

● 实验研究 ●

引用:曾秀芳,谭梅英.地黄活血汤调控IL-6表达治疗子宫平滑肌瘤活性成分的筛选和测定[J].湖南中医杂志,2020,36(6):129-132.

地黄活血汤调控IL-6表达 治疗子宫平滑肌瘤活性成分的筛选和测定

曾秀芳¹,谭梅英²

(1. 佛山市南海区第九人民医院,广东 佛山,528203;

2. 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院),广东 广州,510095)

[摘要] 目的:筛选并准确测定地黄活血汤调控白细胞介素(IL)-6表达治疗子宫平滑肌瘤的活性成分,作为其基于功效的质量评价指标。方法:活性筛选采用酶联免疫吸附(ELISA)法,分别加入地黄活血汤中所含各成分单体,测定其对IL-6表达的影响,将产生显著影响者列入候选;以上述候选成分为指标,进行高效液相色谱法(HPLC)含量测定研究,使用Waters Xbridge C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈-0.2%磷酸为流动相,梯度洗脱,流速1.0 ml/min,检测波长254 nm,柱温30℃,进样量10 μl;选择毛蕊花糖苷、木通皂苷D为指标性成分,共测定10批药材制备的供试品溶液。结果:ELISA法检测出毛蕊花糖苷、木通皂苷D、川续断皂苷乙、表儿茶素、芍药苷具有较为显著的IL-6表达调控活性;含量测定结果表明,毛蕊花糖苷、木通皂苷D在地黄活血汤中含量分别为0.0370~0.0534 mg/ml和0.0419~0.0590 mg/ml。结论:地黄活血汤中的毛蕊花糖苷、木通皂苷D能体外抑制IL-6的表达,建议列为该方基于功效主治的质量控制指标成分。

[关键词] 地黄活血汤;子宫平滑肌瘤;IL-6;毛蕊花糖苷;木通皂苷D;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.06.054

Screening and determination of the active components of Dihuang Huoxue decoction for the treatment of leiomyoma of the uterus by regulating the expression of interleukin - 6

ZENG Xiufang¹, TAN Meiyang²

(1. The Ninth People's Hospital of Nanhai District, Foshan 528203, Guangdong, China;

2. Guangdong Second Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital &

Guangdong Research Institute of Traditional

Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To screen out and measure the active components of Dihuang Huoxue decoction for the treatment of leiomyoma of uterus by regulating the expression of interleukin - 6 (IL - 6), as function - based quality assessment indices. Methods: ELISA was used to screen out the active components, and each component of Dihuang Huoxue decoction was added to observe their influence on the expression of IL - 6, among which the components with marked influence were included as candidates. To measure the content of these candidate components, high - performance liquid chromatography was performed on a Waters Xbridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile - 0.2% phosphoric acid for gradient elution, at a flow rate of 1.0 ml/min, a detection wavelength of 254 nm, a column temperature of 30℃, and a sample size of 10 μl. Verbascoside and akebia saponin D were selected as index components, and the test article solutions of 10 batches of medicinal material were measured. Results: ELISA showed that verbascoside, akebia saponin D, dipsacoside B, epicatechin, and

基金项目:广东省中医药局项目(2016017)

第一作者:曾秀芳,女,主管中药师,研究方向:中药制剂

paeoniflorin had a marked effect in regulating the expression of IL - 6. The results of content determination showed that the content of verbascoside and akebia saponin D in Dihuang Huoxue decoction were 0. 0370 ~ 0. 0534 mg/mL and 0. 0419 ~ 0. 0590 mg/mL, respectively. Conclusion: Verbascoside and akebia saponin D in Dihuang Huoxue decoction can inhibit the expression of IL - 6 in vitro and are recommended to be included as function - based quality assessment indices.

[**Keywords**] Dihuang Huoxue decoction; leiomyoma of the uterus; interleukin - 6; verbascoside; akebia saponin D; experimental study

子宫平滑肌瘤,或称子宫肌瘤,是较为常见的女性生殖系统良性肿瘤。该病的临床症状不明显,发病机制尚未明确。研究表明,机体的细胞介素(IL-6)水平能够较为准确地表征子宫肌瘤的产生、发展和治疗^[1-2]。西医多采用激素调节内分泌水平,缩小肿瘤体积,或采用手术切除,但均不同程度存在易复发、毒副作用大、不能根治或长期抑制等弊端^[3-4]。中医药治疗子宫平滑肌瘤,多采用活血补血、滋阴通络等治法^[5-6]。地黄活血汤为笔者治疗该疾病的临床验方,方中包括君药熟地黄在内的多味药材均具有较好的抗肿瘤活性作用,且药味中多种成分均能对IL-6表达起到显著的调控作用^[7]。本研究从筛选方中各成分入手,通过比较其IL-6调控活性,并建立基于功效主治的多成分含量同时测定方法^[8-11],为研究该方治疗子宫平滑肌瘤的机制和药效物质提供科学依据。

1 实验材料

1.1 药物和试剂 ELISA 活性筛选所用试剂盒购自 DPC 公司(美国);毛蕊花糖苷(批号:111530 - 201713)、木通皂苷 D(批号:111685 - 201707)、川续断皂苷乙(批号:111813 - 201804)、儿茶素(批号:110877 - 201604)、表儿茶素(批号:110878 - 201703)、芍药苷(批号:110736 - 201943)、白术内酯 I(批号:111975 - 201501)、白术内酯 II(批号:111976 - 201501)、白术内酯 III(批号:111978 - 201501)。对照品均购自中国食品药品检定研究院;活性测

定和色谱分析用乙腈、DMSO、磷酸等试剂为色谱纯,购自 Sigma - Alderich(德国);供试品制备用乙醇为分析纯,购自广州化学试剂厂;实验用水购自 Watsons(中国);制备地黄活血汤用药材(地黄 20 g、续断 15 g、鸡血藤 30 g、白芍 15 g、鳖甲 20 g、浙贝母 15 g、三棱 15 g、牛膝 20 g、夏枯草 20 g、泽泻 10 g、白术 20 g、五指毛桃 30 g、牡蛎 20 g、地骨皮 15 g)购自广东康美药业股份有限公司。

1.2 仪器 Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配备 DAD 检测器,自动进样器和柱温箱;Mettler - Toledo 精密分析天平(瑞士 Mettler - Toledo 公司);QS2000 数显自动超声清洗仪(昆山超声仪器厂)。

2 实验方法

2.1 地黄活血汤活性成分筛选 取“1.1”项下所述各化合物单体,溶于二甲基亚砜(DMSO)后分别制成 12.5、25、50 μm/L 的溶液,记为低、中、高 3 个浓度,分别注入含大鼠肿瘤组织细胞的 96 孔板中,每个成分每个浓度注入 3 孔。按酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒所载方法处理后,测定 IL-6 表达。结果显示,毛蕊花糖苷、木通皂苷 D、川续断皂苷乙、表儿茶素、芍药苷具有较为显著的 IL-6 表达调控活性,故选为候选成分继续考察;儿茶素、白术内酯 II、白术内酯 III 对表达的影响不明显,故不列入候选成分。(见图 1)

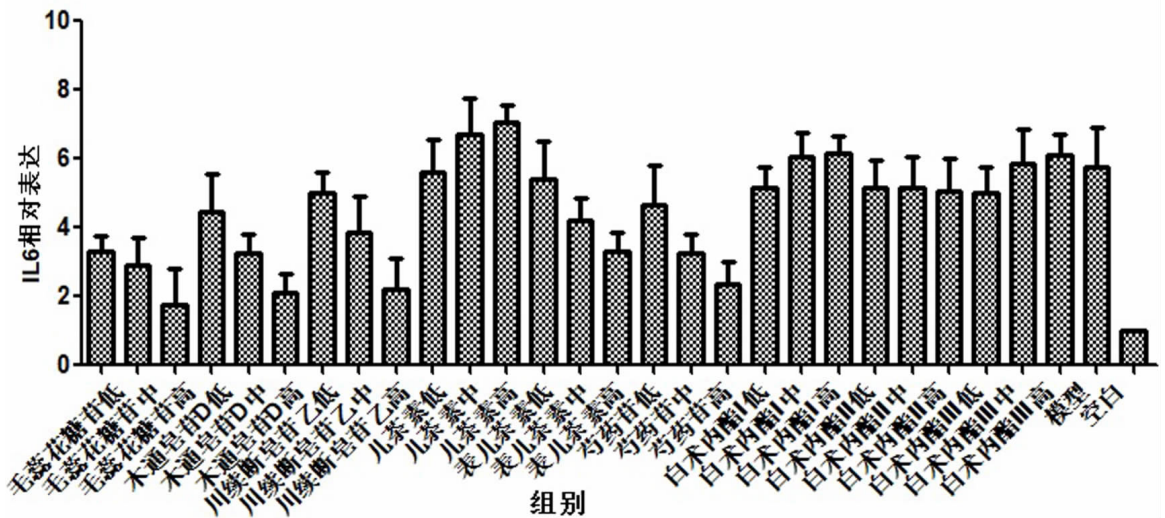


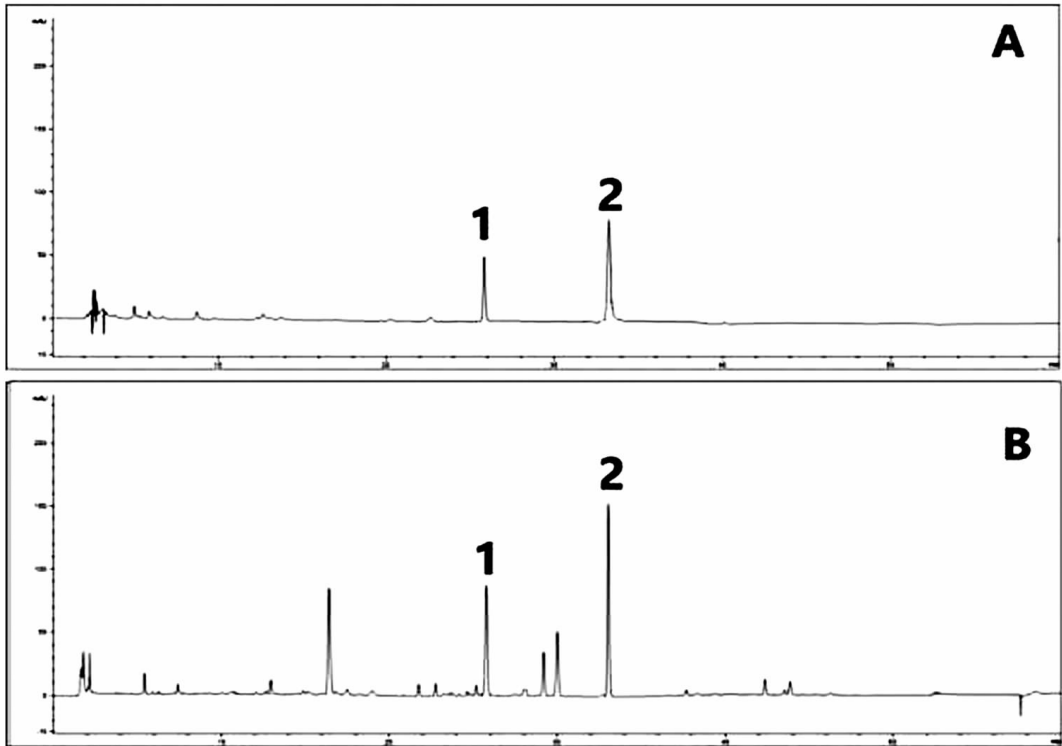
图 1 不同化合物 IL - 6 表达调控活性筛选结果 (n = 3)

2.2 含量测定对照品溶液的制备 预实验结果显示,在地黄活血汤供试品色谱图中,川续断皂苷乙、表儿茶素、芍药苷色谱峰不明显(结果略),故不列为含量测定指标成分。取毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 适量,精密称定,置于同一 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得每毫升中两种成分含量均为 1 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取处方量药材,加 20 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,所得水煎液滤过,滤液浓缩至约 100 ml,取浓缩液,置于 200 ml 量瓶中,加水稀释并定容至刻度;取所得

溶液 20 ml,蒸干后加乙醇 20 ml 使溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 HPLC 条件 使用 Waters Xbridge C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),乙腈(A) - 0.2% 磷酸(B)为流动相,梯度洗脱,程序按下述条件设置:0 ~ 10 min, 5 ~ 5% A; 10 ~ 30 min, 5 ~ 30% A; 30 ~ 55 min, 30 ~ 50% A; 55 ~ 60 min, 50 ~ 5% A; 流速 1.0 ml/min, 检测波长 254 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μl ; 所得供试品和对照品色谱图见图 2。



注:A—对照品(浓度均为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),B—供试品;峰 1—毛蕊花糖苷,峰 2—木通皂苷 D。

图 2 色谱图

2.5 含量测定方法学考察

2.5.1 线性关系考察 取对照品溶液适量,分别置于不同 5 ml 量瓶中,加醇稀释并定容至刻度,即得毛蕊花糖苷和木通皂苷 D 浓度分别为 10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液。吸取上述溶液,按“2.4”项下 HPLC 条件进行测定,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,代入 Excel 中,以浓度为横坐标 x,峰面积为纵坐标 y,进行线性回归。计算得毛蕊花糖苷的回归方程为 $y = 1.2647x + 2.6724$ ($r = 0.9997$),木通皂苷 D 的回归方程为 $y = 2.5187x - 11.988$ ($r = 0.9998$)。上述结果表明,方法线性关系良好,能够在 10 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内对毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 进行准确测定。

2.5.2 精密度考察 取供试品溶液,按“2.4”项下 HPLC 条件连续测定 6 次,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,计算峰面积的 RSD。结果显示,二者峰面积的 RSD 分别为 1.49% 和 1.57%,上述结果均符合《中华人民共和国药

典》规定,表明方法精密度良好。

2.5.3 加样回收率试验 取相当于半数处方量的药材,另加入对照品溶液适量(最终供试品溶液浓度见表 1、2),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4”项下 HPLC 条件测定,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,计算二者含量、回收率和回收率的 RSD。结果显示,毛蕊花糖苷的回收率为 99.23%,RSD 为 2.74%;木通皂苷 D 的回收率为 100.67%,RSD 为 2.54%(见表 1、2)。上述结果均符合《中华人民共和国药典》规定,表明方法准确度良好。

2.5.4 稳定性试验 取供试品溶液,置于室温下,分别在 0、2、4、6、8、12 h 时按“2.4”项下 HPLC 条件测定,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,计算二者的含量以及含量的 RSD。结果显示,二者含量的 RSD 分别为 2.37% 和 1.72%,均符合《中华人民共和国药典》规定,表明本研究所制备供试品溶液在 12 h 内稳定。

表1 毛蕊花糖苷加样回收率测定结果($n=3$)

	含有量 (mg/ml)	加入量 (mg/ml)	测得量 (mg/ml)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
L-1	0.0237	0.0119	0.0351	96.37		
L-2	0.0237	0.0119	0.0357	101.38		
L-3	0.0237	0.0119	0.0354	98.97		
M-1	0.0237	0.0237	0.0468	97.31		
M-2	0.0237	0.0237	0.0466	96.74	99.23	2.74
M-3	0.0237	0.0237	0.0477	101.44		
H-1	0.0237	0.0356	0.0609	104.62		
H-2	0.0237	0.0356	0.0587	98.44		
H-3	0.0237	0.0356	0.0585	97.82		

表2 木通皂苷D加样回收率测定结果($n=3$)

	含有量 (mg/ml)	加入量 (mg/ml)	测得量 (mg/ml)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
L-1	0.0262	0.0131	0.0398	103.45		
L-2	0.0262	0.0131	0.0396	102.29		
L-3	0.0262	0.0131	0.0394	100.72		
M-1	0.0262	0.0262	0.0531	102.67		
M-2	0.0262	0.0262	0.0529	101.86	100.67	2.54
M-3	0.0262	0.0262	0.0522	99.39		
H-1	0.0262	0.0393	0.0650	98.61		
H-2	0.0262	0.0393	0.0636	95.24		
H-3	0.0262	0.0393	0.0662	101.81		

2.5.5 重复性试验 取同一批次药材,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4”项下 HPLC 条件测定,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,计算二者的含量以及含量的 RSD。结果显示,二者含量的 RSD 分别为 2.75% 和 0.95%,均符合《中华人民共和国药典》规定,表明方法重复性良好。

2.6 含量测定 取不同批次药材 10 批,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4”项下 HPLC 条件测定,记录毛蕊花糖苷、木通皂苷 D 峰的峰面积,计算二者的含量。二者的含量分别为 0.0370 ~ 0.0534 mg/ml 和 0.0419 ~ 0.0590 mg/ml。(见表 3)

表3 10批样品含量测定结果(mg/ml, $n=2$)

批号	毛蕊花糖苷	木通皂苷 D
DHHX-1	0.0417	0.0530
DHHX-2	0.0370	0.0425
DHHX-3	0.0380	0.0585
DHHX-4	0.0418	0.0522
DHHX-5	0.0484	0.0590
DHHX-6	0.0409	0.0583
DHHX-7	0.0398	0.0419
DHHX-8	0.0532	0.0566
DHHX-9	0.0534	0.0474
DHHX-10	0.0466	0.0468

3 讨论

在本次 IL-6 表达调控活性筛选研究中,笔者采用的 8 个候选成分中有 5 个具有较好的活性,其结果与文献报道基本吻合,可能与上述成分的空间结构同 IL-6 受体三级结构存在较大相似性有关。然而,预实验结果表明,其中川续断皂苷乙、表儿茶素、芍药苷 3 个成分在地黄活血汤的 HPLC 色谱图中并未有明显峰对应,可能与水煎液无法有效提取上述成分,或供试品制备方法尚难以从水煎液中提取上述成分有关。为解决这一问题,可考虑继续深入优化制备和提取分离条件;同时,也可借助 TOF-MS 等仪器设备,继续发掘方中所含化学成分,之后以这些确定在方中存在的成分为基础,扩大活性成分筛选和评价范围,建立指标更为全面、丰富的药学物质基础评价方法。

本研究基于 IL-6 表达结果,筛选出地黄活血汤中多个调控该靶标表达治疗子宫平滑肌瘤的成分,并对其中 2 个在汤剂中有适宜发挥药效含量的成分进行了含量测定研究。该方法贴近功效主治,检测方法快速、准确,能够为建立评价该方药效的可量化标准、研究其功效的机制和物质基础提供研究基础和科学参考。

参考文献

- [1] 李春容. 子宫肌瘤患者宫腔镜术后血清中白细胞介素 6、sCD40L 与治疗效果及预后的关系[J]. 中国卫生检验杂志, 2019,29(12):1431-1433.
- [2] 卢斋,陈华,钟业超. 子宫肌瘤组织信号通路分子及 MMPs、IL-6、IL-10 的表达及临床意义[J]. 海南医学,2017,28(17):2762-2764.
- [3] 赵睿超,罗国臣. 低剂量米非司酮应用于子宫肌瘤的效果及对血清激素水平的影响分析[J]. 四川生理科学杂志,2019,41(4):287-289.
- [4] 李虎,胡丽娜. 子宫肌瘤的非手术治疗进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2019,35(8):872-877.
- [5] 唐洁,熊苏慧,李诗卉. 中药抗子宫肌瘤动物实验研究进展[J]. 湖南中医药大学学报,2019,39(8):1040-1043.
- [6] 索南草,陈剑虹. 桂茯苓汤治疗微小子宫肌瘤临床研究[J]. 陕西中医,2019,40(8):1063-1065,1084.
- [7] 王占利,李坤寅,王帅. 橘荔散结丸对子宫肌瘤模型大鼠血液流变学及血清 IL-6、TNF- α 水平的影响[J]. 中药新药与临床药理,2014,25(3):288-291.
- [8] 邹献亮,陈颖,华腊. 一测多评法同时测定熟地黄中 4 种苯乙醇苷[J]. 中成药,2019,41(5):1085-1090.
- [9] 陈璞,赵华,贺雅琴. 续断 HPLC 特征图谱及 3 种活性成分的含量测定[J]. 中药材,2017,40(6):1373-1376.
- [10] 杜憬生,吴立群,马鸿雁. 一测多评法测定鸡血藤中 4 种黄酮成分含量[J]. 中药材,2017,40(4):881-883.
- [11] 万超,苏慧,霍雨佳. 白芍饮片炒制前后物质基础的变化规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):28-33.

(收稿日期:2019-11-20)