

百蕊草保肝成分的预测筛选、活性评价及定量分析^Δ

李莉^{1,2*}, 程雪纯³, 庄秀萍³, 周朋^{1,2}, 张葆青^{1,2#}, 王信⁴ (1. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院儿科, 济南 250011; 3. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 4. 山东中医药大学附属医院中医药创新转化研究院, 济南 250011)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)19-2522-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.19.07



摘要 目的 为百蕊草的质量控制、临床应用及源于百蕊草的保肝药物开发提供实验基础。方法 采用网络药理学技术预测、筛选百蕊草中潜在保肝活性成分及其作用靶点;以4 mmol/L的异烟肼诱导建立肝脏荧光标记转基因斑马鱼 *Tg(fabp10a:dsRed)* 肝损伤模型,以斑马鱼仔鱼肝脏相对荧光面积、相对荧光强度及天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷胱甘肽(GSH)、白细胞介素6(IL-6)为指标,评价潜在活性成分的保肝活性;采用高效液相色谱法测定17批不同产地百蕊草药材中保肝活性成分的含量。结果 通过网络药理学技术筛选出百蕊草素 I (KOG)、山柰酚-3,7-二葡萄糖苷(KDG)、蒙花苷(BUD)、芹菜素-5-*O*-新橙皮苷(AON)4种潜在保肝活性成分,其核心作用靶点涉及丝裂原激活的蛋白激酶1、核因子κB亚基1等。药效验证实验结果显示,25 μmol/L KOG、BUD、AON以及50 μmol/L KDG均可显著增加/增强肝损伤模型仔鱼肝脏的相对荧光面积、相对荧光强度($P<0.05$),降低其AST、ALT、IL-6水平($P<0.05$),升高其GSH水平($P<0.05$)。含量测定结果显示,17批百蕊草药材中KOG均可检出,含量为0.097 0~8.082 0 mg/g;KDG、AON、BUD在部分批次样品中未检出,在检出批次样品中的含量分别为0.019 3~0.123 2、0.018 4~0.109 1、0.385 1~1.189 3 mg/g。结论 百蕊草中KOG、KDG、AON、BUD可能是其潜在保肝活性成分;其中KOG在不同产地百蕊草药材中均可检出且含量相对较高,可作为百蕊草保肝作用评价的主要指标成分。

关键词 百蕊草;保肝活性成分;网络药理学;斑马鱼;百蕊草素 I;蒙花苷;山柰酚-3,7-二葡萄糖苷;芹菜素-5-*O*-新橙皮苷

Predictive screening, activity evaluation and quantitative analysis of hepatoprotective constituents from *Thesium chinense* Turcz.

LI Li^{1,2}, CHENG Xuechun³, ZHUANG Xiuping³, ZHOU Peng^{1,2}, ZHANG Baoqing^{1,2}, WANG Xin⁴ (1. First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Pediatrics, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China; 3. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 4. Institute of Traditional Chinese Medicine Innovation and Transformation, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To provide an experimental basis for quality control, clinical application and development of hepatoprotective drugs derived from *Thesium chinense* Turcz. **METHODS** Network pharmacology was adopted to predict and screen potential hepatoprotective constituents and their action targets of *T. chinense* Turcz. A liver-injured model of transgenic zebrafish *Tg(fabp10a:dsRed)* with fluorescent-labeled liver was induced by 4 mmol/L isoniazid. The relative liver fluorescence area and relative fluorescence intensity of zebrafish larvae, as well as the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glutathione (GSH) and interleukin-6 (IL-6) were taken as indexes to evaluate the hepatoprotective activity of potential active constituents. High-performance liquid chromatography was used to determine the contents of hepatoprotective active constituents in 17 batches of *T. chinense* Turcz. medicinal materials from different producing areas. **RESULTS** Four potential hepatoprotective constituents including kaempferol-3-*O*-glucorhamnoside (KOG), kaempferol-3, 7-di-*O*-glucoside (KDG), buddleoside (BUD) and apigenin-5-*O*-neohesperidoside (AON) were screened out via network pharmacology, and their core targets involved mitogen-activated protein kinase 1, nuclear factor-κB subunit 1, etc. Pharmacodynamic verification results showed that 25 μmol/L KOG, BUD, AON and 50 μmol/L KDG could significantly increase the relative liver fluorescence area and relative fluorescence intensity of liver-injured model larvae ($P<0.05$), reduce the levels of AST, ALT and IL-6 ($P<0.05$), and elevate the GSH level ($P<0.05$). Content determination results indicated that KOG could be detected in

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82104506);山东中医药大学附属医院科技创新课题(No.YZ-2022-7-10)

* 第一作者 博士研究生。研究方向:中医药治疗儿童消化与呼吸系统疾病。E-mail:349783852@qq.com

通信作者 教授,主任医师,博士生导师。研究方向:中医药治疗儿童消化、呼吸及神经系统疾病。E-mail:baoping09009@126.com

all 17 batches of *T. chinense* Turcz. medicinal materials, with contents ranging from 0.097 0 to 8.082 0 mg/g;KDG, AON and BUD were not detected in partial batches of samples, and their contents in detectable batches were 0.019 3-0.123 2 mg/g, 0.018 4-0.109 1 mg/g and 0.385 1-1.189 3 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** KOG, KDG, AON and BUD in *T.chinense* Turcz. may be its potential hepatoprotective active constituents. Among them, KOG can be detected in *T.chinense* Turcz. medicinal materials from different producing areas with relatively high content, which can be used as the main marker constituent for evaluating the hepatoprotective effect of *T.chinense* Turcz.

KEYWORDS *Thesium chinense* Turcz.; hepatoprotective active constituents; network pharmacology; zebrafish; kaempferol-3-*O*-glucorhamnoside; buddleoside; kaempferol-3,7-di-*O*-glucoside; apigenin-5-*O*-neohesperidoside

百蕊草是檀香科植物百蕊草 *Thesium chinense* Turcz. 的干燥全草,具有清热、利湿、解毒的功效^[1]。其本草记载可追溯至宋代《本草图经》,1977年首次被收录于《中国药典》,现收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003年版)^[2]。百蕊草在我国分布较广,主产于安徽、浙江和湖北等地,临床上广泛用于肺炎、扁桃体炎、乳腺炎、肾炎等疾病的治疗。现代药理研究表明,百蕊草具有抗炎、抗氧化、抗菌、镇痛等多种药理作用^[3]。

炎症反应和氧化应激是肝损伤发生发展的重要病理机制:肝细胞功能受损可引发氧化应激,促使活性氧(reactive oxygen species,ROS)大量生成;当ROS水平超过超氧化物歧化酶、谷胱甘肽(glutathione,GSH)等内源性抗氧化系统的清除能力时,可引发脂质过氧化。氧化应激还可诱导肝Kupffer细胞活化并释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)等细胞因子,加剧炎症反应与肝细胞凋亡,该过程受核因子 κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)通路的调控^[4]。因此,抑制炎症级联反应、恢复氧化/抗氧化平衡可阻断肝损伤进程,进而发挥保肝作用。百蕊草因具有显著的抗炎、抗氧化活性,近年来被广泛用于肝损伤疾病的研究^[5],然而目前其保肝活性成分以及成分-效应关联机制尚不清楚,制约了其保肝药用价值的转化和深度开发。

网络药理学是通过数据库检索,构建“药物-成分-靶点-通路”网络,用于预测中药潜在有效成分、阐释其作用机制的常用方法,已被广泛应用于中药药效物质基础研究^[6-7]。本研究拟采用网络药理学技术筛选百蕊草的潜在保肝活性成分,然后采用异烟肼诱导的斑马鱼肝损伤模型,对筛选得到的成分进行保肝活性评价,并采用高效液相色谱(HPLC)法对不同产地百蕊草药材中潜在的保肝活性成分进行定量分析,旨在为百蕊草的质量控制、临床应用及源于百蕊草的保肝药物开发提供实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

1260型HPLC仪购自美国Agilent公司;EP214C型万分之一电子天平、AB135-S型十万分之一天平均购自瑞士Mettler Toledo公司;PGX-70A型斑马鱼胚胎控光恒温培养箱购自杭州川一仪器制造有限公司;SW-7型

荧光体视显微镜购自厦门麦克奥迪实业集团有限公司;H1650-W型台式高速离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 药材

17批百蕊草药材分别采自河南、河北、安徽、辽宁、云南、湖北等地,经山东中医药大学附属医院药学部马传江主任药师鉴定为檀香科植物百蕊草 *T. chinense* Turcz. 的干燥全草。样品来源信息见表1;药材形态图请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”板块查看附图1。

表1 百蕊草药材来源信息

样品编号	产地	采收时间	样品编号	产地	采收时间
AH-BRC-1	安徽	2023年5月	HEN-BRC-2	河南	2023年4月
AH-BRC-2	安徽	2023年6月	HEN-BRC-3	河南	2023年6月
HEB-BRC-1	河北	2023年4月	HEN-BRC-4	河南	2023年5月
HEB-BRC-2	河北	2023年6月	YN-BRC-1	云南	2023年6月
LN-BRC-1	辽宁	2023年6月	YN-BRC-2	云南	2023年4月
LN-BRC-2	辽宁	2023年7月	HUB-BRC-1	湖北	2023年4月
LN-BRC-3	辽宁	2023年6月	HUB-BRC-2	湖北	2023年7月
LN-BRC-4	辽宁	2023年9月	HUB-BRC-3	湖北	2023年6月
HEN-BRC-1	河南	2023年4月			

1.3 主要试剂

对照品百蕊草素 I (kaempferol-3-*O*-glucorhamnoside, 后文简写为“KOG”;纯度 $\geq 98\%$,批号HR16725S1)、蒙花苷(buddleoside,后文简写为“BUD”;纯度 $\geq 98\%$,批号HE16926S1)、山柰酚-3,7-二葡萄糖苷(kaempferol-3,7-di-*O*-glucoside,后文简写为“KDG”;纯度 $\geq 98\%$,批号HS21910B1)、芹菜素-5-*O*-新橙皮苷(apigenin-5-*O*-neohesperidoside,后文简写为“AON”;纯度 $\geq 98\%$,批号HR3402W1)均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)检测试剂盒(批号均为20250708)均购自江苏晶美生物科技有限公司;GSH检测试剂盒(批号20240819)购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇、甲酸为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

1.4 实验动物

肝脏荧光标记转基因斑马鱼 *Tg(fabp10a:DsRed)* 由上海费曦生物科技有限公司提供。本研究动物实验方

案已通过山东中医药大学附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号:SDSZYYAWE20250320003)。

2 方法与结果

2.1 百蕊草保肝成分的网络药理学筛选

2.1.1 百蕊草的化学成分及其作用靶点检索

通过查阅文献共收集到百蕊草的34种化学成分。在SwissTargetPrediction数据库(<https://www.swisstargetprediction.ch/>)、PharmMapper数据库(<http://www.lilab.ecust.cn/pharmmapper/>)、SEA数据库(<https://sea.bkslab.org/>)、SuperPred数据库(<https://prediction.charite.de/>)中检索上述化学成分的作用靶点,经合并、去重后,最终得到1 369个成分作用靶点。

2.1.2 肝损伤疾病与百蕊草化学成分的交集靶点筛选

在DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/>)、OMIM数据库(<https://www.omim.org/>)、GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)中,分别以“Hepatic injury”为关键词进行检索,共获得12 908个肝损伤疾病靶点。将百蕊草成分作用靶点和疾病靶点取交集,获得交集靶点1 270个。

2.1.3 蛋白质-蛋白质互作网络构建与核心靶点筛选

将1 270个疾病-成分交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/>),构建蛋白质-蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络,筛选combined score ≥ 0.9 的靶点,并将其导入Cytoscape 3.9.1软件,以度值(degree)的3倍中位数为临界值,初步筛选候选靶点。将所得候选靶点再次进行拓扑属性分析,分别以度值、节点紧密度和节点介度的中位数为临界值,筛选得到与保肝作用相关的10个核心靶点,包括非受体酪氨酸激酶(non-receptor tyrosine kinase, SRC)、丝裂原激活的蛋白激酶1(mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、MAPK3、肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53, TP53)、NF- κ B亚基(NF- κ B subunit, RELA)、AKT丝氨酸/苏氨酸激酶1(AKT serine/threonine kinase 1, AKT1)、热休克蛋白90 α 家族A类成员1(heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)、连环蛋白 β_1 、核因子 κ B亚基1(nuclear factor- κ B subunit 1, NFKB1)、信号转导与转录激活因子3。

2.1.4 核心靶点的富集分析

将核心靶点导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov>),进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释和京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为阈值,筛选得到76个GO条目和123条KEGG通路。其中,GO功能注释的生物过程(biological process, BP)主要包括RNA聚合酶II介导的转录正调控(positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、凋亡过程的负调控(negative regulation of apoptotic process)、基因表达的

正调控(positive regulation of gene expression)等;分子功能(molecular function, MF)包括蛋白结合(protein binding)、蛋白激酶结合(protein kinase binding)、DNA结合(DNA binding)等;细胞组分(cellular component, CC)主要分布于细胞核(nucleus)、细胞质(cytoplasm)、细胞质溶胶(cytosol)等。KEGG通路富集分析得到的信号通路主要涉及癌症通路(pathways in cancer)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)、催乳素信号通路(prolactin signaling pathway)、HIF-1信号通路(HIF-1 signaling pathway)等。通过微生信网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>),选择 $P < 0.05$ 且“Count”值排名前15位的GO条目和KEGG通路进行可视化分析。具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”板块查看附图2、附图3。

2.1.5 药物-成分-靶点-通路互作网络构建

采用Cytoscape 3.5.1软件构建“百蕊草-成分-靶点-通路”互作网络。结果显示,度值排名前4位的化学成分为KOG、KDG、AON、BUD,提示这些成分可能是百蕊草发挥保肝作用的潜在活性成分;靶点HSP90AA1、SRC、NFKB1、AKT1、MAPK1与各通路连接度较高,可能是百蕊草发挥保肝作用的潜在作用靶点。具体结果请扫描本文首页二维码,进入“增强出版”板块查看附图4。

2.2 百蕊草中潜在活性成分的保肝作用评价

2.2.1 斑马鱼的养殖与胚胎培养

斑马鱼的养殖繁育参照*The Zebrafish Book*进行^[8]。斑马鱼养殖条件如下:水温(28 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, pH7.0~7.2,养殖水体电导率450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$,黑暗10 h/光照14 h周期循环。成年斑马鱼每日喂食丰年虾幼虫3次。选取健康、性成熟的斑马鱼,按雌性与雄性1:2的比例放入繁殖缸中,以透明隔板分隔,避免提前交配。次日光照开启后移除隔板,使其自然交配产卵,30 min后收集鱼卵;用胚胎培养液反复清洗鱼卵3次,去除未受精卵、死卵及卵壳等杂质,在体视显微镜下挑选发育正常的受精卵用于后续实验。将受精卵置于专用胚胎培养液(含5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl_2 、0.16 mmol/L MgSO_4)中,在(28.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 下控光培养,每24 h更换胚胎培养液并及时去除死胚,控制胚胎密度在5枚/mL。

2.2.2 百蕊草中潜在保肝活性成分干预浓度的筛选

斑马鱼胚胎发育3 d后,选择正常发育的斑马鱼仔鱼(后文简称为“仔鱼”),以每孔40尾的密度接种于6孔板中。将仔鱼随机分为空白组和不同成分组,每组设3个复孔。空白组仔鱼给予空白胚胎培养液,不同成分组仔鱼给予含4 mmol/L异烟肼^[9]和百蕊草中各潜在活性成分系列浓度(200、150、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$,根据前期预实验结果设置)的胚胎培养液。将培养板置于28 $^{\circ}\text{C}$ 控光恒温培养箱中孵化,浸浴给药72 h,其间每24 h换1次药液。以心脏骤停作为仔鱼死亡的判断标准:

在体视显微镜下观察仔鱼的肝脏区域,持续观察 30 s,若未见心脏搏动,且用移液器枪头轻触鱼体尾部后无应激反应及心跳恢复,则判定为心脏骤停^[9];在体视显微镜下观察仔鱼的形态学畸变情况,参照文献标准进行畸变评分,畸变评分 ≤ 3 分则判定该仔鱼为畸形个体^[10]。以仔鱼的存活率(存活率=存活仔鱼数/总仔鱼数 $\times 100\%$)和畸形率(畸形率=畸形仔鱼数/存活仔鱼数 $\times 100\%$)为指标,筛选各成分的干预浓度。

结果(图 1)显示,当 KOG、KDG、BUD、AON 的浓度分别低于 25、50、25、25 $\mu\text{mol/L}$ 时,仔鱼的存活率均高于 95%、畸形率均低于 15%。综合考虑,以 25、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 作为 KOG、BUD、AON 后续斑马鱼实验的高、低干预浓度,以 50、25 $\mu\text{mol/L}$ 作为 KDG 后续斑马鱼实验的高、低干预浓度。

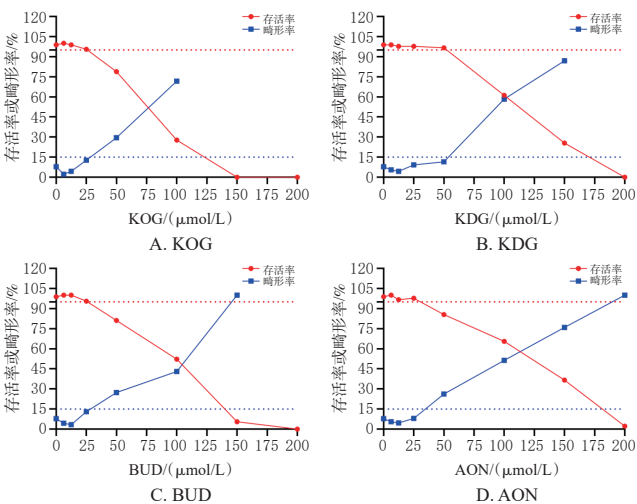


图 1 不同浓度 KOG、KDG、BUD、AON 对仔鱼存活率和畸形率的影响

2.2.3 仔鱼肝脏形态观察及荧光面积、荧光强度检测

斑马鱼胚胎发育 3 d 后,选择正常发育的仔鱼,以每孔 40 尾的密度接种于 6 孔板中。将仔鱼随机分为空白组、模型组 and 不同成分的高、低浓度组,每组设 3 个复孔。空白组仔鱼给予空白胚胎培养液;模型组仔鱼给予含 4 mmol/L 异烟肼的胚胎培养液^[9];KOG、BUD、AON 高、低浓度组仔鱼分别给予含 4 mmol/L 异烟肼和 25、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 相应成分的胚胎培养液,KDG 高、低浓度组仔鱼分别给予含 4 mmol/L 异烟肼和 50、25 $\mu\text{mol/L}$ KDG 的胚胎培养液。将培养板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 控光恒温培养箱中孵化,浸浴给药 72 h,其间每 24 h 换 1 次药液。给药结束后,各组随机选取仔鱼 8 尾,在荧光显微镜下观察其局部肝脏形态,使用 ImageJ 软件分析仔鱼肝脏相对荧光面积(相对荧光面积=给药组仔鱼肝脏平均荧光面积/同批次空白组仔鱼肝脏平均荧光面积 $\times 100\%$)和相对荧光强度(相对荧光强度=给药组仔鱼肝脏平均荧光强度/同批次空白组仔鱼肝脏平均荧光强度 $\times 100\%$)。采用 Graph-

Pad Prism 8.0 软件进行统计分析;数据经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (后文统计学方法同)。

结果(图 2、图 3)显示,与空白组比较,模型组仔鱼肝脏萎缩,相对荧光面积、相对荧光强度均显著减小/减弱($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组仔鱼肝脏形态均有不同程度的改善,肝脏相对荧光面积和相对荧光强度均呈不同程度的增加/增强趋势;其中,KOG、KDG、BUD、AON 高浓度组仔鱼肝脏的相对荧光面积、相对荧光强度,KOG 低浓度组仔鱼肝脏的相对荧光面积、相对荧光强度和 BUD 低浓度组仔鱼肝脏的相对荧光强度均显著增加/增强($P<0.05$)。

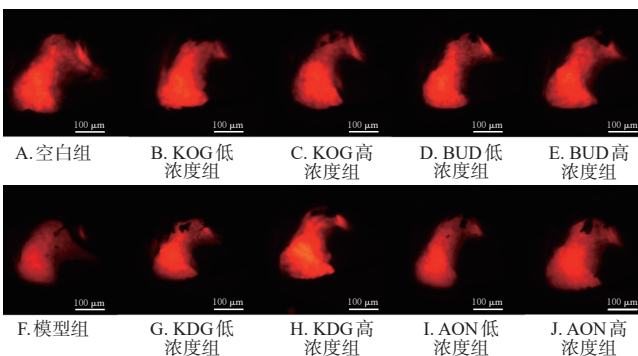


图 2 不同浓度 KOG、KDG、BUD、AON 对仔鱼肝脏形态的影响

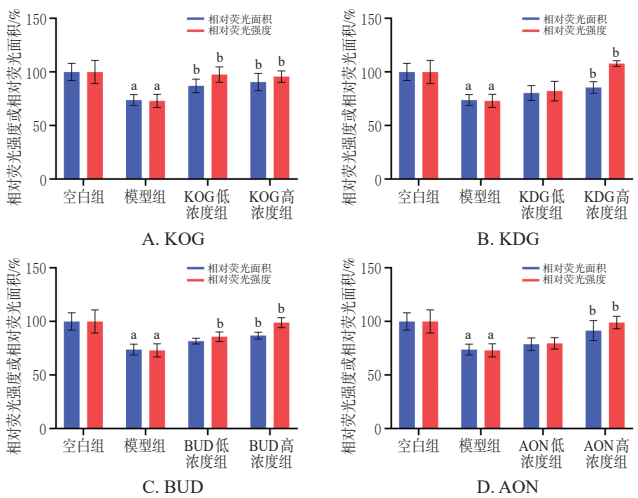


图 3 不同浓度 KOG、KDG、BUD、AON 对仔鱼肝脏相对荧光面积和相对荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2.4 仔鱼中 ALT、AST、GSH、IL-6 水平测定

仔鱼分组、给药、处理方法同“2.2.3”项。浸浴给药结束后,各组随机选取 30 尾仔鱼,以纯净水漂洗 3 次,剪碎后加磷酸盐缓冲液(PBS)100 μL 进行匀浆,将匀浆液以 2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书方法测定上清液中 ALT、AST、GSH、IL-6 水平。

结果(表2)显示,与空白组比较,模型组仔鱼中ALT、AST、IL-6水平均显著升高($P<0.05$),GSH水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,除BUD低浓度组GSH和KDG、AON低浓度组ALT外,其余各组仔鱼中上述指标均显著改善($P<0.05$)。

表2 各组仔鱼中ALT、AST、IL-6、GSH水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ALT/(U/mg prot)	AST/(U/mg prot)	GSH/(μ g/mg prot)	IL-6/(pg/mg prot)
空白组	11.50 $\pm$ 0.15	8.72 $\pm$ 0.17	17.03 $\pm$ 0.46	0.017 $\pm$ 0.000
模型组	13.61 $\pm$ 0.17 ^a	11.29 $\pm$ 0.30 ^a	9.83 $\pm$ 0.32 ^a	0.023 $\pm$ 0.001 ^a
KOG低浓度组	12.01 $\pm$ 0.08 ^b	9.63 $\pm$ 0.11 ^b	11.77 $\pm$ 0.55 ^b	0.018 $\pm$ 0.002 ^b
KOG高浓度组	11.66 $\pm$ 0.17 ^b	7.95 $\pm$ 0.08 ^b	12.04 $\pm$ 0.40 ^b	0.017 $\pm$ 0.000 ^b
BUD低浓度组	12.87 $\pm$ 0.06 ^b	8.97 $\pm$ 0.12 ^b	9.96 $\pm$ 0.70	0.018 $\pm$ 0.001 ^b
BUD高浓度组	12.32 $\pm$ 0.06 ^b	9.05 $\pm$ 0.20 ^b	12.46 $\pm$ 0.42 ^b	0.018 $\pm$ 0.000 ^b
KDG低浓度组	13.35 $\pm$ 0.13	9.04 $\pm$ 0.14 ^b	13.13 $\pm$ 0.48 ^b	0.019 $\pm$ 0.001 ^b
KDG高浓度组	12.72 $\pm$ 0.20 ^b	9.68 $\pm$ 0.17 ^b	16.31 $\pm$ 0.67 ^b	0.017 $\pm$ 0.000 ^b
AON低浓度组	13.21 $\pm$ 0.14	8.63 $\pm$ 0.32 ^b	11.74 $\pm$ 0.79 ^b	0.019 $\pm$ 0.000 ^b
AON高浓度组	12.78 $\pm$ 0.30 ^b	8.53 $\pm$ 0.31 ^b	13.80 $\pm$ 0.43 ^b	0.017 $\pm$ 0.000 ^b
F	58.73	56.34	57.85	16.01
P	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

a:与空白组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 百蕊草中保肝活性成分的含量测定

采用HPLC法测定百蕊草中保肝活性成分KOG、KDG、BUD、AON的含量。

2.3.1 供试品溶液的制备

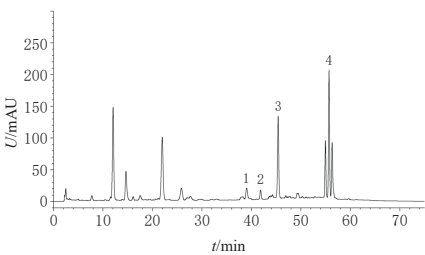
取百蕊草药材粉末(过三号筛)约1.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量;超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min后取出,冷却至室温,再次称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 混合对照品溶液的制备

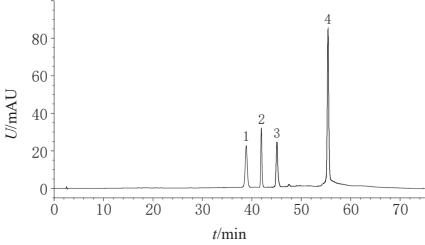
取KOG、KDG、AON、BUD对照品各适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.509、0.194、0.199、0.431 mg/mL的单一对照品储备液。分别精密量取上述各成分的单一对照品储备液1 mL,置于同一5 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成上述成分质量浓度分别为0.101 8、0.038 8、0.039 8、0.086 2 mg/mL的混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件与系统适用性试验

采用Agilent Zorbax SB-C₁₈色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),以甲醇(A)-0.5%甲酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min,18%A;5~15 min,18%A $\rightarrow$ 26%A;15~25 min,26%A;25~35 min,26%A $\rightarrow$ 32%A;35~52 min,32%A $\rightarrow$ 57%A;52~60 min,57%A;60~70 min,57%A $\rightarrow$ 18%A;70~75 min,18%A);柱温为30 $^{\circ}$ C;流速为1.0 mL/min;检测波长为300 nm。取“2.3.1”项下供试品溶液、“2.3.2”项下混合对照品溶液,按此色谱条件进样测定,记录色谱图。结果(图4)显示,各待测成分均达到基线分离,各成分色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,以各待测成分峰计理论板数均不低于5 000,且空白溶剂(甲醇)对测定无干扰。



A. 供试品溶液



B. 混合对照品溶液

1:KDG;2:AON;3:KOG;4:BUD。

图4 供试品溶液、混合对照品溶液的HPLC图

2.3.4 线性关系考察

取KOG、KDG、AON、BUD的单一对照品储备液(各精密量取0.1、0.5、1、2、5、10 mL),分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇稀释制成系列质量浓度的线性工作液,然后按“2.3.3”项下色谱条件进行测定。以各成分对照品的进样质量浓度为横坐标(X)、对应峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,并进行线性回归。结果(表3)显示,上述成分在各自进样质量浓度范围内线性关系均良好(相关系数均不低于0.999 0)。

表3 4种化学成分的回归方程及线性范围、相关系数

成分	回归方程	线性范围/(mg/mL)	相关系数
KOG	$Y=1\,596.2X+24.559$	0.005 09~0.509 00	0.999 9
KDG	$Y=4\,871.9X-19.985$	0.001 94~0.194 00	0.999 1
BUD	$Y=4\,670.4X-100.550$	0.004 31~0.431 00	0.999 8
AON	$Y=7\,572.3X-49.849$	0.001 99~0.199 00	0.999 6

2.3.5 精密度试验

精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件平行测定6次,记录峰面积。结果显示,KOG、KDG、AON、BUD峰面积的RSD分别为1.45%、1.79%、1.07%、1.97%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验

取“2.3.1”项下供试品溶液(样品编号:AH-BRC-1),分别在室温放置0、2、4、8、12、24 h后,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,KOG、KDG、AON、BUD峰面积的RSD分别为1.86%、3.22%、2.85%、1.77%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验

取百蕊草药材(样品编号:AH-BRC-1)适量,按“2.3.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用标准曲线法计算成分含量。结果显示,百蕊草中KOG、KDG、AON、

BUD 含量的 RSD 分别为 1.90%、4.79%、1.65%、1.41% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验

取同一批次百蕊草药材(样品编号:AH-BRC-1)适量,粉碎,过三号筛。精密称取上述药材粉末6份,每份约0.75 g,置于具塞锥形瓶中。分别精密加入KOG对照品溶液(0.509 0 mg/mL;溶剂为甲醇,其余对照品溶液同)1.2 mL、KDG对照品溶液(0.038 8 mg/mL)1 mL、AON对照品溶液(0.039 8 mg/mL)1.5 mL、BUD对照品溶液(0.431 0 mg/mL)0.6 mL,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分的加样回收率。结果显示,KOG、KDG、AON、BUD的平均加样回收率分别为99.20%、101.53%、102.39%、101.91%,RSD分别为2.66%、3.39%、2.54%、1.51%($n=6$),表明该方法准确度良好。

2.3.9 样品含量测定

将17批药材分别按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并采用标准曲线法计算各成分含量。平行测定3次,取平均值。结果(表4)显示,17批百蕊草药材中KOG均可检出,含量为0.097 0~8.082 0 mg/g;KDG、AON、BUD在部分批次样品中未检出,在检出批次样品中的含量分别为0.019 3~0.123 2、0.018 4~0.109 1、0.385 1~1.189 3 mg/g。不同产地百蕊草药材中上述4种成分的含量差异较大。

表4 17批不同产地百蕊草药材中4种化学成分的含量测定结果($n=3$,mg/g)

产地	编号	KOG	KDG	AON	BUD
安徽	AH-BRC-1	0.840 1	0.041 0	0.068 5	0.385 1
	AH-BRC-2	2.556 5	—	—	—
河北	HEB-BRC-1	4.205 8	—	—	—
	HEB-BRC-2	0.651 1	0.048 4	0.109 1	1.189 3
辽宁	LN-BRC-1	0.825 6	0.026 5	0.018 4	0.558 0
	LN-BRC-2	0.118 9	0.019 3	0.021 4	—
	LN-BRC-3	0.887 9	0.049 6	0.068 1	—
	LN-BRC-4	8.082 0	—	0.034 0	—
河南	HEN-BRC-1	3.8935	0.048 6	—	—
	HEN-BRC-2	3.587 4	—	—	—
	HEN-BRC-3	1.174 1	0.038 1	0.055 2	0.406 8
	HEN-BRC-4	2.245 3	0.123 2	0.056 8	1.039 1
云南	YN-BRC-1	0.097 0	—	—	—
	YN-BRC-2	7.854 1	—	—	—
湖北	HUB-BRC-1	4.114 5	—	—	—
	HUB-BRC-2	0.878 6	0.107 5	0.104 4	0.496 4
	HUB-BRC-3	2.092 0	0.021 5	0.016 6	—

—:未检出。

3 讨论

本研究采用网络药理学技术、斑马鱼模型实验、HPLC法对百蕊草中潜在保肝活性成分进行预测筛选、药效评价和定量分析。网络药理学研究结果表明,KOG、KDG、BUD、AON可能是百蕊草的潜在保肝活性

成分,其核心作用靶点可能为HSP90AA1、SRC、NFKB1、AKT1、MAPK1等。据研究报道,KOG可降低小鼠肝脏中TNF- α 、IL-6水平,升高IL-10水平,对重症脓毒症引起的肝损伤具有一定的保护作用^[11]。BUD对多种肝损伤均具有保护作用:其可通过抗炎、增强机体GSH系统功能、抑制自由基和脂质过氧化物的产生,对D-氨基半乳糖胺诱导的大鼠急性肝损伤发挥保护作用^[12];可抑制醛酮还原酶活性,减少肝脏炎症反应与氧化应激,减轻2型糖尿病所致肝组织病理损伤^[13];还可与PRKAB1亚基发生直接相互作用,激活腺苷酸活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白复合物1通路,进而激活转录因子EB介导的自噬-溶酶体通路,改善非酒精性脂肪性肝炎相关症状^[14]。然而,目前尚未见KDG、AON对肝脏相关疾病干预效果的文献报道。

异烟肼是WHO推荐的标准抗结核治疗方案中的首选药物,但其易引起肝损伤,发生率约为48%^[15]。斑马鱼是继大鼠和小鼠之后的第三大脊椎类模式动物,具有体型小、胚胎透明、发育周期短、饲养成本低、给药方式简单等优势,目前已被广泛应用于活性药物筛选、药物毒性评价、疾病模型构建、药物作用机制研究等领域^[16-17]。本研究采用肝脏特异性表达红色荧光蛋白的Tg(*fabp10a:dsRed*)转基因斑马鱼,以异烟肼诱导制备肝损伤斑马鱼模型,通过测定肝脏相对荧光面积、相对荧光强度及ALT、AST、GSH、IL-6等指标,初步评价了KOG、KDG、BUD、AON的保肝活性。结果显示,与模型组比较,4种成分给药组仔鱼肝脏的相对荧光面积和相对荧光强度均不同程度增加/增强,ALT、AST及IL-6水平均不同程度降低,GSH水平均不同程度升高。这提示上述4种成分对异烟肼诱导的斑马鱼肝损伤均有不同程度的保护作用。

此外,本研究采用HPLC法对17批不同产地百蕊草药材中上述4种成分进行了含量分析。结果表明,4种成分在不同批次药材中的含量差异较大。其中,KOG在各批次样品中均能检出,且含量相对较高;KDG和AON的总体含量较低,在部分批次样品中未检出;BUD的含量在不同批次样品中波动较大,最高可达1.189 3 mg/g。上述结果提示,产地可显著影响百蕊草中保肝活性成分的积累,进而影响百蕊草的保肝作用。造成上述差异的原因可能与百蕊草原植物的半寄生特性及生长环境有关。研究表明,百蕊草次生代谢产物的积累受宿主植物种类、土壤微生物群落、矿质营养、气候条件及加工储存条件等多个因素共同影响^[3,18-20];同时,黄酮类生物合成途径关键酶基因的表达调控差异及采收期等因素也可能导致样品中黄酮类成分积累不同^[18,21],如产地同为辽宁的9月份采收样品(编号为LN-BRC-4)与6月份采收样品(编号为LN-BRC-3)中KOG的含量差别较大。本研究中不同产地样品在颜色、高矮等性状上亦存在差

异,提示药材个体间生长状况存在差异,这可能是部分批次中部分成分未检出的原因之一。值得注意的是,KOG在不同产地样品中均能稳定检出且含量相对较高,提示其可能是百蕊草发挥保肝作用的重要物质基础,可作为百蕊草保肝功效的代表性成分,但后续仍需扩大样本量,并结合药效研究进一步验证。

综上所述,本研究通过网络药理学筛选结合斑马鱼模型验证,明确了百蕊草中4种成分(KOG、KDG、BUD、AON)的保肝活性,并通过HPLC法揭示了其在不同产地百蕊草药材中的含量差异。其中KOG在不同产地百蕊草药材中均可检出且含量相对较高,可作为百蕊草保肝作用评价的主要指标成分。但本研究仅基于斑马鱼模型进行初步药效评价,作用机制尚停留在预测层面,后续将开展哺乳动物体内验证,并围绕HSP90AA1、SRC等核心靶点展开研究,进一步明确百蕊草的保肝药效物质基础及作用机制。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:595.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准:2003年版[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:44.
- [3] Li G H, Fang K L, Yang K, et al. *Thesium chinense* Turcz.: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113950.
- [4] 廖月,何毅怀,罗亚文. 氧化应激在急性肝损伤中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2402-2407.
- [5] Li L, Ju J F, Zhuang X P, et al. Chemistry of Bairui granules and its mechanisms in the protective effect against methotrexate-induced liver injury[J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155158.
- [6] 牛俊博,侯兵乔,王迪,等. 基于网络药理学与实验验证的甘薯保肝作用机制研究[J]. 中国现代中药, 2023, 25(5): 1044-1055.
- [7] 祁金丽,梁洁,黄冬芳,等. 基于网络药理学研究荔枝叶的抗炎机制及实验验证[J]. 世界中医药, 2023, 18(8): 1064-1071.
- [8] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 4th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2000: 25-30.
- [9] 庄秀萍,李莉,陈超,等. 白花蛇舌草多糖对异烟肼致肝损伤的影响及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(6): 665-670.
- [10] Panzica-Kelly J M, Zhang C X, Danberry T L, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(5): 382-395.
- [11] 中国农业大学, 青岛农业大学. 百蕊草素 I 在制备治疗全身重症脓毒症药物中的用途: CN110859848A[P/OL]. 2020-03-06. <http://epub.cnipa.gov.cn/patent/CN110859848A>.
- [12] 李阳,冯心池. 蒙花苷及其代谢产物对大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2039-2043.
- [13] 王桐. 蒙花苷对2型糖尿病肝损伤炎症反应和氧化应激的保护作用及其机制的初步研究[D]. 重庆:中国人民解放军陆军军医大学, 2022: 73.
- [14] Chen M, Liu G W, Fang Z Y, et al. Buddleioside alleviates nonalcoholic steatohepatitis by targeting the AMPK-TFEB signaling pathway[J]. Autophagy, 2025, 21(6): 1316-1334.
- [15] Hoofnagle J H, Björnsson E S. Drug-induced liver injury: types and phenotypes[J]. N Engl J Med, 2019, 381(3): 264-273.
- [16] Tavares B, Santos Lopes S. The importance of zebrafish in biomedical research[J]. Acta Med Port, 2013, 26(5): 583-592.
- [17] Zhang R L, He J, Wang X, et al. Report of the fifth zebrafish research conference of China[J]. Zebrafish, 2019, 16(1): 128-134.
- [18] Wang C, Che K, Zhang G L, et al. Integrating metabolomics and machine learning to analyze chemical markers and ecological regulatory mechanisms of geographical differentiation in *Thesium chinense* Turcz. [J]. Metabolites, 2025, 15(7): 423.
- [19] Zhang F, Zhang G L, Wang C, et al. Geographical variation in metabolite profiles and bioactivity of *Thesium chinense* Turcz. revealed by UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics[J]. Front Plant Sci, 2024, 15: 1471729.
- [20] Ding A P, Wang R F, Liu J, et al. Exploring information exchange between *Thesium chinense* and its host *Prunella vulgaris* through joint transcriptomic and metabolomic analysis[J]. Plants (Basel), 2024, 13(6): 804.
- [21] Lu Y H, Huang J H, Li Y C, et al. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times[J]. Food Chem, 2015, 183: 91-100.

(收稿日期:2026-04-13 修回日期:2026-09-18)

(本文责编:林 静)