

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.24.017

续断离子液体提取物质量和药效学评价*

胡献跃, 黄东伟, 陈笑笑, 刁银军

(金华职业技术学院, 浙江 金华 321016)

摘要:目的 建立续断离子液体提取物质量和药效学的评价方法。方法 采用紫外分光光度法测定续断离子液体提取物和续断壮骨胶囊中总皂苷的含量,采用桨法测定续断皂苷VI的溶出率,采用液相色谱-质谱法测定各成分的含量。以二甲基亚砜为空白对照,通过成骨细胞 MC3T3-E1 及破骨细胞 RAW264.7 生长影响,MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶(ALP)活性影响、RAW264.7 细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(StrACP)活力影响等体外细胞试验,评价 1.65~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 续断离子液体提取物的药效。结果 续断离子液体提取物中总皂苷含量和续断皂苷VI溶出率分别为 86.01% 和 77.83%,均高于续断壮骨胶囊的 78.74% 和 25.61%。与空白对照组比较,质量浓度为 6.25~100.00 $\mu\text{g/mL}$ 的续断离子液体提取物可显著促进 MC3T3-E1 细胞的生长,质量浓度为 12.50~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的续断离子液体提取物可显著抑制 RAW264.7 细胞的生长和 StrACP 酶活力的表达($P<0.05$),且呈浓度依赖关系;质量浓度为 6.25~200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的离子液体提取物虽可提高 MC3T3-E1 细胞 ALP 的活性,但差异不显著($P>0.05$)。结论 续断离子液体提取物的质量优于续断壮骨胶囊,具有促进成骨细胞 MC3T3-E1 生长和抑制破骨细胞 RAW264.7 活性的双向作用。

关键词:续断;离子液体提取物;成骨细胞;破骨细胞;体外细胞试验;质量评价;药效学

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)24-0064-05

Quality and Pharmacodynamics Evaluation of Dipsaci Radix Ionic Liquid Extract

HU Xianyue, HUANG Dongwei, CHEN Xiaoxiao, DIAO Yinjun

(Jinhua Polytechnic, Jinhua, Zhejiang, China 321016)

Abstract: Objective To establish a method for evaluating the quality and pharmacodynamics of Dipsaci Radix ionic liquid extract. **Methods** The content of total saponins in Dipsaci Radix ionic liquid extract and Xuduan Zhuanggu Capsules was determined by UV spectrophotometry, the dissolution rate of asperosaponin VI was determined by paddle method, and the content of each component was determined by liquid chromatography-mass spectrometry(LC-MS). Taking the dimethyl sulfoxide as blank control, the growth test of osteoblast MC3T3-E1 cells and osteoclast RAW264.7 cells, alkaline phosphatase (ALP) activity test of MC3T3-E1 cells and tartrate resistant phosphatase (StrACP) activity test of RAW264.7 cells were carried out to evaluate the efficacy of 1.65-200.00 $\mu\text{g/mL}$ of Dipsaci Radix ionic liquid extract. **Results** The content of total saponins and the dissolution rate of asperosaponin VI in Dipsaci Radix ionic liquid extract were 86.01% and 77.83% respectively, which were higher than 78.74% and 25.61% in Xuduan Zhuanggu Capsules. Compared with those in the blank control group, the Dipsaci Radix ionic liquid extract with mass concentration of 6.25-100.00 $\mu\text{g/mL}$ could significantly promote the growth of MC3T3-E1 cells, and the Dipsaci Radix ionic liquid extract with mass con-

*基金项目:浙江省金华市科技计划项目[2018-4-104]。

第一作者:胡献跃,男,硕士,高级工程师,研究方向为药物制剂,(电话)0579-82264089(电子信箱)617144485@qq.com。

- [11] ASTRY B, VENKATESHA SH, MOUDGIL KD. Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis[J]. Cytokine, 2015, 74(1):54-61.
- [12] EGEBERG A, GISONDI P, CARRASCOSA JM, et al. The role of the interleukin-23/Th17 pathway in cardiometabolic comorbidity associated with psoriasis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020, 34(8):1695-1706.
- [13] MATHUR AN, ZIRAK B, BOOTHBY IC, et al. Treg cell control of a CXCL5-IL-17 Inflammatory Axis Promotes Hair Follicle Stem Cell Differentiation into Epithelial Cells for Skin Barrier Repair[J]. Immunity, 2019, 50(3):655-667.
- [14] QU T, MEI CC, ZENG YJ, et al. Correlation analysis of Treg/Th17 cells and related cytokines in patients with psoriasis vulgaris[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(5):700-706.
- [15] CASTRO G, LIU XJ, NGO K, et al. ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells[J]. PLoS One, 2017, 12(8):e0181868.
- [16] 李东海, 齐庆, 李勇. 银屑病与外风相关性探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(12):1320-1321.
- [17] 原丽琼. 从血分与风邪辨证治疗寻常型银屑病[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(30):3290-3291.
- [18] 张同梅, 王刚. 银屑病动物模型研究进展[J]. 实用皮肤病学杂志, 2018, 11(5):292-296.
- [19] LI JQ, ZHANG SH, TONG RS, et al. Curcuma's extraction attenuates propranolol-induced psoriasis like in mice by inhibition of keratin, proliferating cell nuclear antigen and toll-like receptor expression[J]. Pak J Pharm Sci, 2020, 33(3):1033-1048.
- [20] KURIHARA K, FUJIYAMA T, PHADUNGSAKSAWASDI P, et al. Significance of IL-17A-producing CD8 $^{+}$ CD103 $^{+}$ skin resident memory T cells in psoriasis lesion and their possible relationship to clinical course[J]. J Dermatol Sci, 2019, 95(1):21-27.

(收稿日期:2021-01-19;修回日期:2021-05-28)

centration of 12.50–200.00 $\mu\text{g/mL}$ could significantly inhibit the growth of RAW264.7 cells and the activity of StrACP ($P < 0.05$), and showed a concentration dependent relationship. The Dipsaci Radix ionic liquid extract with mass concentration of 6.25–200.00 $\mu\text{g/mL}$ could improve the activity of ALP in MC3T3–E1 cells, but there was no significant difference compared with those in the blank control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The quality of the total saponins from Dipsaci Radix ionic liquid extract is better than that from Xuduan Zhuanggu Capsules, which can promote the growth of osteoblast MC3T3–E1 cells and inhibit the activity of osteoclast RAW264.7 cells.

Key words: Dipsaci Radix; ionic liquid extract; osteoblasts; osteoclasts; *in vitro* cell test; quality evaluation; pharmacodynamics

历代本草将续断列为强筋骨、续折伤良药,其有效成分续断皂苷可诱导大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)向成骨细胞分化和矿化^[1],促进骨形成蛋白2(BMP-2)表达的同时,明显增高其下游关键磷酸化蛋白 SMAD1/5/8, P38, ERK1/2 的表达量^[2],还可明显上调成骨细胞护骨因子(OPG)/核因子- κB (NF- κB)受体激活蛋白配体(RANKL)的表达,通过调节成骨细胞的分泌因子而调节破骨细胞的活化^[3],广泛用于治疗骨质疏松症。续断提取工艺的不同会影响提取物的质量和药效,本研究中采用高氯酸显色法、液相色谱-质谱(LC-MS)法和体外释放法测定,评价了续断离子液体提取物与上市对照药材间的质量差异;通过 MC3T3–E1 细胞生长和碱性磷酸酶(ALP)活力测定,评价了续断离子液体提取物对成骨细胞的作用;通过测定对破骨细胞 RAW264.7 生长和抗酒石酸酸性磷酸酶(StrACP)活力的抑制作用,评价了续断离子液体提取物对破骨细胞的影响。现报道如下。

1 仪器、试药与细胞

1.1 仪器

KQ-500DA 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LC-MS8045 型液质联用仪(日本岛津公司),配有 UV2600 型紫外分光光度计;3111 型 CO_2 水套培养箱(美国热电公司);Micro Beta 2450 型液体闪烁计数器, D961962 型细胞收集仪(Perkin Elmer 公司),细胞收集器为 FilterMate Harvester;HR40-II-A2 型医用净化工作台(青岛海尔特种电器有限公司);5810R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司);BS210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为 0.1 mg);CK40-F200 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);YXQ-208SD 型电热蒸汽灭菌器(嘉兴市中新医疗仪器有限公司);RCZ-6C3 型智能溶出仪(天津天大公司)。

1.2 试药

离子液体提取物(自制,批号分别为 20200630, 20200702, 20200705, 分别含川续断皂苷 VI 68.43%, 69.21%, 68.72%);续断壮骨胶囊(浙江迪耳药业有限公司,批号为 20191004,每粒含续断皂苷提取物 0.28 g); α -MEM 培养液(批号为 2005060303),磷酸盐缓冲液(PBS,批号为 2005080101),0.25% 胰蛋白酶(批号为 2004240202),均购自浙江森瑞生物科技有限公司;超级胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号为

19110501);二甲基亚砜(DMSO,成都市科龙化工试剂厂,分析纯); ^3H -胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR,中国同辐股份有限公司,产品编号为 NET027L,批号为 201807,浓度为 1 mCi/mL,活度为 37 Mbq);ALP 测试盒(货号为 A059-1-1,批号为 20200724),StrACP 测试盒(货号为 A058-1-1,批号为 20200803),均购自南京建成生物工程研究所;小鼠重组可溶性 NF- κB 受体活化因子配体(sRANKL,美国 Peprotech 公司,货号为 315-11C,批号为 0815612-A2518);1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐([Emim]BF₄,中科院兰州化学物理研究所,批号为 CP0082216,含量 $\geq 99\%$),异绿原酸 A 对照品(批号为 DST190918-036),异绿原酸 B 对照品(批号为 DST191008-037),异绿原酸 C 对照品(批号为 DST190904-038),马钱苷酸对照品(批号为 DST191025-033),绿原酸对照品(批号为 DST190906),咖啡酸对照品(批号为 DST191030-013),马钱苷对照品(批号为 DST200628-038),川续断皂苷乙对照品(批号为 DST191202-56),川续断皂苷 VI 对照品(批号为 DST191126-041),均购自成都德思特生物技术有限公司,含量均高于 98.0%。

1.3 细胞

小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞株(破骨细胞), MC3T3–E1 细胞株(成骨细胞),均由中国科学院干细胞库提供。

2 方法与结果

2.1 续断总皂苷提取物制备

取续断药材 100 g,粉碎,过 10 目筛,加入 0.90 mol/L 的 [Emim]BF₄ 1 000 mL,超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz,下同)提取 60 min,滤过,取提取液,置旋转蒸发器中浓缩至 200 mL,加入大孔树脂柱中,用 1 个柱体积的水洗至近无色,用 3 个柱体积的 20% 乙醇洗至淡黄色,用 60% 乙醇洗至近无色,60% 乙醇洗脱液旋转蒸发(80 $^{\circ}\text{C}$, -0.08 MPa)近干,刮下沉淀物,真空干燥(60 $^{\circ}\text{C}$, -0.08 MPa),得续断总皂苷提取物^[4-5]。

2.2 续断总皂苷提取物质量分析

2.2.1 续断总皂苷含量测定

线性关系考察:取川续断皂苷 VI 对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的溶液。精密量取上述溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 10 mL

具塞试管中,于 65 ℃ 水浴氮气流吹干甲醇,精密加入高氯酸 5 mL,涡旋混合 1 min,65 ℃ 水浴加热 20 min,冰浴放冷。于 406 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标、溶液质量浓度(X ,mg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=9.015X+0.0035(r=0.9991, n=5)$ 。结果表明,续断总皂苷质量浓度在 0.02~0.10 mg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

含量测定:取样品 0.1 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇适量,超声处理 30 min,放冷,加甲醇稀释并定容,摇匀,过滤。精密量取续滤液 3 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,精密量 0.4 mL,置 10 mL 具塞试管中,按线性关系考察项下方法处理,计算总皂苷的含量。结果见表 1。

表 1 样品中总皂苷含量和川续断皂苷 VI 溶出率测定结果(%)

Tab. 1 The content of total saponins and the dissolution rate of asperosaponin VI in the samples(%)					
项目	1	2	3	$\bar{X}$	胶囊(批号为 20191004)
总皂苷含量	86.71	85.42	85.90	86.01	78.74
续断皂苷 VI 溶出率	76.83	79.42	77.25	77.83	25.61

注:1 为 20200630,2 为 20200702,3 为 20200705。

Note: 1, 2, 3 indicates that the batch numbers were 20200630, 20200702 and 20200705, respectively.

可见,续断离子液体提取物中总皂苷含量高于续断壮骨胶囊,这可能是由于大孔树脂柱层析不仅除去了离子液体成分,还利用了各成分的极性差异,将多糖等在水和低浓度乙醇中溶解度较高的成分先行洗脱,而皂苷类成分主要集中于 60% 乙醇洗脱液中,从而使皂苷类成分得到纯化。

2.2.2 体外溶出度测定

漏槽试验:取续断壮骨胶囊 2 粒,置 50 mL 容量瓶中,加水适量,超声 30 min,溶解,定容,滤过,测得漏槽中溶剂的质量浓度为 0.226 mg/mL。

体外溶出度试验:取样品,照浆法测定体外溶出度。以 1 000 mL 水为溶出介质,100 r/min 旋转 60 min,取溶液 10 mL,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。另取川续断皂苷 VI 对照品 20 mg,加 20% 甲醇溶解,定容至 100 mL,即得质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。于 215 nm 波长处测定吸光度,按外标法计算含量。结果见表 1。可见,续断壮骨胶囊中川续断皂苷 VI 的溶出率低于续断离子液体提取样品,这是因为其多糖成分含量较高,在水中迅速糊化,抑制水进一步渗透,使川续断皂苷 VI 不能释放,造成溶出率较低。

2.2.3 样品中 9 种成分含量测定

色谱条件:岛津 C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm,3 μm);流动相:流动相 A 为乙腈-甲醇溶液(6:4, V/V),流动相 B 为 0.2% 甲酸-水溶液(梯度洗脱程序见表 2);流

表 2 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 2 Gradient elution program of mobile phase(%)					
时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0 min	10	90	5.5 min	95	5
4.5 min	40	60	5.6 min	10	90
4.6 min	95	5	9.0 min	10	90

速:0.4 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源,负离子模式,多反应监测(MRM),雾化气、干燥气、加热气均为高纯氮,流量分别为 3,10,10 L/min;接口温度:300 ℃;加热块温度:400 ℃。通过一级质谱全扫描确定前体离子,根据前体离子进行二级质谱碎裂,确定相应的定性和定量离子,建立离子对,创建 MRM 方法。离子对选择及碰撞电压条件参数见表 3。

表 3 质谱条件参数

Tab. 3 Parameters of mass spectrum conditions							
待测成分	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	碰撞能量 (CE)	待测成分	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	碰撞能量 (CE)
咖啡酸	179.02	135.13	14	异绿原酸 B	515.05	179.14	30
马钱苷	435.11	227.17	14	异绿原酸 C	515.02	353.21	17
马钱苷酸	375.13	213.25	15	川续断皂苷乙	1073.41	749.33	45
绿原酸	353.12	191.07	14	川续断皂苷 VI	973.35	603.41	46
异绿原酸 A	515.03	353.18	15				

注: m/z 为质荷比。

Note: m/z is the mass-to-charge ratio.

线性关系考察:分别取异绿原酸 A、B、C 及马钱苷酸、咖啡酸、马钱苷、绿原酸、川续断皂苷乙、川续断皂苷 VI 9 种对照品各适量,用 20% 甲醇配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品贮备液。分别取上述对照品贮备溶液各适量,加入 20% 甲醇稀释成质量浓度为 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0 μg/mL 的各适量系列单一对照品溶液,按上述色谱/质谱条件进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(X ,μg/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表 4。表明各对照品溶液质量浓度在 0.5~6.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

表 4 线性关系考察结果($n=5$)

Tab. 4 Results of the linear relation test($n=5$)		
待测成分	回归方程	r
咖啡酸	$Y_1=9.93 \times 10^6 X_1 - 76\,718$	0.999 6
马钱苷	$Y_2=1.34 \times 10^5 X_2 + 10\,393$	0.999 4
马钱苷酸	$Y_3=2.35 \times 10^5 X_3 - 149.32$	0.999 4
绿原酸	$Y_4=4.73 \times 10^6 X_4 - 102\,877$	0.999 3
异绿原酸 A	$Y_5=1.15 \times 10^6 X_5 - 368\,629$	0.999 1
异绿原酸 B	$Y_6=7.80 \times 10^6 X_6 + 435\,680$	0.999 5
异绿原酸 C	$Y_7=1.27 \times 10^6 X_7 + 4\,604.71$	0.999 3
川续断皂苷乙	$Y_8=1.63 \times 10^5 X_8 - 6\,082.94$	0.999 1
川续断皂苷 VI	$Y_9=1.63 \times 10^6 X_9 + 56\,822$	0.999 2

样品含量测定:取续断离子液体提取物(批号为 20200630)和续断壮骨胶囊(批号为 20191004)各 20 mg,精密称定,加 20% 甲醇适量,置 100 mL 容量瓶中,超声溶解,加 20% 甲醇定容,取 1 mL,用 20% 甲醇稀释至 50 mL,按色谱/质谱条件进样测定。结果见表 5。可见,续断离子液体提取物中有效成分川续断皂苷 VI 较续断壮骨胶囊高 13.83%。

表 5 样品中 9 种成分含量测定结果(mg/g)

Tab. 5 Results of content determination of nine components in the sample(mg/g)

待测成分	续断离子液体 提取物	续断壮骨 胶囊	化合物	续断离子液体 提取物	续断壮骨 胶囊
咖啡酸	10.51	4.43	异绿原酸 B	12.07	4.74
马钱苷	0	0	异绿原酸 C	32.72	12.25
马钱苷酸	0	0	川续断皂苷乙	7.34	10.21
绿原酸	64.54	18.24	川续断皂苷 VI	684.74	601.53
异绿原酸 A	88.68	29.63			

2.3 药效学试验

对 MC3T3-E1 及 RAW264.7 细胞生长的影响:取对数生长期小鼠单核细胞 RAW264.7 细胞株及 MC3T3-E1 细胞株,分别制成 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 单细胞悬液,分别取 100 μL 加入 96 孔平底培养板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 条件下培养 24 h 后分别加入含不同质量浓度的续断离子液体提取物/续断壮骨胶囊(1.56 ~ 200.00 $\mu\text{g/mL}$)培养液 100 μL ,每个浓度做 3 个复孔,空白对照组加入相同体积的 DMSO,继续培养 48 h 后分别加入含 0.3 μCi ^3H -TdR 的培养液 50 μL ,继续培养 16 h,收集细胞,测定每个样品的脉冲数,用三孔的平均脉冲数评估各浓度样品对破骨细胞 RAW264.7 及成骨细胞 MC3T3-E1 生长的影响。结果见表 6 和表 7。与空白对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)比较,质量浓度为 6.25 ~ 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 的续断离子液体提取物可显著促进 MC3T3-E1 细胞生长,且呈量效依赖关系($P < 0.05$),但高浓度(200 $\mu\text{g/mL}$)时促进作用不明显,提示高浓度的续断皂苷可能存在一定细胞毒

性作用。显微镜下可见 MC3T3-E1 细胞呈多角形,贴壁生长,几乎无脱落,胞质饱满,相邻细胞生长融合成片,药物作用后的细胞数量明显多于空白对照组,且续断离子液体提取物的作用明显优于续断壮骨胶囊。由表 7 和图 2 可见,与空白对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)比较,质量浓度为 12.50 ~ 200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的续断离子液体提取物可显著抑制 RAW264.7 细胞生长,且呈量效依赖关系($P < 0.05$)。显微镜下可见 RAW264.7 细胞呈多变形,贴壁生长,部分细胞脱落,药物作用后的细胞数明显少于空白对照组,且续断离子液体提取物对 RAW264.7 细胞的抑制作用优于续断壮骨胶囊。

对成骨细胞 MC3T3-E1 ALP 活性的影响:取对数生长期的成骨细胞 MC3T3-E1 细胞株,胰酶消化后吹打成单个细胞悬液,配成浓度为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞,接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,设 2 个复孔,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后分别加入含不同质量浓度的续断离子液体提取物/续断壮骨胶囊培养液(6.25 ~ 200.00 $\mu\text{g/mL}$),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 培养箱中,继续培养 48 h,吸去上清液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 400 μL 0.1% Triton X-100 以裂解细胞,冰浴 10 min。取上清液,用 BCA 试剂盒测定裂解液中的蛋白质浓度,按试剂盒操作方法测定 ALP 的活性。结果见表 8。可见,与空白对照组比较,不同质量浓度的续断离子液体提取物及续断壮骨胶囊均可提高 MC3T3-E1 细胞 ALP 的活性,但差异不显著($P > 0.05$)。

对破骨细胞 RAW264.7 StrACP 活性的影响:取对数生长期的破骨细胞 RAW264.7 细胞株,胰酶消化后吹打成单个细胞悬液,制成 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液,接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,设 2 个复孔,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,RANKL 对照组每孔加入 50 μL 无血清培养基配制的 RANKL 和 100 μL 无血清培养基,试验组每孔加入以无血清培养基配制的 RANKL 50 μL 和不同浓度的续断离子液体提取物/续断壮骨胶囊(终浓度 6.25 ~ 200.00 $\mu\text{g/mL}$),RANKL 的终浓度为

表 6 续断皂苷对成骨细胞 MC3T3-E1 生长的影响($\bar{X} \pm s, \text{cpm}, n = 3$)

Tab. 6 Effect of asperosaponin VI on the growth of osteoblasts MC3T3-E1 cells($\bar{X} \pm s, \text{cpm}, n = 3$)

制剂	0 $\mu\text{g/mL}$	1.560 $\mu\text{g/mL}$	3.125 $\mu\text{g/mL}$	6.250 $\mu\text{g/mL}$	12.500 $\mu\text{g/mL}$	25.000 $\mu\text{g/mL}$	50.000 $\mu\text{g/mL}$	100.000 $\mu\text{g/mL}$	200.000 $\mu\text{g/mL}$
续断离子液体提取物	2719.0 $\pm$ 89.60	2725.5 $\pm$ 64.26	2898.0 $\pm$ 101.79	3027.5 $\pm$ 61.52**	3166.5 $\pm$ 58.68**	3380.5 $\pm$ 94.04***	3801.5 $\pm$ 129.43***	3646.5 $\pm$ 95.52***	2764.5 $\pm$ 85.61
续断壮骨胶囊		2801.5 $\pm$ 77.12	2643.0 $\pm$ 65.07	2836.5 $\pm$ 82.69	3023.5 $\pm$ 169.03	3209.0 $\pm$ 80.64**	3582.0 $\pm$ 96.23***	3765.5 $\pm$ 163.28***	2395.0 $\pm$ 130.07*

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。表 7 至表 9 同。

Note:Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,as well as Tab. 7 to Tab. 9.

表 7 续断皂苷对破骨细胞 RAW264.7 生长的影响($\bar{X} \pm s, \text{cpm}, n = 3$)

Tab. 7 Effect of asperosaponin VI on the growth of osteoclasts RAW264.7 cells($\bar{X} \pm s, \text{cpm}, n = 3$)

制剂	0 $\mu\text{g/mL}$	1.560 $\mu\text{g/mL}$	3.125 $\mu\text{g/mL}$	6.250 $\mu\text{g/mL}$	12.500 $\mu\text{g/mL}$	25.000 $\mu\text{g/mL}$	50.000 $\mu\text{g/mL}$	100.000 $\mu\text{g/mL}$	200.000 $\mu\text{g/mL}$
续断离子液体提取物	2201.3 $\pm$ 52.38	2211.5 $\pm$ 67.23	2165.5 $\pm$ 30.44	2096.0 $\pm$ 82.03	1923.0 $\pm$ 48.14**	1778.5 $\pm$ 44.52***	1594.5 $\pm$ 119.51**	1386.0 $\pm$ 79.17***	887.5 $\pm$ 36.08***
续断壮骨胶囊		2318.0 $\pm$ 53.70	2238.0 $\pm$ 62.19	2041.5 $\pm$ 161.87	2019.0 $\pm$ 49.46*	1928.5 $\pm$ 118.13*	1804.5 $\pm$ 71.38**	1423.0 $\pm$ 77.82***	821.5 $\pm$ 95.54***

表 8 续断皂苷对成骨细胞 MC3T3-E1 ALP 的影响 ($\bar{X} \pm s, U/gprot, n=3$)

Tab. 8 Effect of asperosaponin VI on the activity of ALP in osteoblast MC3T3-E1 cells ($\bar{X} \pm s, U/gprot, n=3$)

制剂	0 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	12.50 $\mu\text{g/mL}$	25.00 $\mu\text{g/mL}$	50.00 $\mu\text{g/mL}$	100.00 $\mu\text{g/mL}$	200.00 $\mu\text{g/mL}$
续断离子液体提取物	980.18 $\pm$ 103.67	1 101.13 $\pm$ 112.10	1 102.42 $\pm$ 131.66	1 187.45 $\pm$ 124.38	1 137.26 $\pm$ 105.60	1 039.73 $\pm$ 96.96	1 085.49 $\pm$ 118.10
续断壮骨胶囊		1 025.59 $\pm$ 112.31	1 137.83 $\pm$ 106.39	1 037.30 $\pm$ 117.67	1 014.09 $\pm$ 129.38	1 098.27 $\pm$ 124.45	1 098.92 $\pm$ 117.81

表 9 续断皂苷对破骨细胞 RAW264.7 StrACP 活性的影响 ($\bar{X} \pm s, U/gprot, n=3$)

Tab. 9 Effect of asperosaponin VI on the activity of StrACP in osteoclasts RAW264.7 cells ($\bar{X} \pm s, U/gprot, n=3$)

制剂	0 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	12.50 $\mu\text{g/mL}$	25.00 $\mu\text{g/mL}$	50.00 $\mu\text{g/mL}$	100.00 $\mu\text{g/mL}$	200.00 $\mu\text{g/mL}$
续断离子液体提取物	83.43 $\pm$ 3.04	82.14 $\pm$ 3.54	69.06 $\pm$ 2.77*	71.39 $\pm$ 3.54*	62.73 $\pm$ 2.89**	63.68 $\pm$ 3.21*	46.04 $\pm$ 2.45***
续断壮骨胶囊		80.40 $\pm$ 3.66	78.71 $\pm$ 2.79	84.40 $\pm$ 3.27	81.66 $\pm$ 2.89	59.23 $\pm$ 2.69***	50.18 $\pm$ 3.21***

100 ng/mL。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 及 5 % CO_2 培养箱中,继续培养 48h,吸去上清液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 400 μL 1 % Triton X-100 以裂解细胞,冰浴 10 min。取上清液,用 BCA 试剂盒测定裂解液中的蛋白质浓度,按 StrACP 试剂盒操作方法测定 StrACP 的活性。结果见表 9。可见,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,质量浓度为 12.5 ~ 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的续断离子液体提取物可显著抑制 RAW264.7 细胞 StrACP 酶的活性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

骨质疏松症的发病机制为成骨细胞和破骨细胞失衡,造成骨的形成低于骨的吸收^[6-7]。续断提取物中主要成分川续断皂苷 VI 可通过促进 BMP-2 的生成,调节 c-Jun 的磷酸化,激活 c-Jun 氨基端激酶(JNK)信号通路,诱导 BMSC 向成骨细胞分化,增加骨形成和生长,发挥治疗骨质疏松的作用^[8]。且川续断皂苷 VI 能提高 β 联蛋白(β -catenin)、Runx2 及骨钙素的表达,从而激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,进而促进 BMSC 的成骨分化^[9]。因此,续断提取物可通过多种细胞通路促进成骨细胞的分化与增殖,发挥治疗骨质疏松的作用,但其对破骨细胞的抑制作用仍有待进一步研究^[10]。

由表 1 可知,续断离子液体提取物中总皂苷含量较续断壮骨胶囊高 9.23%,川续断皂苷 VI 溶出率高 203.90%,提示续断离子液体提取物较续断壮骨胶囊药效更强。由表 6 至表 9 可知,与空白对照组比较,续断离子液体提取物和续断壮骨胶囊质量浓度均在 25 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内可显著促进 MC3T3-E1 细胞生长 ($P < 0.01$);当续断离子液体提取物的质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 MC3T3-E1 细胞的增殖作用反而不明显,预示存在一定的细胞毒性作用,临床使用时应注意给药剂量。但 2 种提取物对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响均不显著 ($P > 0.05$),这可能是由于 ALP 是成骨细胞早期分化的标志物^[11],而本研究中成骨细胞处于生长阶段,故指标变化不显著;2 种提取物质量浓度大于 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时均可显著抑制 RAW264.7 细胞生长,同时还抑制了骨吸收的标志性指标 StrACP 的表达^[11],提示 2 种提取物均有抑制破骨细胞生长的作用。

综上所述,续断离子液体提取物质量优于续断壮骨胶囊,具有促进破骨细胞 RAW264.7 生长和抑制成骨细胞 MC3T3-E1 活性的双向作用。

参考文献

- [1] 武密山,赵素芝,任立中,等. 川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. 中国药理学通报, 2012,28(2):222-226.
- [2] NIU YB, LI YH, HUANG HT, et al. Asperosaponin VI, a saponin component from *Dipsacus asper* wall, induces osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 and extracellular signal regulated kinase 1/2 pathway[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11):1700-1706.
- [3] NIU YB, LI YH, KONG XH, et al. The beneficial effect of Radix *Dipsaci* total saponins on bone metabolism *in vitro* and the possible mechanisms of action[J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(11):2649-2660.
- [4] ZHANG LJ, WANG X. Hydrophobic ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of magnolol and honokiol from cortex *Magnoliae officinalis*[J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(13):2035-2038.
- [5] DU FY, XIAO XH, LI GK. Ionic liquid aqueous solvent-based microwave-assisted hydrolysis for the extraction and HPLC determination of myricetin and quercetin from *Myrica rubra* leaves[J]. *Biomedical Chromatography*, 2011, 25(4):472-478.
- [6] 王鹏程,唐 渊. 芪苈通络胶囊对小鼠骨质疏松的改善作用及机制研究[J]. 中国药业, 2020,29(21):5-8.
- [7] 毛 晴. 川续断总皂苷对体外培养的大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J]. 中国药物与临床, 2020,20(5):709-710.
- [8] 高 歌,潘晓华,高 雪,等. 基于系统药理学的续断治疗骨质疏松作用机制研究[J]. 中草药, 2018,49(19):4581-4585.
- [9] 李 家,林晓晨,王雅冰,等. 续断皂苷 VI 对小鼠骨髓基质干细胞成骨分化的影响[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2017, 18(1):28-32.
- [10] 赵金龙,梁桂洪,韩燕鸿,等. 川续断提取物续断皂苷 VI 防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(5):755-759.
- [11] 杨 茗,季 晖,张树平,等. 知母皂苷元对成骨细胞活性和破骨细胞分化及功能的影响[J]. 中国药科大学学报, 2009,40(6):544-548.

(收稿日期:2020-11-23;修回日期:2021-05-21)