

基于最小二乘回归分析法的雷公藤多苷片免疫抑制作用谱效关系研究

池 婕^{1,2}, 林 兵^{1#}, 刘志宏¹, 杨丽娜¹, 宋洪涛^{1*}

1. 南京军区福州总医院 药学科, 福建 福州 350025

2. 厦门大学医学院 基础医学系, 福建 厦门 361102

摘要:目的 初步探讨雷公藤多苷片免疫抑制作用及其 HPLC 指纹图谱间的相关性。方法 采用 HPLC 建立 7 个厂家生产的雷公藤多苷片醋酸乙酯提取物的指纹图谱, 选择刀豆蛋白 A (Con A) 刺激的小鼠脾淋巴细胞模型进行免疫抑制药理学研究, 分别考察雷公藤多苷片对小鼠脾淋巴细胞增殖以及细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ) 分泌的影响; 采用偏最小二乘回归分析法分析谱效关系。结果 建立了 7 个厂家生产的雷公藤多苷片的 HPLC 指纹图谱, 从 HPLC 指纹图谱中提取出 18 个能够表征差异的特征峰。药效研究结果显示不同厂家生产的雷公藤多苷片均可显著抑制 Con A 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖和 IFN- γ 的分泌 ($P < 0.05$)。偏最小二乘回归法分析结果显示, 以抑制小鼠脾淋巴细胞增殖 IC_{50} 值为药效指标时第 1、2、6、7、17、18 号峰为药效峰; 以 IFN- γ 分泌抑制率为指标时, 第 1、2、6、7、8、9、12、13 号峰为药效峰。结论 第 1、2、6、7、8、9、12、13、17、18 号峰所代表的化合物可能为雷公藤多苷片中发挥免疫抑制主要有效成分。

关键词: 雷公藤; 雷公藤多苷片; 指纹图谱; 谱效关系; 免疫抑制; 偏最小二乘回归分析法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2755-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.015

Spectrum-effect relationship of immunosuppressive activity of Leigongteng Duogan Tablet based on partial least squares regression analysis

CHI Jie^{1,2}, LIN Bing¹, LIU Zhi-hong¹, YANG Li-na¹, SONG Hong-tao¹

1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Command PLA, Fuzhou 350025, China

2. Department of Basic Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China

Abstract: Objective To investigate the immunosuppressive components in Leigongteng Duogan Tablet (LDT). **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was applied to establish the fingerprint for LDT from seven manufactures. The immunosuppressive effect of LDT was observed on Con A-induced mice spleen cells, and the cell proliferation and contents of IFN- γ were recorded. Then the partial least squares regression (PLSR) analysis was used to investigate its spectrum-effect relationship. **Results** The HPLC fingerprint for LDT from seven manufactures was established, and 18 characteristic peaks were confirmed. The *in vitro* cell experimental results showed that the proliferation of mice spleen cells and secretion of IFN- γ were inhibited by all LDT significantly compared with the control group. According to the results of PLSR, No. 1, 2, 6, 7, 17, and 18 peaks were strongly related to the proliferation inhibition of mice spleen cells and No. 1, 2, 6, 7, 8, 9, 12, and 13 peaks were related to the secretion of IFN- γ . **Conclusion** The No. 1, 2, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 17, and 18 peaks are the principal immunosuppressive substances in LDT.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; Leigongteng Duogan Tablet; fingerprint; spectrum-effect relationship; immunosuppression; partial least squares regression analysis

雷公藤多苷片是由卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 干燥去皮的根经提取、纯化后制成的药物制剂, 有显著的抗炎、免疫

抑制作用, 临床上多用于类风湿关节炎、肾病综合征等疾病的治疗^[1-3]。雷公藤多苷片临床上疗效显著, 但多发的毒副作用不容忽视。

收稿日期: 2015-05-07

基金项目: 福建省科技计划重大项目 (2012I1001)

作者简介: 池 婕, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (0591)22859972 E-mail: 1324867045@qq.com

林 兵, 男, 博士, 主管药师, 研究方向为中药药理学。Tel: (0591)22859972 E-mail: yaoxuelinhao@163.com

*通信作者 宋洪涛, 男, 博士, 主任药师, 博士生导师, 主要从事药剂学和临床药学方面的研究。

Tel: (0591)22859459 E-mail: sohoto@vip.163.com

#并列第一作者

指纹图谱现已成为国际公认的控制中药或天然药物质量最有效的方法之一。结合药效数据,可以使指纹图谱中化学成分体现出相应的药效,而且还能够阐明指纹图谱特征与药效的相互关系,确定相应的药效物质基础。本研究拟建立 7 个厂家生产的雷公藤多苷片的指纹图谱,并用偏小二乘回归分析法,分析各雷公藤多苷片对小鼠脾淋巴细胞增殖抑制作用以及细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ) 分泌抑制率与其指纹图谱之间关系,以期初步确定与免疫抑制作用药效有关的物质基础,为深入研究雷公藤多苷片药效物质基础及建立全面可靠的质量控制方法提供科学依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 型快速高效液相色谱仪,安捷伦公司;Agilent XDB-CN 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm 5 μ m),安捷伦公司;KQ-800KDE 型超声波清洗器,上海超声波仪器有限公司;Sep-pak 中性氧化铝柱,Waters 公司;Model 680 型酶联免疫检测仪,Bio-rad 公司;UV-2501 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司。乙腈、甲醇 (色谱纯)、刀豆蛋白 A (Con A),美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒,上海翊圣生物科技有限公司;小鼠 IFN- γ 试剂盒,上海西塘生物技术有限公司;小鼠淋巴细胞分离液,北京达科为生物技术有限公司;0.4%台盼蓝染色液,上海索莱宝生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司。

雷公藤多苷片分别购买自 A (湖南协力药业有限公司,批号 120905)、B (湖北黄石制药有限公司,批号 120917)、C (福建汇天生物药业有限公司,批号 20120802)、D (上海复旦药业有限公司,批号 20120901)、E (浙江普洛天然药物有限公司,批号 120502)、F (江苏美通制药有限公司,批号 21202)、G (安徽新陇药业有限公司,批号 120601) 7 个厂家。对照品雷公藤甲素 (质量分数 99%,批号 111567-200502,中国食品药品检定研究院)、雷公藤内酯酮 (质量分数 98%,批号 14022521,南京泽朗医药科技有限公司)、雷公藤次碱 (南京景竹生物科技有限公司,批号 14082933,质量分数 99%)。

Balb/c 小鼠,雄性,体质量 20~25 g,由南京军区福州总医院比较医学科提供,许可证号 SCXK (沪) 2012-0002。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取雷公藤多苷片适量,研细,精密称取 0.2 g,

加醋酸乙酯 30 mL,超声提取 10 min,放冷,滤过,取 15 mL 滤液用中性氧化铝柱纯化,收集流出液。再用 2 倍柱体积醋酸乙酯洗脱,收集洗脱液,合并流出液和洗脱液,氮气吹干,残渣用 2 mL 甲醇溶解,过 0.22 μ m 滤膜,得雷公藤多苷片提取物,即指纹图谱所需的供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

取雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤次碱适量置于 10 mL 量瓶中,加乙腈溶液溶解并稀释至刻度,制得混合对照品溶液。

2.3 细胞药效实验样品的制备

按“2.1”项下方法制备雷公藤多苷片提取物,DMSO 溶解,按一定比例用无血清 RPMI 1640 培养基稀释,0.22 μ m 滤膜滤过除菌,即得不同质量浓度雷公藤多苷片提取物样品溶液。

2.4 雷公藤多苷片提取物 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB-CN 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈 (A) - 水 (B);梯度洗脱:0~15 min, 25%~32% A;15~35 min, 32%~42% A;35~56 min, 42%~82% A;检测波长为 218 nm;柱温为 30 $^{\circ}$ C;体积流量为 1.0 mL/min;进样 10 μ L,记录 60 min 色谱图。

2.4.2 方法学考察 对实验方法进行精密度、稳定性、重复性考察,结果指纹图谱相似度 RSD 均小于 5%,符合分析要求。

2.4.3 HPLC 指纹图谱 按“2.4.1”项下色谱条件,吸取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L 进行分析,得到 7 个厂家生产的雷公藤多苷片指纹图谱。从 7 个 HPLC 图谱中确定了 18 个特征峰 (图 1),通过与对照品比对,鉴定其中 1、3、18 号峰分别为雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤次碱。

2.5 对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

按文献方法^[4]制备小鼠脾淋巴细胞,调整细胞浓度为 5×10^6 /mL,于 96 孔细胞培养板上每孔加入细胞悬液 100 μ L。实验共设药物组、模型组、对照组及空白对照组,具体处理如下:药物组加入 Con A (终质量浓度 3 μ g/mL) 10 μ L 和不同质量浓度的雷公藤多苷片提取物 (终质量浓度分别为 17.00、8.50、4.25、2.13、1.06 μ g/mL) 10 μ L;模型组加入 Con A (终质量浓度 3 μ g/mL) 10 μ L 和含适量 DMSO (使 DMSO 终体积分数小于 0.2%) 的无血清 RPMI 1640 培养基 10 μ L;对照组加入含适量 DMSO 的无血清 RPMI 1640 培养基 10 μ L;再加入完全培养基至 200 μ L,另设空

白对照组 (不加细胞, 其他处理同对照组) 每组设 6 个复孔, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 实验结束前 4 h 加入 CCK-8 试剂 10 μL, 结束后使用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率 [抑制率 = 1 - (A_{对照} - A_{空白}) / (A_{药物} - A_{空白})] ; 使用 SPSS 17.0 软件处理数据, 计算各厂家雷公藤多苷片提

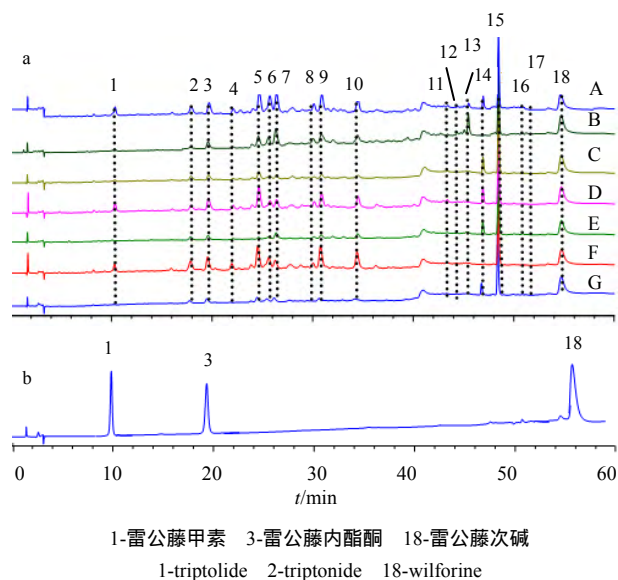


图 1 不同厂家雷公藤多苷片供试品 (a) 及混合对照品 (b) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC fingerprints of LDT (a) and mixed reference substances (b)

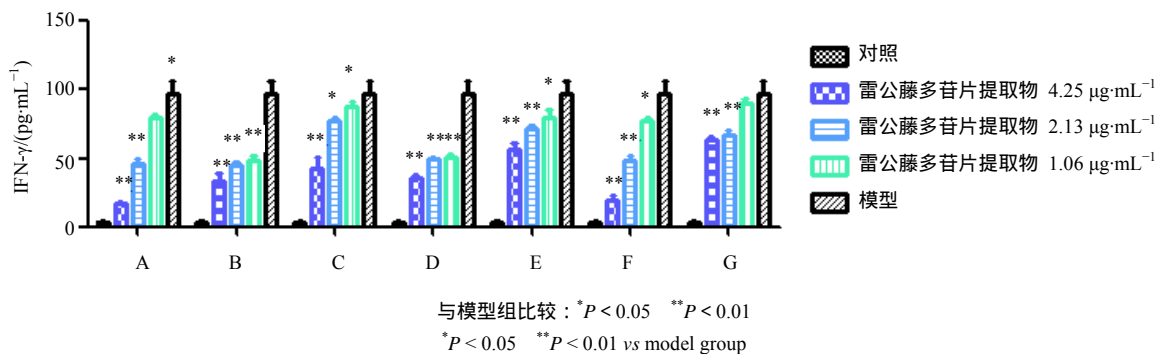


图 2 7 个厂家生产的雷公藤多苷片提取物对 ConA 刺激的小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of LDT extracts in LDT from seven manufactures on secretion of IFN-γ in mice spleen cells induced by Con A ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 谱效关系的偏小二乘回归分析

由指纹图谱可知不同厂家雷公藤多苷片中所含成分种类和量不同, 而体外实验结果显示不同厂家生产的雷公藤多苷片在免疫抑制药效方面也存在着差异, 为了明确成分的差异与药效差异是否有关联, 进一步采用偏小二乘回归分析进行谱效关系分析, 探讨各色谱峰与药效的关系。

取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。结果表明, 与模型组比较, 在 2.13 ~ 17.00 μg/mL 时, 所有厂家雷公藤多苷片提取物对小鼠脾淋巴细胞的增殖均有显著抑制作用 (P < 0.05), 并呈剂量依赖性; A ~ G 7 个厂家生产的雷公藤多苷片提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的 IC₅₀ 值 (n = 6) 分别为 (3.86 ± 0.09) (17.43 ± 0.19) (6.35 ± 0.16) (13.45 ± 0.13) (10.56 ± 0.11) (3.70 ± 0.08) (11.25 ± 0.12) μg/mL。其中 A 和 F 厂家生产的雷公藤多苷片提取物对小鼠脾细胞增殖抑制作用最强, B 厂家生产的雷公藤多苷片提取物对小鼠脾细胞增殖抑制作用相对较弱。

2.6 对小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响

按文献方法^[4]制备小鼠脾淋巴细胞, 调整细胞浓度为 1 × 10⁷/mL, 于 96 孔细胞培养板上每孔加入细胞悬液 100 μL。实验分组及处理同“2.5”项, 其中药物组加入雷公藤多苷片提取物的终质量浓度分别为 4.25、2.13、1.06 μg/mL, 每组设 6 个复孔, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 吸出上清, 使用 ELISA 试剂盒检测 IFN-γ 的量。结果见图 2。由结果可知, 模型组 IFN-γ 的量显著高于对照组, 为对照组的 26 倍, 说明造模成功。给予 4.25、2.13、1.06 μg/mL 雷公藤多苷片提取物处理后, 均显示出对 IFN-γ 具有显著的抑制作用, 且呈剂量依赖性, 但不同厂家生产的雷公藤多苷片对 IFN-γ 的抑制作用存在差异。

偏小二乘法采用成分提取的方法, 是同时对因变量和自变量进行主成分分解, 并从中提取成分, 使两者的协方差达到最大, 然后选择因子参与建模, 最终转换成包含所有原始变量的回归方程^[4]。得到的回归系数的正负表明自变量与因变量是正相关或负相关, 回归系数绝对值的大小表明自变量对因变量贡献的大小。

2.7.1 指纹图谱与细胞增殖抑制 IC_{50} 值的相关分析 以标准化处理的指纹图谱中各特征峰峰面积为 X 、以雷公藤多苷片提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的 IC_{50} 值为 Y ，采用偏最小二乘法进行相关分析，得到 18 个色谱峰的回归系数。其中系数绝对值反映色谱峰对 IC_{50} 贡献的大小，回归系数绝对值越大，说明相关性越大；回归系数的符号反映与 IC_{50} 相关性，由于 IC_{50} 与药效是负相关，因此回归系数为负的峰是对药效有贡献的色谱峰。拟合出指纹图谱中各共有峰峰面积与 IC_{50} 值之间的回归方程： $Y = -0.35 X_1 - 0.54 X_2 + 0.17 X_3 - 0.01 X_4 + 0.11 X_5 - 0.33 X_6 - 0.16 X_7 - 0.08 X_8 - 0.004 X_9 + 0.04 X_{10} + 0.16 X_{11} + 0.25 X_{12} + 0.04 X_{13} + 0.002 X_{14} - 0.02 X_{15} + 0.06 X_{16} - 0.21 X_{17} - 0.26 X_{18}$ 。由此得出第 1、2、4、6、7、8、9、15、17、18 号峰是药效峰，其中第 4、8、9、15 号峰系数绝对值太小，故删去。因此与 IC_{50} 值有关的主要药效峰为第 1、2、6、7、17、18 号峰。

2.7.2 指纹图谱与 $IFN-\gamma$ 抑制率的相关分析 以标准化处理的指纹图谱中各特征峰峰面积为 X 、雷公藤多苷片提取物对小鼠脾淋巴细胞 $IFN-\gamma$ 的抑制率为 Y ，采用偏最小二乘法进行相关分析，拟合出指纹图谱中各共有峰峰面积与 $IFN-\gamma$ 抑制率之间的回归方程为 $Y = 0.37 X_1 + 0.37 X_2 - 0.21 X_3 + 0.03 X_4 - 0.12 X_5 + 0.14 X_6 + 0.15 X_7 + 0.21 X_8 + 0.10 X_9 - 0.15 X_{10} - 0.3 X_{11} + 0.29 X_{12} + 0.16 X_{13} - 0.31 X_{14} - 0.16 X_{15} - 0.13 X_{16} - 0.08 X_{17} + 0.04 X_{18}$ 。由于 $IFN-\gamma$ 抑制率与药效是正相关，即 $IFN-\gamma$ 抑制率越大，说明雷公藤多苷片的免疫抑制作用越强。因此对药效有贡献的峰应当是回归系数为正数的峰，第 1、2、4、6、7、8、9、12、13、18 号峰回归系数为正，即为药效峰。另第 18 号峰系数过小，故不予考虑。因此与抑制 $IFN-\gamma$ 有关的主要药效峰为第 1、2、6、7、8、9、12、13 号峰。

3 讨论

本研究建立了 7 个厂家生产的雷公藤多苷片的指纹图谱。发现不同厂家的雷公藤多苷片指纹峰数量与峰面积均不同，提示不同厂家生产的雷公藤多苷片成分差异显著。

本研究选择偏最小二乘法分析雷公藤多苷片色谱峰面积与免疫抑制药效之间的关系。该方法集多元线性回归分析、典型相关分析和主成分分析的基本功能于一体，在一个算法下，同时通过主成分分析实现数据简化，通过典型相关分析分析变量间的

相关关系，使用多元线性回归建立回归模型，能够较为准确地给出各色谱峰与药效的相关性以及贡献大小，能够最大限度地利用数据信息，具有预测精度较高以及模型易于解释等特点，能够体现中药成分对药效指标的综合作用，具有较强的可操作性和稳定性^[5]，是构建中药谱效关系的一种有效方法。

雷公藤多苷片通过诱导淋巴细胞凋亡、抑制炎症细胞因子的释放等发挥免疫抑制作用，治疗自身免疫疾病^[6-8]。本研究选择 Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞模型考察不同厂家生产的雷公藤多苷片的免疫抑制作用，在 1.06 ~ 17.00 $\mu\text{g/mL}$ 内，雷公藤多苷片提取物可显著抑制小鼠脾淋巴细胞增殖。根据谱效分析结果，雷公藤多苷片中与小鼠脾淋巴细胞增殖抑制 IC_{50} 值有关的色谱峰为 1、2、6、7、17、18 号峰。而与抑制 $IFN-\gamma$ 分泌有关的色谱峰为第 1、2、6、7、8、9、12、13 号峰，1、2、6、7 为对小鼠脾淋巴细胞增殖和 $IFN-\gamma$ 分泌均有关的色谱峰，这些色谱峰可能为雷公藤多苷片发挥免疫抑制作用的主要有效成分，其中第 1 号峰通过对照品鉴定为雷公藤甲素。本研究初步探索了雷公藤多苷片指纹图谱与免疫抑制药效的关系，为研究雷公藤药效物质基础提供了科学依据，但具体发挥免疫抑制作用的药效成分尚未阐明，仍需深入研究，以便更好地控制雷公藤多苷片的质量。

参考文献

- [1] Brinker A M, Ma J, Lipsky P E, *et al.* Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(6): 732-766.
- [2] 梁建, 沈熊, 朱孝国, 等. 雷公藤多苷片的 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 22(1): 9-13.
- [3] Qin D P, Zhou Y J, Zhang S Z, *et al.* Anti-inflammation of *Tripterygium wilfordii* polycoride on macrophages and its regulation to inflammation via TLR4/NF- κ B [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 155-161.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [5] 王园园, 陈景武. 偏最小二乘回归分析在医学中的正确应用 [J]. 中国卫生统计, 2010, 27(2): 208-209.
- [6] 支勇, 曹式丽. 雷公藤治疗肾脏病作用机制研究进展 [J]. 山西中医, 2013, 30(3): 53-57.
- [7] 李红刚, 纪伟, 宋亚楠, 等. 雷公藤治疗风湿免疫性疾病临床应用进展 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(4): 616-617.
- [8] 张敏, 王守安, 刘黎星. 雷公藤多苷干预 TLR-NF- κ B 通路发挥免疫抑制作用 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1288-1292.