活性(IC₅₀值)进行Pearson相关性分析。结果:样品S4(产地为河北承德)的黄芩苷、汉黄芩苷含量最高,样品S6(产地为内蒙古-2)的黄芩素、汉黄芩素含量最高;上述4种成分含量最低的分别为样品S6、S6、S7(产地为北京)、S4。样品S4中黄酮苷类成分含量较高,相应的苷元类成分含量较低,其黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量构成比为1:0.224:0.111:0.013;样品S6中黄酮苷类成分含量较低,相应的苷元类成分含量较高,上述4种成分的含量构成比为1:0.241:0.713:0.106。不同产地黄芩水提取物对Hep-2细胞的TC₅₀均高于50 μg/mL,对RSV的IC₅₀为11.11~51.74 μg/mL, TI为1.86~5.20;其对应的黄酮类成分模拟样品的TC₅₀为23.11~52.23 μg/mL,对RSV的IC₅₀为4.87~14.61 μg/mL, TI为1.85~4.75。道地产区(河北承德)黄芩(S4)的水提取物及其对应模拟样品(E4)的抗RSV作用最强。相关性分析显示,4种黄酮类成分的含量与其抗病毒活性的相关系数均小于0.5,两者无显著相关性。结论:当黄芩中4种主要黄酮类成分的含量构成比为1:0.224:0.111:0.013时,其对RSV的抑制作用较强。道地产区黄芩样品具有较优的黄酮类成分构成特征,该特征可能是道地药材发挥最佳抗病毒疗效的重要物质基础。

关键词 黄芩;道地药材;黄酮类成分;含量测定;抗病毒活性;质-效关系

Study on Quality-efficiency Evaluation of *Scutellaria baicalensis* from Different Origins Based on Content Constituent Characteristics of Flavonoids and *in vitro* Antiviral Activity

LI Hua, ZHANG Mingxiao, BAI Yuqi, YANG Bin (Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate content constituent characteristics and antiviral activity of main flavonoids in genuine and non-genuine *Scutellaria baicalensis*, and to investigate quality-efficiency relationship and effective substance. METHODS: Totally 8 batches of *S. baicalensis* from different origins (S1-S8) were collected to prepare its water extract lyophilized powder. UPLC method was used to determine the contents of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin, and calculate their content constituent ratio. According to the content constituent ratio of flavonoids in *S. baicalensis* from different origins, the mixture of the above four components was prepared as the corresponding simulated sample of flavonoids (E1-E8). Using ribavirin as positive control, MTT assay and CPE method were used to investigate half toxic concentration (TD₅₀) of the water extract from 8 batches of *S. baicalensis* and their corresponding simulated samples to human laryngeal carcinoma cell Hep-2 and their half inhibition concentration (IC₅₀) to respiratory syncytial virus (RSV); treatment indexes (TI) were calculated. Pearson correlation analysis for the content of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin with their anti-RSV activity (IC₅₀) was performed by SPSS 17.0 software. RESULTS: The contents of baicalin and wogonoside in sample S4 (from Hebei Chengde) were the highest, and the contents of baicalein and wogonin in sample S6 (from Inner Mongolia-2) were the highest. The contents of above 4 components were the lowest in sample S6, S6, S7 (from Beijing), S4. The contents of flavonoid glycosides in sample S4 were relatively higher, while those of corresponding glycosides were relatively lower; the content constituent ratio of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin was 1:0.224:0.111:0.013. The contents of flavonoid glycosides in sample S6 were relatively lower, while those of glycosides were relatively higher; the content constituent ratio of above 4 components

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573534)

* 副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药质量评价及其药效物质基础。电话:010-64014411-2848。E-mail:xiariyuji@163.com

[#] 通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中药质量评价及其药效物质基础。电话:010-64014411-2848。E-mail:ybinmm@126.com

was 1:0.241:0.713:0.106. TC_{50} of *S. baicalensis* water extracts from different origins to Hep-2 cells was all higher than 50 $\mu\text{g/mL}$, IC_{50} to RSV was 11.11-51.74 $\mu\text{g/mL}$; TI was 1.86-5.20. TC_{50} of corresponding simulated samples of flavonoids was 23.11-52.23 $\mu\text{g/mL}$, while IC_{50} to RSV was 4.87-14.61 $\mu\text{g/mL}$; TI was 1.85-4.75. The anti-RSV effects of water extract of S4 from genuine origins (Hebei Chengde) and its corresponding simulated sample E4 were the strongest. Correlation analysis showed that the correlation coefficient between the contents of 4 flavonoids and antiviral activity was less than 0.5, and there was no significant correlation between them. CONCLUSIONS: When the content constituent ratio of 4 main flavonoids in *S. baicalensis* was 1:0.224:0.111:0.013, it has a strong inhibition effect on RSV. *S. baicalensis* from genuine origins has better constituent characteristics of flavonoids, which may be the important material basis for the best antiviral effect of genuine medicinal material.

KEYWORDS *Scutellaria baicalensis*; Genuine medicinal material; Flavonoids; Content determination; Antiviral activity; Quality-efficiency relationship

黄芩是唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根,其入药始见于《神农本草经》。黄芩性寒、味苦,归肺、胆、脾、大肠、小肠经,具有清热燥湿、泻火解毒等作用^[1-2]。在我国,其主要分布于北部地区,河北地区的“热河黄芩”为道地药材,品质最佳^[3]。黄芩中的主要活性成分是黄酮类成分,其中以黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素这4种成分的含量较高^[4-6]。现代研究表明,黄芩药材提取物及分离所得的黄酮类单体成分均具有抗病毒活性^[7-11],且临床疗效确切^[12-14]。已有研究发现,不同产地黄芩提取物的抗病毒作用差异显著,道地黄芩的抗病毒作用明显优于非道地药材^[15-16]。但尚未有研究探索造成不同产地黄芩抗病毒药效差异的物质基础以及道地药材质优的化学本质特征。为此,本研究通过建立体外感染呼吸道合胞病毒(RSV)的细胞模型,考察不同产地黄芩水提物及其黄酮类成分模拟样品的体外抗病毒活性,同时结合黄芩中4种主要黄酮类成分的含量及其构成特征,探讨不同比例构成的黄酮类成分对黄芩抗RSV活性的影响,为初步阐明黄芩抗病毒作用的物质基础提供思路,为黄芩药材的质-效评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY H-Class UPLC™ 型超高效液相色谱(UPLC)仪(美国 Waters 公司);2004MBP6 型半微量电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-100DE 型控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FW-80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);ALPHR 2-4 LD Plus 型冷冻干燥机(德国 Christ 公司);NU-425-400S 型生物安全柜(美国 Nuair 公司);EXL-808 型酶联免疫检测仪(美国 BioTek 仪器公司);MCO-15AC 型 CO_2 培养箱(日本 Sanyo 公司);CKX-41 型倒置式生物显微镜(日本 Olympus 公司);Milli-Q 型超纯水制备仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷对照品(批号:15062716,纯度: $>98\%$)、汉黄芩苷对照品(批号:15080512,纯度: $>98\%$)、黄芩素对照品(批号:15031608,纯度: $>98\%$)、汉黄芩素对照

品(批号:15080513,纯度: $>98\%$)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;利巴韦林原料药(新乡制药股份有限公司,批号:20081227,纯度:99%);MTT 试剂(美国 Sigma 公司);F-12K Nutrient Mixture(1 \times)培养基、胎牛血清(FBS)、青链霉素双抗混合液(美国 Gibco 公司);乙腈、甲酸(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)均为色谱纯,二甲基砒(DMSO)等其余试剂(北京化工厂)均为分析纯,水为自制超纯水。

8批黄芩药材均于2014年采集或收集,产地分别为内蒙古-1、陕西、山西、河北承德(黄芩道地产区)、甘肃、内蒙古-2、北京、山东等8个地区,依次编号为S1~S8(注:其中2批药材均购自内蒙古,但并非同时、同地购进,故将产地分为内蒙古-1和内蒙古-2以示区别),每批药材干质量约200 g。上述药材经中国中医科学院中药研究所李化副研究员鉴定为唇形科植物黄芩(*S. baicalensis* Georgi)的干燥根。药材粉碎后,过40目筛,密闭包装后保存于防潮柜中,备用。

1.3 细胞和病毒

人喉癌细胞 Hep-2 由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供;RSV 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)。

2 方法与结果

2.1 不同产地黄芩中黄酮类成分的含量测定

采用本课题组前期研究建立的 UPLC 法^[6]测定黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的含量。

2.1.1 黄芩水提物的制备 参考文献方法^[17]并略作调整,取黄芩药材粉末 25 g,精密称定,依次加入 10、8、8 倍量水(mL/g ,下同),煎煮 3 次,每次 1 h;滤过,合并 3 次滤液,经预冻后再冷冻干燥,得水提物冻干粉(得率为 35%~45%),置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。

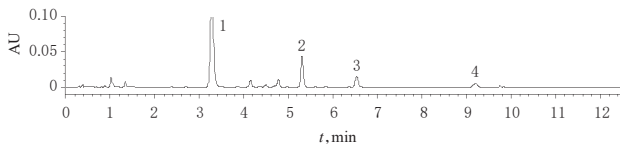
2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品各适量,加 20% 乙腈水溶液溶解制成质量浓度分别为 64.8、31.0、28.0、2.72 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下黄芩水提物冻干粉 0.1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 100 mL,称定质量,超声(功率:200 W,频率:

40 kHz)提取1 h;放冷,称定质量,以70%乙醇补足减失质量;滤过,取续滤液,过0.2 μm微孔滤膜,即得。

2.1.4 色谱条件 色谱柱:Aquity BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 18% B; 0.5~2.0 min, 18% B→20% B; 2.0~6.0 min, 20% B→30% B; 6.0~8.0 min, 30% B; 8.0~10.0 min, 30% B→60% B; 10.0~12.0 min, 60% B);柱温:40 ℃;流速:0.4 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:1 μL。

2.1.5 不同产地黄芩中4种黄酮类成分的含量测定 取8批黄芩样品粉末,先后按“2.1.1”“2.1.3”项下方法制备水提物冻干粉及供试品溶液,另取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按“2.2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量。每批样品平行2份操作,取平均值并计算不同黄酮类成分的含量及其构成比。色谱图示例见图1(其余色谱图及方法学考察内容略,可参见前期研究^[5]),含量测定结果见表1。



注:1.黄芩苷;2.汉黄芩苷;3.黄芩素;4.汉黄芩素

Note: 1. baicalin; 2. wogonoside; 3. baicalein; 4. wogonin

图1 供试品溶液的超高效液相色谱图(编号:S7)

Fig 1 UPLC chromatogram of sample solution (No. S7)

表1 黄芩水提取物中黄酮类成分的含量及其构成比(n=2)

Tab 1 Content and its constituent ratio of flavonoids in water extract of *S. baicalensis* (n=2)

样品编号	黄酮类成分含量,mg/g				4种黄酮类成分的含量构成比*
	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	
S1	201.92	47.50	52.61	8.51	1:0.235:0.261:0.042
S2	165.76	38.71	75.44	10.64	1:0.234:0.455:0.064
S3	210.40	40.90	21.30	7.00	1:0.194:0.101:0.033
S4	244.46	54.88	27.23	3.12	1:0.224:0.111:0.013
S5	178.40	48.60	36.40	10.90	1:0.272:0.204:0.061
S6	131.87	31.76	94.01	14.04	1:0.241:0.713:0.106
S7	222.70	44.70	12.80	5.00	1:0.201:0.057:0.022
S8	210.60	45.10	29.40	7.80	1:0.214:0.140:0.037

注:*各黄酮类成分的含量构成比均以黄芩苷含量为基准值1进行计算

Note: * content constituent ratio of flavonoids were computed by baicalin content as the reference value 1

由表1可见,8批不同产地黄芩提取物中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量差异较大。其中,S4样品(产地:河北承德)中黄芩苷、汉黄芩苷含量最高,S6样品(产地:内蒙古-2)中黄芩素、汉黄芩素含量最高;S6样品(产地:内蒙古-2)中黄芩苷、汉黄芩苷含量最低,S7样品(产地:北京)中黄芩素含量最低,S4样品(产地:河北承

德)中汉黄芩素含量最低。从4种成分的含量构成特征来看,S4样品(产地:河北承德)中黄酮苷类成分含量较高,相应的苷元类成分含量较低,其黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量结构比为1:0.224:0.111:0.013;而S6样品(产地:内蒙古-2)中黄酮苷类成分含量较低,相应的苷元类成分含量较高,4种成分含量结构比为1:0.241:0.713:0.106。

2.2 黄芩水提取物和黄酮类成分模拟样品的细胞毒性和抗病毒活性评价

2.2.1 黄芩水提取物样品溶液的配制 取8批不同产地黄芩药材粉末,按“2.1.1”项下方法制备水提物冻干粉。取该冻干粉适量,精密称定,以DMSO配制成母液(临用新配);取该母液适量,用细胞培养液[含10% FBS+100 u/mL青链霉素双抗的F-12K Nutrient Mixture(1×)培养基,下同]稀释至不同浓度,备测。

2.2.2 黄酮类成分模拟样品溶液的配制 精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品各适量,按“2.2.5”项下测得的8批不同产地黄芩水提物冻干粉中上述4种黄酮类成分的含量构成比进行混合、研匀,得到8种代表不同产地黄芩中黄酮类成分组成特征的模拟样品(分别编号为E1~E8)。取该模拟样品粉末适量,精密称定,以DMSO配制成母液(临用新配);取该母液适量,用细胞培养液稀释至不同浓度,备测。

2.2.3 两种样品的细胞毒性评价 参照文献方法^[18]并略作调整后,采用MTT法考察两种样品对Hep-2细胞的毒性。取对数生长期的Hep-2细胞,分别按 5×10^3 个/孔接种于96孔板中,在37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下(以下培养条件相同)培养24 h后,分别加入“2.2.1”“2.2.2”项下不同质量浓度的黄芩水提取物样品(5、10、20、40、80、160、320、640 μg/mL,以水提物计)和黄酮类成分模拟样品(5、10、20、40、80、160、320、640 μg/mL,以混合对照品总量计)溶液100 μL,继续培养72 h。吸弃原培养液,每孔加入5 mg/mL MTT溶液10 μL,反应4 h后,加入DMSO 150 μL终止反应,采用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定每孔吸光度。本研究同时设置对照组和阳性对照组,其中对照组加入细胞但不加入药物,阳性对照组加入细胞和利巴韦林(2、4、8、16、32、64、128、256 μg/mL),同法处理并测定。各给药组剂量均参照文献^[18]和前期预试验结果设定。试验重复3次操作。采用Reed-Muench法^[18]计算各目标药物对Hep-2细胞的半数有毒浓度(TC₅₀)。不同产地黄芩水提取物及其对应黄酮类成分模拟样品的细胞毒性测定结果见表2、表3。

由表2、表3结果可知,不同产地黄芩水提取物对Hep-2细胞的TC₅₀均高于50 μg/mL,其对应的黄酮类成分模拟样品的TC₅₀为23.11~52.23 μg/mL。

2.2.4 两种样品的抗病毒活性评价 参照文献方法^[18-19]并略作调整后,采用细胞病变程度(CPE)法考察两种样品对RSV的抗毒性活性。取RSV,以维持液(按照文献方法^[18]配制)稀释至滴度为100倍半数组织培养感染剂

表2 不同产地黄芩水提物的细胞毒性和抗病毒活性测定结果($n=3$)

Tab 2 Cytotoxicity and antiviral activity of *S. baicalensis* water extract from different origins ($n=3$)

样品编号	TC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$	IC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$	TI
S1	100.04	19.24	5.20
S2	115.47	41.23	2.80
S3	96.15	51.74	1.86
S4	57.74	11.11	5.20
S5	101.02	33.33	3.03
S6	75.04	19.24	3.90
S7	100.89	25.87	3.90
S8	129.99	33.33	3.90
利巴韦林	85.90	2.47	34.78

表3 不同产地黄芩对应的黄酮类成分模拟样品的细胞毒性和抗病毒活性测定结果($n=3$)

Tab 3 Cytotoxicity and antiviral activity of corresponding simulated samples of flavonoids for *S. baicalensis* from different origins ($n=3$)

模拟样品编号	黄酮类成分的含量构成比	TC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$	IC ₅₀ , $\mu\text{g/mL}$	TI
E1	1:0.235:0.261:0.042	35.83	8.62	4.16
E2	1:0.234:0.455:0.064	52.23	14.61	3.57
E3	1:0.194:0.101:0.033	24.68	13.37	1.85
E4	1:0.224:0.111:0.013	23.11	4.87	4.75
E5	1:0.272:0.204:0.061	28.74	9.85	2.92
E6	1:0.241:0.713:0.106	33.22	8.76	3.79
E7	1:0.201:0.057:0.022	35.44	13.57	2.61
E8	1:0.214:0.140:0.037	34.68	10.29	3.37
利巴韦林		85.90	2.47	34.78

量(TCID₅₀)。取上述病毒稀释液 100 μL , 分别与“2.2.1”“2.2.2”项下不同质量浓度药物溶液(黄芩水提取物: 2、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g/mL}$, 以水提取物计; 模拟样品: 2、5、10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g/mL}$, 以混合对照品总量计) 100 μL 混合。取对数生长期 Hep-2 细胞, 分别以 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板中, 培养 16 h 后, 加入上述药物与病毒的混合液, 在倒置显微镜下观察各给药孔细胞的 CPE, 直至 CPE 值达到 4+ (即细胞死亡比例为 75% ~ 100%^[18]) 时, 记录各组细胞病变情况。试验同时设置对照组和阳性对照组, 其中对照组加入细胞但不加入药物, 阳性对照组加入细胞和利巴韦林 (0.2、0.5、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{g/mL}$), 同法处理并测定。各给药剂量均参照文献[18]和前期预试验结果设定。试验重复 3 次操作。采用 Reed-Muench 法^[19] 计算两种样品对 RSV 病毒的半数抑制浓度 (IC₅₀), 并结合“2.2.3”项下测得的 TD₅₀ 值计算药物的治疗指数 (TI): $TI = TC_{50}/IC_{50}$ 。当 $TI > 1$ 时判定为药物有效; 且该值越大, 其安全范围越大^[18]。结果显示, 不同产地黄芩水提取物及其黄酮类成分模拟样品和阳性对照利巴韦林对 RSV 均有抗病毒作用 ($TI > 1$), 抗病毒作用的强弱顺序依次为利巴韦林 > 黄酮类组分模拟样品 > 黄芩水提取物 (按 IC₅₀ 排序)。不同产地黄芩水提取物及

其对应的黄酮类成分模拟样品的抗病毒活性测定结果详见表 2、表 3。

由表 2 可知, S4 样品 (产地: 河北承德) 水提物的 IC₅₀ 最小 (11.11 $\mu\text{g/mL}$), S3 样品 (产地: 山西) 水提物的 IC₅₀ 最大 (51.74 $\mu\text{g/mL}$); S1 样品 (产地: 内蒙古-1) 和 S6 样品 (产地: 内蒙古-2) 水提物的 IC₅₀ 均为 19.24 $\mu\text{g/mL}$; S5 样品 (产地: 甘肃) 和 S8 样品 (产地: 山东) 水提物的 IC₅₀ 均为 33.33 $\mu\text{g/mL}$ 。综合考虑 TI 值大小后认为, S4 样品 (产地: 河北承德) 水提物的抗病毒作用最强 ($TI = 5.2$), S3 样品 (产地: 山西) 水提物的抗病毒作用最弱 ($TI = 1.9$)。

由表 3 可知, 8 批黄酮类成分模拟样品都呈现出不同程度的抗 RSV 活性。综合考虑 IC₅₀ 值和 TI 值的大小, 按照 4 种成分含量构成比 1:0.235:0.261:0.042 配制的 E1 样品 (模拟内蒙古-1 产黄芩) 和按照含量构成比 1:0.224:0.111:0.013 配制的 E4 样品 (模拟河北承德产黄芩) 的 TI 较大 (均大于 4), 且后者的 IC₅₀ 明显更低, 因此认为 E4 样品的抗病毒作用更强。而按照 4 种成分含量构成比 1:0.194:0.101:0.033 配制的 E3 样品 (模拟山西产黄芩) IC₅₀ 较大 (13.37 $\mu\text{g/mL}$)、TI 较小 (1.85), 表现出较弱的抗病毒活性。

2.3 两种样品中黄酮类成分含量与其抗病毒活性相关性分析

采用 SPSS 17.0 软件分别对不同产地黄芩样品的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量与其抗 RSV 活性 (以 IC₅₀ 值为指标) 进行 Pearson 相关性分析。结果显示, 上述 4 种成分的含量与抗病毒活性的相关系数 (r) 依次为 0.132 7、0.343 9、0.153 3、0.164 0 (均小于 0.5)。根据 r 值判断黄芩中各黄酮类成分含量与其抗病毒活性无显著相关性。

3 讨论

已有多项研究证实, 黄芩具有确切的抗病毒作用, 且其疗效的发挥与其所含的黄酮类成分密切相关^[7-14]。大量文献报道了不同产地、不同生长年限、野生与栽培黄芩中主要黄酮类成分的含量^[20-24]。结合本课题组的前期研究, 笔者初步总结了黄芩中黄酮类成分的含量构成特征。据郭玲玲等^[20]的报道, 不同生长年限 (1、2、3 年生) 陕西产栽培黄芩中的黄酮类成分的含量情况如下: 随着生长年限的延长, 黄芩苷和汉黄芩苷的含量呈上升趋势, 黄芩素和汉黄芩素的含量呈下降趋势。申洁等^[21]的研究结果则略有不同: 河北、山西产 3 年生黄芩中上述黄酮苷类和苷元类成分的含量普遍高于 1、2 年生黄芩。本课题组也曾对陕西、山西、河南、山东产的不同生产年限 (1、2、3 年生) 栽培黄芩中上述 4 种成分的含量进行了考察。结果发现, 陕西、山西、河南产 2 年生栽培黄芩中上述黄酮类成分含量普遍高于 1、3 年生黄芩, 而山东产 3 年生栽培黄芩的上述成分含量则高于 1、2 年生黄芩。

笔者综合上述已有研究^[20-21]的含量测定数据发现,不同生长年限黄芩中黄芩苷含量(6.98%~22.59%)、汉黄芩苷含量(0.85%~6.14%)、黄芩素含量(0.11%~2.45%)、汉黄芩素含量(0.08%~0.34%)的变化均较大,其含量最高值是最低值的数倍甚至数十倍。黄酮类成分的含量构成特征受产地和生长年限等的影响很大,同一产地的黄芩因其生长年限不同,其黄酮类成分的含量构成比不同;同一生长年限的黄芩,因其产地不同,其黄酮类成分的含量构成比也不同。同时上述文献数据显示,除黄芩素与黄芩苷的含量构成比(0.006~0.713)波动较大外,汉黄芩苷、汉黄芩素与黄芩苷的含量构成比均相对较稳定,汉黄芩苷与黄芩苷含量构成比为0.194~0.280,汉黄芩素与黄芩苷的含量构成比为0.06~0.106。

李云静等^[22]研究了野生黄芩和栽培黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等的含量,结果表明栽培品的黄芩苷和汉黄芩苷含量高于野生品,而黄芩素和汉黄芩素含量无显著差异,栽培品的质量整体优于野生品。这与李韦等^[23]的研究结果相似,但与申洁等^[21]、王丹等^[24]的研究结果“野生黄芩中黄芩苷含量高于栽培黄芩”有所不同。笔者继续对上述研究中4种黄酮类成分的含量构成比进行分析后发现,李云静等^[22]测得野生黄芩中4种成分的平均含量结构比为1:0.316:0.091:0.043,栽培黄芩则为1:0.301:0.112:0.043;申洁等^[21]测得野生黄芩中4种成分的平均含量结构比为1:0.186:0.042:0.022,而栽培黄芩则为1:0.182:0.034:0.023。上述两项研究结果表明,在黄芩野生品与栽培品中这4种黄酮类成分的含量构成比没有显著差异。

前期相关研究表明,不论在道地产区还是非道地产区,受不同生长因素(如温度、光照、湿度、降水量、土壤)和栽培方式的影响,不同生长年限的黄芩野生品或栽培品都存在质量不均一的情况,即使同一产地、同一生长年限的栽培品或野生品,其质量也存在不均一的问题^[20-24]。迄今为止,关于“黄芩药材质量的优劣与黄酮类成分含量高低有关,还是与黄酮类成分的特定构成有关”的观点尚无定论。基于此,本研究选择了8个不同产地的黄芩道地药材和非道地药材,对主要4种黄酮类成分含量、构成特征及其抗RSV活性进行了研究。与王剑等^[7]和Ma SC等^[25]的研究证实的黄芩提取物对RSV病毒具有不同程度的抑制作用一致,本课题组的研究也得到了类似的结果:8批不同产地黄芩水提取物对RSV均具有抑制作用,其 IC_{50} 为11.11~51.74 $\mu\text{g/mL}$,TI为1.86~5.20;道地产区(河北承德)的黄芩样品(S4)对RSV的抗病毒作用优于其他7个产地样品。朱立革^[15]和宋琳莉^[16]的药理研究结果证实,道地产区黄芩的抗病毒作用优于非道地产区黄芩,本文结果与之基本一致。本研究通过4种黄酮类成分含量与抗病毒活性的相关性分析发现,

黄芩抗RSV病毒作用与其所含的黄酮类单体成分含量无显著相关性($r < 0.5$);而以黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量构成为1:0.224:0.111:0.013配制的模拟样品(E4)对RSV的抑制作用最强,这提示黄芩的抗病毒活性可能是多成分协同作用的结果。本研究按不同产地黄芩样品的含量构成特征制备模拟样品并比较其抗病毒作用,结果显示,8个模拟样品都具有抗RSV活性,其 IC_{50} 为4.87~14.61 $\mu\text{g/mL}$,TI为1.85~4.75,并以模拟样品E4(4种成分含量结构比为1:0.224:0.111:0.013)对RSV的抑制作用为最强。E4对应的黄芩样品S4即为道地产区河北承德产样品,提示道地产区(河北承德)的黄芩具有较优的黄酮类成分含量构成特征,该特征可能是黄芩道地药材发挥最强抗病毒疗效的重要物质基础,也是其“优质”的重要体现。这一研究结果与张明华等^[26]报道的“药材道地性的物质基础本质,即组分构成的独特性”的观点相吻合。

综上所述,本研究初步验证了当黄芩样品中主要黄酮类成分具有适当的含量构成比(1:0.224:0.111:0.013)时,其抗病毒作用较强。鉴于产地、生长年限、品种来源等因素均会影响黄芩药材中黄酮类成分的含量及构成特征,加之水提取物与黄芩药材本身的成分也可能存在一定差异,因此关于黄芩道地性的“质-效”本质还有待进一步深入研究予以验证。此外,因研究条件有限,本研究仅收集了8批不同产地的样品,样本量较小,故后续研究不仅需要扩大样本量,同时还需要开展道地药材中最优含量构成比组分形成的影响因素规律研究,为保证道地药材“质优效佳”的稳定性和持续性提供更多的数据支持。

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,2015:301-302.
- [2] 宋扬文,陈忻.中药黄芩药理作用研究进展[J].中国中医药科技,2010,17(4):375-377.
- [3] 李子,郝近大.黄芩道地产区形成与变迁的研究[J].时珍国医国药,2010,21(12):3290-3292.
- [4] 李化,贺敬霞,牟倩倩,等. BBD-RSM结合多指标法优选黄芩黄酮的红外快提工艺[J].中药材,2017,40(9):2133-2137.
- [5] 李化,刘静,董红敬,等. HPLC法与UPLC法同时测定黄芩中5种黄酮类成分含量的比较[J].中国药房,2014,25(35):3293-3296.
- [6] LEE KJ, JUNG PM, OH YC, et al. Extraction and bioactivity analysis of major flavones compounds from *Scutellaria baicalensis* using in vitro assay and online screening HPLC-ABTS system[J]. *J Anal Methods Chem*, 2014. DOI:10.1155/2014/563702.
- [7] 王剑,侯林,陈亚乔,等.黄芩提取物体外抗病毒药效学研究[J].中成药,2017,39(9):1924-1927.
- [8] 姜茗宸,汪受传,徐秋月.黄芩素抗病毒作用研究[J].吉林

基于nNOS途径的天麻素注射液改善甲基苯丙胺诱导大鼠神经毒性损伤的作用机制研究^Δ

薛凤麟^{1*},洪仕君²,曾晓峰²,杨根梦²,周一卿²,李利华^{2#}(1.昆明医科大学第一附属医院病理科,昆明 650032; 2.昆明医科大学法学院,昆明 650500)

中图分类号 R971;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)10-1171-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.10.04

摘要 目的:研究天麻素注射液通过神经型一氧化氮合酶(nNOS)途径改善甲基苯丙胺诱导大鼠神经毒性损伤的作用机制。方法:将SD大鼠随机分为对照组、甲基苯丙胺组、常规剂量天麻素组、加倍剂量天麻素组、阴性对照(NC)腺病毒组、NC腺病毒+甲基苯丙胺组、NC腺病毒+天麻素组、nNOS腺病毒+天麻素组,每组10只。对照组大鼠腹腔注射生理盐水,每日2次;甲基苯丙胺组大鼠腹腔注射甲基苯丙胺(7.5 mg/kg),每日2次;常规剂量、加倍剂量天麻素组大鼠提前30 min分别腹腔注射不同剂量天麻素注射液(10、20 mg/kg),每日1次,再按甲基苯丙胺组方法注射甲基苯丙胺。NC腺病毒组大鼠在纹状体一次性注射NC腺病毒(4.8×10⁷ PFU)3 μL+腹腔注射生理盐水,每日2次;NC腺病毒+甲基苯丙胺组大鼠同法注射NC腺病毒,然后腹腔注射甲基苯丙胺(7.5 mg/kg),每日2次;NC腺病毒+天麻素组大鼠同法注射NC腺病毒+甲基苯丙胺,同时在注射甲基苯丙胺之前30 min腹腔注射天麻素注射液(20 mg/kg),每日1次;nNOS腺病毒+天麻素组大鼠同法注射nNOS腺病毒和甲基苯丙胺,同时在注射甲基苯丙胺之前30 min腹腔注射天麻素注射液(20 mg/kg),每日1次。各组大鼠每次腹腔注射体积均为1 mL/100 g,均连续注射给药3 d。观察大鼠刻板行为并评分,检测大鼠纹状体的细胞凋亡率、凋亡相关因子[Bcl-2、Bax、活化胱天蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)]蛋白表达量、氧化应激相关因子[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)]水平,以及一氧化氮(NO)水平和nNOS蛋白表达量。结果:与对照组比较,甲基苯丙胺组大鼠的刻板行为评分和纹状体的细胞凋亡率、Bax、Cleaved caspase-3、nNOS蛋白表达量

- 中医药,2016,36(7):753-756.
- [9] 丁婵,褚秀玲,苏建青,等.黄芩苷抗病毒作用研究进展[J].中兽医医药杂志,2016,35(2):27-29.
- [10] 徐珊,王乐,杨巧芳,等.黄芩抗病毒药理作用研究述评[J].中华中医药学刊,2007,25(7):1355-1357.
- [11] 吴莹,金叶智,吴珺,等.黄芩主要成分体外抗甲型流感病毒作用的研究[J].北京中医药大学学报,2010,33(8):541-545.
- [12] 彭海亭.中药柴胡、黄芩治疗流感300例疗效观察[C]//'98全国中药研究暨中药房管理学术研讨会论文集汇编.北京:中华中医药学会,1998:87-88.
- [13] 郭晓松,位宁,王影霞.黄芩苷联合抗病毒药物治疗重症流感的效果观察[J].中外女性健康研究,2016(18):186、193.
- [14] 施恒飞.黄芩苷抗呼吸道合胞病毒感染作用研究[D].南京:南京大学,2016.
- [15] 朱立革.道地黄芩与非道地黄芩的药效学实验研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2010.
- [16] 宋琳莉.基于不同来源黄芩物质基础拮抗流感病毒的实验研究[D].北京:北京中医药大学,2009.
- [17] 龙翠华,田其学,唐正平.黄芩水提工艺的研究[J].湖南中医杂志,2005,21(3):115-116.
- [18] 王辉强,马琳琳,蒋建东,等.重组人干扰素α2b体外广谱抗呼吸道病毒药效学研究[J].药学学报,2014,49(11):1547-1553.
- [19] 傅继华.病毒学实用实验技术[M].济南:山东科学技术出版社,2001:61.
- [20] 郭玲玲,刘毅,禄梦杰,等.HPLC法同时测定陕西产不同生长年限野生和栽培黄芩中9种化学成分的含量[J].中草药,2018,49(4):935-940.
- [21] 申洁,李珮,刘双双,等.河北与山西产黄芩药材中主要黄酮类成分的含量比较研究[J].中国现代中药,2019,21(4):487-493.
- [22] 李云静,张建逵,王冰,等.不同产地黄芩药材中黄芩苷等5种黄酮类成分含量的比较[J].时珍国医国药,2016,27(12):2985-2988.
- [23] 李韦,李化,杨滨,等.栽培黄芩和野生黄芩化学成分比较研究[J].中国中药杂志,2008,33(12):1425-1429.
- [24] 王丹,张秋燕,杨兴鑫,等.基于HPLC指纹图谱的黄芩道地药材与非道地药材的鉴别研究[J].中国中药杂志,2013,38(12):1951-1960.
- [25] MA SC, DU J, BUT PP, et al. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus[J]. *J Ethnopharmacol*, 2002. DOI:10.1016/S0378-8741(01)00389-0.
- [26] 张明华,封亮,胡绍英,等.药材道地性的物质基础本质:组分结构的独特性[J].中国中药杂志,2013,38(1):136-140.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560302)

* 主治医师,博士研究生。研究方向:病理生理学、法医病理学、法医毒理学。E-mail:pangao36@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:法医病理学、毒理学。电话:0871-65922838。E-mail:lilihua1229@sohu.com

(收稿日期:2019-09-16 修回日期:2020-04-01)

(编辑:段思怡)