



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109142606 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201810968915.X

(22)申请日 2018.08.23

(71)申请人 广西壮族自治区中医药研究院

地址 530022 广西壮族自治区南宁市青秀区东葛路20-1号

(72)发明人 刘瑛 柴玲 陆国寿 王丽
吕纪华

(74)专利代理机构 南宁市来来专利代理事务所
(普通合伙) 45118

代理人 来光业

(51)Int.Cl.

G01N 30/88(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

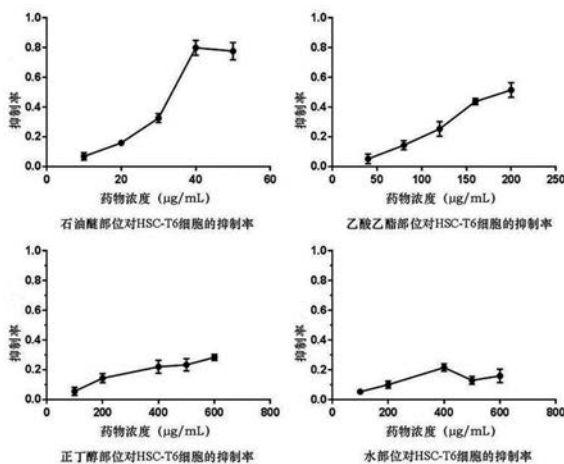
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析

(57)摘要

本发明公开了一种瑶药厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析的方法,本发明是将厚叶南五味子经天然药物化学方法提取得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层共4个溶剂提取物,采用CCK-8法检测不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用、ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响,从中筛选出逆转肝纤维化活性最佳的部位。再利用Western blot检测最佳活性部位处理细胞后磷酸化c-jun氨基端激酶和磷酸化丝裂原活化蛋白激酶的含量;流式细胞术检测细胞凋亡率;GC-MS方法检测活性部位的化学成分。使用本发明的方法可以快速准确地筛选出厚叶南五味子逆转肝纤维化的活性部位并检测出活性部位的化学成分。



1. 厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位体外筛选的方法, 其特征在于, 所述体外筛选过程包括以下步骤:

(1) 厚叶南五味子提取物的制备:

1) 将干燥厚叶南五味子药材粉碎, 用体积浓度为60-80%的乙醇加热回流提取3次, 提取液减压浓缩, 回收溶剂至浸膏, 加适量水混悬;

2) 将上述所得物根据极性依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次, 得到石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液和水层;

3) 将各萃取液及水层分别用旋转蒸发仪回收溶剂, 挥干, 真空干燥, 得到厚叶南五味子的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水部位, 称重备用;

(2) 采用CCK-8法检测厚叶南五味子的不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞, 调整细胞数为 5×10^5 个/mL, 接种于96孔板中, 每孔100 μ L细胞悬液, 培养24h;

2) 只加培养液设立空白对照组, 加含0.5%DMSO的培养液作为溶剂对照组, 设置不同浓度提取部位组: 石油醚部位浓度为: 10、20、30、40、50 μ g/mL, 乙酸乙酯部位浓度为: 40、80、120、160、200 μ g/mL, 正丁醇和水部位的浓度均为: 100、200、400、500、600 μ g/mL;

3) 每个浓度设4个复孔, 继续孵育24h, 每孔加入10 μ L CCK-8溶液, 继续孵育2h;

4) 用酶标仪在450nm处测定各孔吸光度OD值, 计算抑制率及半数抑制浓度IC₅₀, 抑制率的计算公式: 抑制率 = $1 - (\text{实验组OD值} / \text{对照组OD值}) \times 100\%$; 半数抑制浓度IC₅₀由电脑根据图像相关数据计算得到;

5) 确定各部位对HSC-T6X细胞的抑制率等于20%时对应的浓度;

(3) 采用ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞按 2×10^5 接种于24孔板中, 培养24h;

2) 加入含不同浓度提取部位的培养基预处理4h; 其不同浓度提取部位是在小于上述抑制率小于20%所对应的浓度下, 每个提取部位分别设定3-5个浓度值;

3) 各加入200 μ mol/L乙醛继续培养72h;

4) 收集培养上清液, 采用ELISA试剂盒方法检测大鼠I型胶原、III型前胶原氨基端肽、IV型胶原的含量。

2. 根据权利要求1所述厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位体外筛选的方法, 其特征在于, 所述ELISA试剂盒方法是采用固相夹心酶联免疫定量检测技术, 用纯化的抗Col-I、PIIINP、Col-IV捕获抗体包被微孔内壁的表层, 制成固相的载体; 方法包括如下步骤:

(1) 取40 μ L待检测样品, 加入10 μ L样品平衡液, 充分混匀, 于室温下平衡30min;

(2) 在微孔板中按每孔各50 μ L依次加入处理后的待测样品和各个浓度标准品;

(3) 每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记抗体, 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育60min;

(4) 常规法洗孔后每孔依次加入TMB I 50 μ L和TMB II 50 μ L, 充分混匀, 室温下避光反应20min;

(5) 每孔加入终止液50 μ L, 终止反应;

(6) 终止反应后10 min内用酶标仪检测450nm处吸光度值A值, 取复孔均值。

3. 厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的作用机制分析, 其特征在于, 所述作用机制

分析包括以下内容：

(1) 利用Western blot检测磷酸化JNK、p38蛋白表达：

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h，并设置空白对照组；收获处理后的细胞，用RIPA裂解液提取总蛋白、BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度；

2) 取40g总蛋白用12%分离胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳，再将蛋白转印至PVDF膜上，用含5%脱脂奶粉的PBST封闭2.5h后分别用兔抗人磷酸化JNK、p38一抗1:1000稀释液在4℃孵育8-12h，PBST洗涤3次；

3) 用HRP标记的山羊抗兔IgG二抗1:1000稀释液常温孵育2h，PBST洗涤3次；

4) 用ECL发光底物浸泡1min后用ProteinSimple多功能成像分析系统采集图片；

5) 采用Image Pro Plus 6.0软件分析实验结果的灰度值；

(2) 流式细胞术检测细胞凋亡：

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h，并设置空白对照组；

2) 收集上清液和细胞，PBS洗涤2次，将细胞重悬于100μL loading buffer至细胞浓度为 10^6 个/mL；

3) 每管加入5μL Annexin V-FITC和1μL PI，混匀，避光孵育15min，再加入400μL loading buffer混匀，过筛网，得到检测液；

4) 取检测液用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

4. 厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的化学成分分析方法，其特征在于，所述化学成分分析是采用气相-质谱(GC-MS)方法对活性部位进行检测：

(1) 气相色谱-质谱测试条件：色谱柱Agilent HP-5MS (30m×250μm×0.25μm)；气化温度250℃；色谱柱温80-250℃；初始温度60℃，以 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温到230℃，保持3min；进样量0.2μL；分流比30:1；载气高纯He (99.9999%) 速度 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；EI源；电子能量70eV；离子源温度：230℃；四级杆温度：150℃；质量扫描范围m/z 35-400；

(2) 取150μL活性部位浸膏置于带磨口具塞锥形瓶中，依次加入正己烷、0.4mol/L氢氧化钠-甲醇溶液各10mL，室温静置30min后加入10mL水并振荡4min，取上清液即得供试品溶液；

(3) 将供试品溶液注入气相色谱-质谱联用仪，按照气相色谱-质谱测试条件进行测定；得到厚叶南五味子活性部位脂溶性成分的总离子流图，对其进行质谱扫描，所得质谱图通过HPMSD化学工作站NIST11标准质谱数据库检索，鉴定出化学成分，采用峰面积归一化法测定各成分的相对含量。

厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析

技术领域

[0001] 本发明涉及中药研究分析技术领域,具体是厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析的方法。

背景技术

[0002] 厚叶南五味子 *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C.Smith 是木兰科南五味子属植物,别名黑老虎、大钻、冷饭团,通常以藤茎入药,其性温,味辛、微苦,具有行气止痛、祛风活络、散瘀消肿的功效,瑶族民间常用于治疗肝炎、肝纤维化、肝硬化等肝脏疾病。本发明人前期研究也发现厚叶南五味子对四氯化碳、D-氨基半乳糖所致小鼠肝损伤具有明显的保护作用。

[0003] 肝纤维化(Hepatic fibrosis)是临床上常见的一种脏器病理变化,它是指肝脏因各种致病因素侵袭引发损害和炎症反应,修复过程中组织修复失控,导致肝细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)异常增多和过度沉积,最终致肝脏的结构和功能发生异常改变。大量研究表明,肝纤维化是能够逆转并恢复到组织学正常细胞的,有效控制基础疾病和抗肝纤维化治疗对其治疗有重要意义。肝纤维化的发生发展过程中,公认的核心环节是肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)的活化增殖,激活后的HSC是肝脏ECM的主要生成细胞,并可通过一系列机制抑制ECM的降解,因此以抑制HSC活化增殖和促进ECM成分降解为靶标的逆转肝纤维化研究成为近年来的研究热点,这也为肝纤维化的临床防治提供了突破口。

[0004] 至今,厚叶南五味子用于肝纤维化的治疗还只是停留在表面,并没有过多的深入研究。本发明的研究目的就是希望通过体外筛选得出厚叶南五味子逆转肝纤维化作用的最佳活性部位,并分析其作用机制和化学成分,展开厚叶南五味子用于肝纤维化治疗的深入研究。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种瑶药厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析的方法,本发明包括三个部分:厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的作用机制分析、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的化学成分分析。通过本发明可以快速准确地筛选出厚叶南五味子逆转肝纤维化的活性部位并分析其作用机制,检测出活性部位的化学成分。

[0006] 1、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选包括以下内容:

(1)厚叶南五味子提取物的制备:

1)将干燥厚叶南五味子药材粉碎,用体积浓度为60-80%的乙醇加热回流提取3次,提取液减压浓缩,回收溶剂至浸膏,加适量水混悬;

2)将上述所得物根据极性依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,得到石油醚萃

取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液和水层；

3) 将各萃取液及水层分别用旋转蒸发仪回收溶剂，挥干，真空干燥，得到厚叶南五味子的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水部位，称重备用；

(2) 采用CCK-8法检测厚叶南五味子的不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用：

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞，调整细胞数为 5×10^5 个/mL，接种于96孔板中，每孔100 μ L细胞悬液，培养24h；

2) 只加培养液设立空白对照组，加含0.5%DMSO的培养液作为溶剂对照组，设置不同浓度提取部位组：石油醚部位浓度为：10、20、30、40、50 10μ g/mL，乙酸乙酯部位浓度为：40、80、120、160、200 μ g/mL，正丁醇和水部位的浓度均为：100、200、400、500、600 μ g/mL；

3) 每个浓度设4个复孔，继续孵育24h，每孔加入10 μ L CCK-8溶液，继续孵育2h；

4) 用酶标仪在450nm处测定各孔吸光度OD值，计算抑制率及半数抑制浓度IC₅₀，抑制率的计算公式：抑制率 = $1 - (\text{实验组OD值} / \text{对照组OD值}) \times 100\%$ ；半数抑制浓度IC₅₀由电脑根据图像相关数据计算得到；

5) 确定各部位对HSC-T6X细胞的抑制率等于20%时对应的浓度；

(3) 采用ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响：

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞按 2×10^5 接种于24孔板中，培养24h；

2) 加入含不同浓度提取部位的培养基预处理4h；其不同浓度提取部位是在小于上述抑制率小于20%所对应的浓度下，每个提取部位分别设定3-5个浓度值；

3) 各加入200 μ mol/L乙醛继续培养72h；

4) 收集培养上清液，按照ELISA试剂盒方法检测大鼠I型胶原、III型前胶原氨基端肽、IV型胶原的含量；采用SPSS22.0软件进行数据分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单因素方差分析和LSD-t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0007] 所述ELISA试剂盒方法是采用固相夹心酶联免疫定量检测技术，用纯化的抗Col-I、PIIINP、Col-IV捕获抗体包被微孔内壁的表层，制成固相的载体；方法包括如下步骤：

(1) 取40 μ L待检测样品，加入10 μ L样品平衡液，充分混匀，于室温下平衡30min；

(2) 在微孔板中按每孔各50 μ L依次加入处理后的待测样品和各个浓度标准品；

(3) 每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记抗体，充分混匀，37℃孵育60min；

(4) 常规法洗孔后每孔依次加入TMB I 50 μ L和TMB II 50 μ L，充分混匀，室温下避光反应20min；

(5) 每孔加入终止液50 μ L，终止反应；

(6) 终止反应后10 min内用酶标仪检测450nm处吸光度值A值，取复孔均值。

[0008] 2、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的作用机制分析包括以下内容：

(1) 利用Western blot检测磷酸化JNK、p38蛋白表达：

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h，并设置空白对照组；收获处理后的细胞，用RIPA裂解液提取总蛋白、BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度；

2) 取40g总蛋白用12%分离胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳，再将蛋白转印至PVDF膜上，用含5%脱脂奶粉的PBST封闭2.5h后分别用兔抗人磷酸化JNK、p38一抗1:1000稀释液在

4℃孵育8-12h, PBST洗涤3次;

3) 用HRP标记的山羊抗兔IgG二抗1:1000稀释液常温孵育2h, PBST洗涤3次;

4) 用ECL发光底物浸泡1min后用ProteinSimple多功能成像分析系统采集图片;

5) 采用Image Pro Plus 6.0软件分析实验结果的灰度值;

(2) 流式细胞术检测细胞凋亡:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h, 并设置空白对照组;

2) 收集上清液和细胞, PBS洗涤2次, 将细胞重悬于100μL loading buffer至细胞浓度为 10^6 个/mL;

3) 每管加入5μL Annexin V-FITC和1μL PI, 混匀, 避光孵育15min, 再加入400μL loading buffer混匀, 过筛网, 得到检测液;

4) 取检测液用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 采用SPSS22.0软件进行数据分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析和LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

[0009] 3、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的化学成分分析是采用气相-质谱(GC-MS)方法对活性部位进行检测:

(1) 气相色谱-质谱测试条件: 色谱柱Agilent HP-5MS (30m×250μm×0.25μm); 气化温度250℃; 色谱柱温80-250℃; 初始温度60℃, 以2℃·min⁻¹升温到230℃, 保持3min; 进样量0.2μL; 分流比30:1; 载气高纯He(99.9999%)速度1.0 mL·min⁻¹; EI源; 电子能量70eV; 离子源温度: 230℃; 四级杆温度: 150℃; 质量扫描范围m/z 35-400;

(2) 取150μL活性部位浸膏置于带磨口具塞锥形瓶中, 依次加入正己烷、0.4mol/L氢氧化钠-甲醇溶液各10mL, 室温静置30min后加入10mL水并振荡4min, 取上清液即得供试品溶液; (3) 将供试品溶液注入气相色谱-质谱联用仪, 按照气相色谱-质谱测试条件进行测定; 得到厚叶南五味子活性部位脂溶性成分的总离子流图, 对其进行质谱扫描, 所得质谱图通过HPMSD化学工作站NIST11标准质谱数据库检索, 鉴定出化学成分, 采用峰面积归一化法测定各成分的相对含量。

[0010] 本发明的有益效果是:

1、本发明将厚叶南五味子醇提物分为石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层四个部位, 采用CCK-8法检测厚叶南五味子的不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用, 并以ECM成分的抑制活性为检测指标, 采用ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响, 成功筛选出了对肝纤维化逆转活性最强的石油醚部位, 结果表明石油醚部位对HSC-T6细胞具有较强的增殖抑制作用, 并能有效降低细胞外基质主要成分I型胶原、III型前胶原氨基端肽、IV型胶原的含量。

[0011] 2、HSC细胞的活化、增殖和胶原合成功能是通过一定的信号传导通路和一系列细胞信号分子网络共同调节的, 其中细胞丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是其中一个重要的细胞内信号转导通路, c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, p38)作为MAPK家族中的亚族成分, 在炎症、细胞应激、凋亡、周期生长等多种生理病理过程中起了重要作用。JNK和p38是MAPK家族中转导并调控细胞凋亡信号的重要传导通

路,同时JNK和p38通路的活化也参与HSC的活化增殖和肝纤维化。本发明利用Western blot检测磷酸化JNK、p38蛋白表达,流式细胞术检测细胞凋亡;得出结果表明:厚叶南五味子石油醚部位处理细胞后,P-JNK和P-p38的表达明显降低,HSC-T6细胞的凋亡率显著上升。从检测结果得出活性部位的作用机制:厚叶南五味子可能通过抑制JNK和 p38的活性来促进HSC凋亡的发生,从而缓解肝纤维化的程度。

[0012] 3、石油醚部位的主要化学成分为脂溶性强、极性较小的组分,用气质联用法进行化学成分分析和鉴定,灵敏度高、准确性高。本发明通过GC-MS鉴定出了厚叶南五味子石油醚部位中的20种化学成分,其中石竹烯(25.329%)和 δ -杜松烯(13.211%)的含量最高,为该成分与其治疗肝纤维化活性的确切关系的进一步研究提供了科学依据。

[0013] 4、通过本发明可以快速准确地筛选出厚叶南五味子逆转肝纤维化的活性部位并分析其作用机制,检测出活性部位的化学成分。

附图说明

[0014] 1、图1为厚叶南五味子不同溶剂提取物对HSC-T6细胞的增殖抑制作用变化图;

2、图2为Western blot 检测磷酸化JNK、p38在HSC-T6中的表达差异图;图中1表示空白对照组;2表示厚叶南五味子石油醚低剂量组(10 μ g/mL);3表示厚叶南五味子石油醚中剂量组(15 μ g/mL);4表示厚叶南五味子石油醚高剂量组(20 μ g/mL);

3、图3为厚叶南五味子石油醚部位脂溶性成分的总离子流图。

具体实施方式

实施例

[0015] 1、药材与试剂:

(1)厚叶南五味子采自广西金秀瑶族自治县,经广西中医药研究院中药所的黄云峰副研究员鉴定为厚叶南五味子*Kadsura coccinea* (Lem.) A.C.Smith。

[0016] (2)DMEM高糖全培养基、胰蛋白酶(武汉博士德公司,批号06F09A45、04D12B68);

(3)细胞增殖检测试剂盒(Cell Counting Kit-8,CCK-8,批号KN658,日本同仁);

(4)大鼠I型胶原、大鼠III型前胶原氨基端肽、大鼠IV型胶原酶联免疫检测试剂盒(天津安诺瑞康生物技术有限公司,批号395170723、491170723、214170723);

(5)兔抗人P-JNK抗体、兔抗人P-P38抗体(Cell Signaling公司);

(6)山羊抗兔IgG(Abcam公司);Annexin V FITC-PI细胞凋亡检测试剂盒(美国life公司,批号1705909);

(7)其余化学试剂均为国产分析纯。

[0017] 2、仪器:生物安全柜(ESCO AC2-4S1,新加坡);CO₂细胞培养箱(MCO-18AIC,日本松下);多功能酶标仪(Tecan M200,瑞士);多功能成像分析系统(ProteinSimple FluorChem R,美国);流式细胞仪(guava easyCyte HT,美国密理博);气相色谱-质谱联用仪(Agilent7890B-5977,美国);Agilent 7693A自动进样器,MassHunter质谱工作站,NIST 11版质谱图库。

[0018] 3、细胞系:HSC-T6大鼠肝星状细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司,Cat No:

CL-0116。

[0019] 4、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选,包括以下内容:

(1) 厚叶南五味子提取物制备:

1) 将干燥厚叶南五味子药材粉碎,用体积浓度为70%的乙醇加热回流提取3次,提取液减压浓缩,回收溶剂至浸膏,加适量水混悬;

2) 将上述所得物根据极性依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取3次,得到石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液和水层;

3) 将各萃取液及水层分别用旋转蒸发仪回收溶剂,挥干,真空干燥,得到厚叶南五味子的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水部位,称重备用。

[0020] (2) 采用CCK-8法检测厚叶南五味子的不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞,调整细胞数为 5×10^5 个/mL,接种于96孔板中,每孔100 μ L细胞悬液,培养24h;

2) 设立空白对照组(只加培养液)、溶剂对照组(含0.5%DMSO的培养液)及不同浓度提取部位组,不同浓度提取部位组:石油醚部位浓度为:10、20、30、40、50 μ g/mL,乙酸乙酯部位浓度为:40、80、120、160、200 μ g/mL,正丁醇和水部位的浓度均为:100、200、400、500、600 μ g/mL;

3) 每个浓度设4个复孔,继续孵育24h,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,继续孵育2h;

4) 用酶标仪在450nm处测定各孔吸光度OD值,计算抑制率及半数抑制浓度IC₅₀,抑制率的计算公式:抑制率 = $1 - (\text{实验组OD值} / \text{对照组OD值}) \times 100\%$;半数抑制浓度IC₅₀由电脑根据图像相关数据计算得到;

各提取部位对HSC-T6X细胞的抑制率随药物浓度变化的曲线图见图1;结果显示,与其他部位比较,石油醚、乙酸乙酯部位对大鼠肝星状细胞有明显的增殖抑制作用,呈剂量正相关性,石油醚部位的增殖抑制作用强于乙酸乙酯部位,IC₅₀分别为35.73和176.51 μ g/mL。正丁醇部位和水部位IC₅₀均大于1000 μ g/mL,无明显增殖抑制活性;

5) 确定各部位对HSC-T6X细胞的抑制率等于20%时对应的浓度。

[0021] (3) 采用ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞按 2×10^5 接种于24孔板中,培养24h;

2) 加入含不同浓度提取部位的培养基预处理4h;其不同浓度提取部位是在小于上述抑制率小于20%所对应的浓度下,每个提取部位分别设定3个浓度值:石油醚部位浓度为:10、15、20 μ g/mL,乙酸乙酯部位浓度为:25、50、100 μ g/mL,正丁醇和水部位的浓度均为:125、250、500 μ g/mL;

3) 加入200 μ mol/L乙醛(建立诱导HSC-T6细胞释放细胞因子模型),继续培养72h;

4) 收集培养上清液,按照ELISA试剂盒方法检测大鼠I型胶原、III型前胶原氨基端肽、IV型胶原的含量。

[0022] 所述ELISA试剂盒方法是采用固相夹心酶联免疫定量检测技术,用纯化的抗Col-I、PIIINP、Col-IV捕获抗体包被微孔内壁的表层,制成固相的载体;包括以下步骤:

a、取40 μ L待检测样品,加入10 μ L样品平衡液,充分混匀,于室温下平衡30min;

b、在微孔板中按每孔各50 μ L依次加入处理后的待测样品和各个浓度标准品;

- c、每孔加入100μL辣根过氧化物酶标记抗体,充分混匀,37℃孵育60min;
 d、常法洗孔后每孔依次加入TMB I 50μL和TMB II 50μL,充分混匀,室温下避光反应20min;
 e、每孔加入终止液50μL,终止反应;
 f、终止反应后10 min内用酶标仪检测450nm处吸光度值A值,取复孔均值。

[0023] 采用SPSS22.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;结果见表1。

表1 厚叶南五味子不同溶剂提取物对 HSC-T6 细胞外基质的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

分组	剂量	Col-I	PIIINP	Col-IV
	/μg·ml ⁻¹	/ng·ml ⁻¹	/pg·ml ⁻¹	/ng·ml ⁻¹
空白对照组	—	246.11±42.73	10.86±0.87	71.35±5.26
石油醚部位	10	240.36±38.12	11.12±0.63	70.46±5.01
	15	181.71±39.37*	10.03±0.57	65.19±4.46*
	20	158.44±31.64**	8.19±0.66**	56.49±5.13**
乙酸乙酯部位	25	248.15±36.57	10.66±0.82	72.19±6.03
	50	226.79±40.18	10.15±0.53	70.35±5.22
	100	195.26±28.71	9.87±0.64	67.28±5.19
正丁醇部位	125	250.14±39.16	11.26±0.57	71.29±4.52
	250	248.36±40.24	10.59±0.42	70.18±6.31
	500	245.27±36.71	10.38±0.68	70.11±6.02
水部位	125	245.39±40.16	10.98±0.48	72.45±5.91
	250	241.74±35.29	10.66±0.55	71.05±6.27
	500	241.33±40.75	10.23±0.71	70.68±5.68

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

[0024] 从表1可见,与空白对照组比较,石油醚部位高剂量组Col-I、PIIINP、Col-IV含量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。乙酸乙酯部位高剂量组Col-I、PIIINP、Col-IV含量有降低的趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。正丁醇部位和水部位各剂量组Col-I、PIIINP、Col-IV含量无明显变化($P > 0.05$)。

[0025] 5、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的作用机制分析,包括以下内容:

(1) 利用Western blot检测磷酸化JNK、p38蛋白表达:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h,并设置空白对照组;收获处理后的细胞,用RIPA裂解液提取总蛋白、BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度;

2) 取40g总蛋白用12%分离胶和5%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,再将蛋白转印至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的PBST封闭2.5h后分别用兔抗人磷酸化JNK、p38 (按1:1000稀释)一

抗稀释液在4℃孵育12h,PBST洗涤3次;

3) 用HRP标记的山羊抗兔IgG (按1:1000稀释) 二抗稀释液常温孵育2h,PBST洗涤3次;

4) 用ECL发光底物浸泡1min后用ProteinSimple多功能成像分析系统采集图片;

5) 采用Image Pro Plus 6.0软件分析实验结果的灰度值。

[0026] Western blot 检测磷酸化JNK、p38在HSC-T6中的表达差异图见图2,结果显示,在内参GAPDH条带亮度一致的情况下,厚叶南五味子石油醚部位低剂量处理细胞后,P-JNK和P-P38蛋白条带的灰度值与空白对照组比较无明显变化($P>0.05$)。中剂量、高剂量厚叶南五味子石油醚部位处理细胞后,P-JNK和P-P38蛋白的表达量明显低于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

[0027] (2) 流式细胞术检测细胞凋亡:

1) 取对数生长期的HSC-T6细胞分别加入含低、中、高浓度活性部位的培养基培养24h,并设置空白对照组;

2) 收集上清液和细胞,PBS洗涤2次,将细胞重悬于100 μ L loading buffer至细胞浓度为 10^6 个/mL;

3) 每管加入5 μ L Annexin V-FITC和1 μ L PI,混匀,避光孵育15min,加入400 μ L loading buffer混匀,过筛网,得到检测液;

4) 取检测液用流式细胞仪检测细胞凋亡率,采用SPSS22.0软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和LSD-t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义;结果见表2。

表2 厚叶南五味子石油醚部位对 HSC-T6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

分组	浓度 μ g/mL	凋亡率 (%)
空白对照组	—	3.35 $\pm$ 0.32
石油醚部位低剂量组	10	3.23 $\pm$ 0.64
石油醚部位中剂量组	15	7.18 $\pm$ 0.41*
石油醚部位高剂量组	20	16.27 $\pm$ 0.18**

[0028] 表2结果显示,与空白对照组比较,厚叶南五味子石油醚部位中、高剂量组的细胞凋亡率显著增大,差异有统计学意义($P<0.01$)。提示厚叶南五味子石油醚部位能诱导HSC-T6细胞凋亡,且呈剂量依赖性。

[0029] 6、厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的化学成分分析是采用气相-质谱(GC-MS)方法对活性部位进行检测:

(1) 气相色谱-质谱测试条件:色谱柱Agilent HP-5MS (30m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m);气化温度250℃;色谱柱温80-250℃;初始温度60℃,以2℃ $\cdot$ min⁻¹升温到230℃,保持3min,;进样量0.2 μ l;分流比30:1;载气高纯He(99.9999%)速度1.0 mL $\cdot$ min⁻¹;EI源;电子能量70eV;离子源温度:230℃;四级杆温度:150℃;质量扫描范围m/z 35-400;

(2) 取150 μ L活性部位浸膏置于带磨口具塞锥形瓶中,依次加入正己烷、0.4mol/L氢氧化钠-甲醇溶液各10mL,室温静置30min后加入10mL水并振荡4min,取上清液即得供试品溶液;(3) 将供试品溶液注入气相色谱-质谱联用仪,按照气相色谱-质谱测试条件进行测定;

厚叶南五味子石油醚部位脂溶性成分的总离子流图见图3。由图3可见,共分离出27个色谱峰,对其进行质谱扫描,所得质谱图通过HPMSD化学工作站NIST11标准质谱数据库检索,鉴定出20种化学成分,采用峰面积归一化法测定各成分的相对含量,结果见表3。由表3可知,厚叶南五味子石油醚部位中石竹烯(25.329%)、 δ -杜松烯(13.211%)、 β -石竹烯(10.076%)等物质含量较高。

表3 厚叶南五味子石油醚部位脂溶性成分的GC-MS分析结果

序号	时间 /min	化合物	分子式	相对分子量	相对含量 /%
1	22.808	(-)- α -可巴烯	C ₁₅ H ₂₄	204	4.297
2	29.579	石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	25.329
3	33.954	律草烯	C ₁₅ H ₂₄	204	3.888
4	37.545	(-)- α -芹子烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.368
5	38.259	β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	10.076
6	38.513	γ -芹子烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.233
7	38.830	(+)- β -雪松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.848
8	39.481	(+)-花侧柏烯	C ₁₅ H ₂₂	202	3.609
9	40.356	α -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.005
10	40.501	γ -杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	4.473
11	41.533	δ -杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	13.211
12	42.895	α -白菖考烯	C ₁₅ H ₂₀	200	0.87
13	43.196	(+)- α -依兰油烯	C ₁₅ H ₂₄	204	0.957
14	43.534	花侧柏烯	C ₁₅ H ₂₂	202	0.796
15	44.794	顺式-依兰-3,5-二烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.747
16	45.727	γ -雪松烯	C ₁₅ H ₂₄	204	1.182
17	49.190	1,6-二甲基-4-异丙基六氢萘	C ₁₅ H ₂₄	204	2.142
18	50.151	γ -依兰油烯	C ₁₅ H ₂₄	204	3.876
19	51.456	双环[4.4.0]癸-1-烯, 2-异丙基-5-甲基-9-亚甲基-	C ₁₅ H ₂₄	204	1.459
20	57.938	8-异丙烯基-1,3,3,7-四甲基-双环[5.1.0]辛-5-烯-2-酮	C ₁₅ H ₂₂ O	218	3.984

[0030] 本实施例结果表明：厚叶南五味子石油醚部位对HSC-T6细胞的增殖抑制作用最强， IC_{50} 为35.73 μ g/mL；进一步筛选显示石油醚部位可以显著降低细胞外基质成分I型胶原(Co1-I)、III型前胶原氨基端肽(PIIINP)、IV型胶原(Co1-IV)的表达；厚叶南五味子石油醚部位作用后，HSC-T6细胞磷酸化JNK、p38蛋白表达量较空白对照组明显降低($P<0.01$)，细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)；从厚叶南五味子石油醚部位中分离出27个成分，并鉴定出其中20个成分，主要成分为石竹烯(25.329%)、 δ -杜松烯(13.211%)和 β -石竹烯(10.076%)。从本实施例结果可以得出以下结论：厚叶南五味子石油醚部位具有较好的逆转肝纤维化活性，作用机制与其抑制磷酸化JNK、P38表达及诱导细胞凋亡有关，石竹烯、 δ -杜松烯及 β -石竹烯可能是其发挥逆转肝纤维化作用的物质基础。

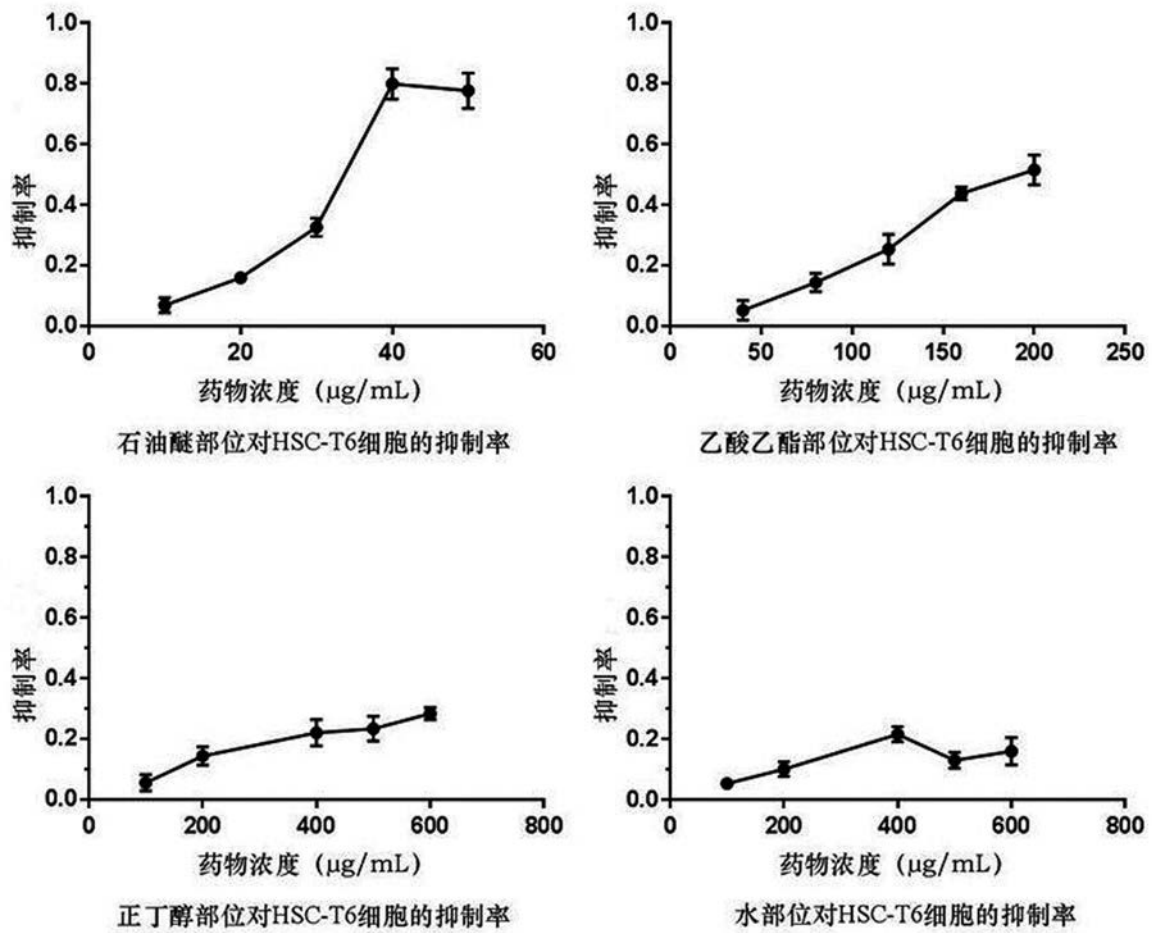


图1

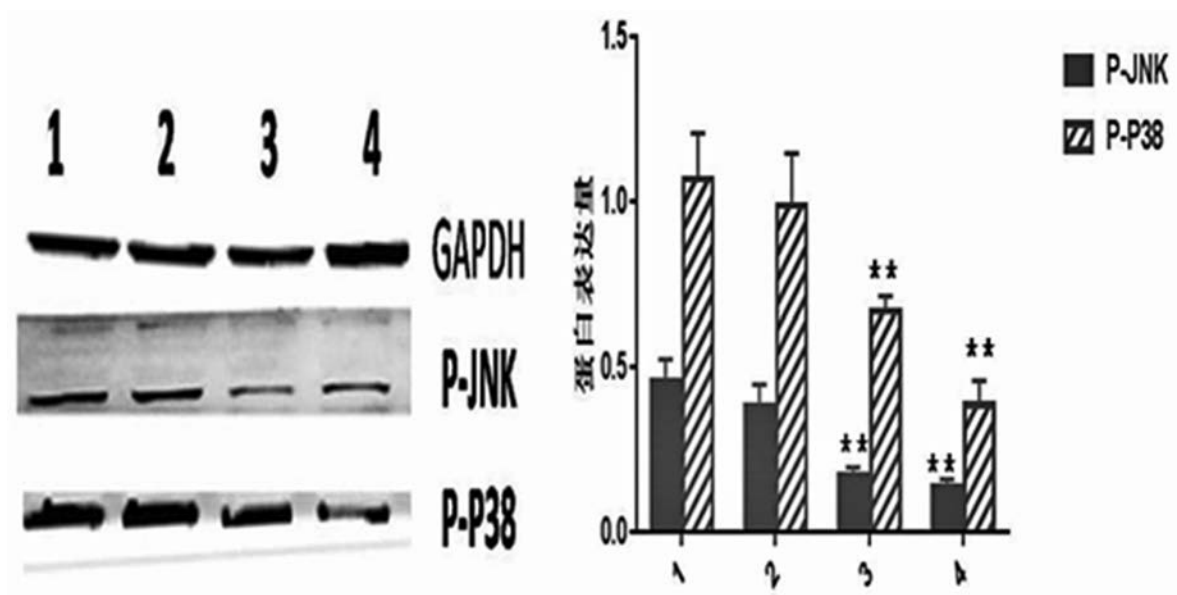


图2

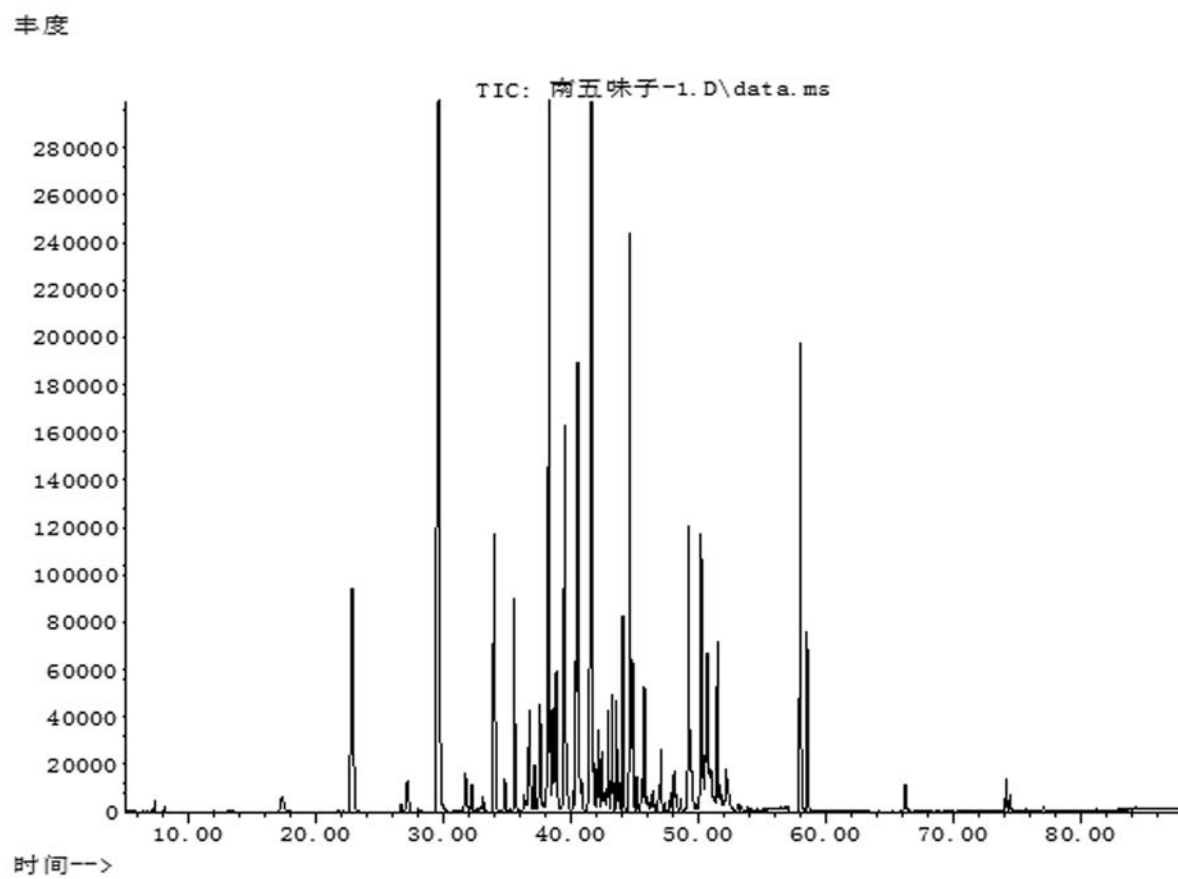


图3

专利名称(译)	厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析		
公开(公告)号	CN109142606A	公开(公告)日	2019-01-04
申请号	CN201810968915.X	申请日	2018-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区中医药研究院		
申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区中医药研究院		
当前申请(专利权)人(译)	广西壮族自治区中医药研究院		
[标]发明人	刘瑛 柴玲 陆国寿 王丽 吕纪华		
发明人	刘瑛 柴玲 陆国寿 王丽 吕纪华		
IPC分类号	G01N30/88 G01N15/14 G01N33/535		
CPC分类号	G01N15/14 G01N30/88 G01N33/535		
代理人(译)	来光业		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种瑶药厚叶南五味子逆转肝纤维化活性部位的体外筛选及其化学成分分析的方法，本发明是将厚叶南五味子经天然药物化学方法提取得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水层共4个溶剂提取物，采用CCK-8法检测不同溶剂提取物对大鼠肝星状细胞HSC-T6的增殖作用、ELISA法检测不同溶剂提取物对细胞外基质成分的影响，从中筛选出逆转肝纤维化活性最佳的部位。再利用Western blot检测最佳活性部位处理细胞后磷酸化c-jun氨基端激酶和磷酸化丝裂原活化蛋白激酶的含量；流式细胞术检测细胞凋亡率；GC-MS方法检测活性部位的化学成分。使用本发明的方法可以快速准确地筛选出厚叶南五味子逆转肝纤维化的活性部位并检测出活性部位的化学成分。

