DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.034

淫羊藿及其炮制品化学组成及对 MC3T3 - E1 细胞的增殖和成骨作用研究

成光宇,李盼,宋来辉,梁金玲,曹文轩,于澎,戴雨霖,刘佳,许天阳
(长春中医药大学,吉林 长春 130117)

摘要:目的 分析淫羊藿(Epimedii folium)及其炮制品化学组成,并探究其提取物对小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(Mouse embryonic preosteoblast cells, MC3T3 - E1 cells)的增殖及成骨作用。方法 取 10 批淫羊藿,分别加工炮制成羊脂油炙淫羊藿和盐炙淫羊藿各 10 批,利用高效液相色谱法(High performance liquid chromatography,HPLC)测定样品中黄酮类成分含量,并结合液相色谱指纹图谱及多元统计分析方法,探究淫羊藿中黄酮类化合物在炮制前后变化规律;建立地塞米松(Dexamethasone, DEX)诱导的 MC3T3 - E1 细胞的成骨抑制模型,通过测定细胞中碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)和骨钙素(Osteocalcin, OCN)的表达量来评价淫羊藿及其炮制品的抗骨质疏松效果,进一步探讨淫羊藿及其炮制品抗骨质疏松作用不同可能存在的原因。结果 建立淫羊藿及其炮制品 HPLC 指纹图谱,并对指纹图谱进行相似度评价,识别出共有峰 16 个;聚类分析结果将朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 归为一类,淫羊藿苷和宝藿苷 I 归为一类;各黄酮含量的极坐标气泡图显示初级黄酮苷(朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C)含量在炮制后整体减少,次级黄酮苷(淫羊藿苷和宝藿苷 I)含量在炮制后整体增加;抗骨质疏松活性数据表明,淫羊藿不同炮制品均具有一定的成骨增殖作用,其中淫羊藿盐炙品对 DEX 抑制的成骨细胞活性增强作用最为明显。结论 采用指纹图谱相似度分析和聚类分析对 5 个黄酮类成分含量的差异进行分析,从而初步探索了淫羊藿炮制前后黄酮类成分的变化规律。结合其提取物对 MC3T3 - E1 细胞增殖及成骨能力的影响,发现淫羊藿经盐炙后淫羊藿苷含量增加,对 DEX 引起的 MC3T3 - E1 细胞成骨抑制的增殖作用显著增强,提示淫羊藿苷可能是淫羊藿不同炮制品抗骨质疏松临床疗效不同的物质基础,为进一步探索淫羊藿炮制原理奠定基础。

关键词:淫羊藿;黄酮类化合物;指纹图谱;聚类分析;骨质疏松
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)08-0178-09

Study on Chemical Composition of Yinyanghuo(Epimedii Folium) and Its Processed Products and Their Effects on Proliferation and Osteogenesis of MC3T3 - E1 Cells

CHENG Guangyu,LI Pan,SONG Laihui,LIANG Jinling,CAO Wenxuan,YU Peng,DAI Yulin,LIU Jia,XU Tianyang
(Changchun University of Chinese Medicine,Changchun 130117,Jilin,China)

Abstract:*Objective* To analyze the chemical composition of Yinyanghuo(Epimedii Folium) and its processed products and to investigate the proliferative and osteogenic effects of its extracts on mouse Embryonic Preosteoblast Cells(MC3T3 - E1 cells). *Methods* Ten batches of Yinyanghuo(Epimedii Folium) were processed into 10 batches of Yinyanghuo(Epimedii Folium) processed with lanolin oil and 10 batches of Yinyanghuo(Epimedii Folium) processed with salt,respectively. The contents of flavonoids in the samples were determined by high performance liquid chromatography(HPLC),and the changes of flavonoids in Yinyanghuo(Epimedii Folium) before and after processing were explored by HPLC fingerprint and multivariate statistical analysis. The osteogenic inhibition model of MC3T3 - E1 cells induced by dexamethasone(DEX) was established. The anti - osteoporosis effect of Epimedium and its processed products were evaluated by measuring the expressions of alkaline phosphatase(ALP), osteoprotegerin(OPG) and osteocalcin(OCN) in cells,and the possible reasons for the different anti - osteoporosis effects of Yinyanghuo(Epimedii Folium) and its processed products were further explored. *Results* The HPLC fingerprints of Yinyanghuo(Epimedii Folium) and its processed products were established,and the similarity of the fingerprints was evaluated,and 16 common peaks were identified. The results of cluster analysis classified epimedin A,epimedin B and epimedin C into one group,and icariin and baohuoside I into one group. The polar coordinate bubble diagram of each flavonoid content showed that the contents of primary flavonoid glycosides(epimedin A,epimedin B and epimedin C) decreased overall after processing,and the contents of

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20210204035YY,20230204034YY,YDZJ202201ZYTS205)
作者简介:成光宇(1971 -),男,吉林长春人,主任药师,硕士研究生导师,硕士,研究方向:药理学。
通讯作者:刘佳(1982 -),女,吉林长春人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:中药药理学。E-mail:ccliujia@126.com。
许天阳(1979 -),男,吉林长春人,副教授,硕士,研究方向:中药分析学。E-mail:xuty13894895121@163.com。

secondary flavonoid glycosides (icariin and baohuoside I) increased overall after processing. The data of anti-osteoporosis activity showed that different processed products of Yinyanghuo (Epimedii Folium) had certain osteogenic proliferation effect, and the salt-processed Yinyanghuo (Epimedii Folium) had the most obvious effect on the enhancement of osteoblast activity inhibited by DEX. *Conclusion* Fingerprint similarity analysis and cluster analysis were used to analyze the differences in the contents of five flavonoids, so as to preliminarily explore the changes of flavonoids before and after processing. Combined with the effect of its extract on the proliferation and osteogenic ability of MC3T3-E1 cells, it was found that the content of icariin increased after salt processing of Yinyanghuo (Epimedii Folium), and the proliferation of osteogenic inhibition of MC3T3-E1 cells induced by DEX was significantly enhanced, suggesting that icariin may be the material basis for different anti-osteoporosis clinical effects of different processed Yinyanghuo (Epimedii Folium) products, laying a foundation for further exploration of the processing principle of Yinyanghuo (Epimedii Folium).

Keywords: Yinyanghuo (Epimedii Folium); flavonoids; fingerprinting; cluster analysis; osteoporosis

淫羊藿(Epimedii Folium)首载于《神农本草经》,列为中品,其味辛甘,性温,归肝、肾经,具有补肾壮阳、强健筋骨、祛风除湿的功效,常用于肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛等症的治疗。我国是淫羊藿的地理分布中心,主要有 40 个淫羊藿品种,目前形成药材商品的主要种类有 15 种[1]。《中华人民共和国药典》(2020 年版)中收载的淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicomu* Maxim、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum* (Sieb. etZucc.) Maxim、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶[2],部分地区使用其地上部分或全草供药用。其中,朝鲜淫羊藿主要分布在我国东北地区,以吉林省南部、辽宁省东部所产朝鲜淫羊藿品质最佳,其核心适生区位于吉林省南部,如通化县、柳河县和抚松县等[3]。

淫羊藿作为传统中药材,含有丰富的多糖类、萜类、生物碱类和黄酮类等化合物,具有抗炎、抗氧化、抗骨质疏松、抗肿瘤、抗凋亡等多种药理活性,对各个系统疾病均有一定的改善作用[4-7]。研究证明淫羊藿可通过多种信号通路活化成骨细胞,并对破骨细胞有直接的抑制作用,其有效成分淫羊藿苷及淫羊藿总黄酮能有效防治骨质疏松[8-9]。其中淫羊藿苷能促进成骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪干细胞的成骨化及抑制脂化,促进骨生成;且能提高铁代谢水平进一步加强其对破骨细胞活性、分化能力的抑制来改善骨质疏松[10-12]。SUN L J 等[13]研究表明,淫羊藿苷可以刺激成骨细胞的增殖,通过增加碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性、钙化结节的数量、I 型胶原和骨 γ-羧基谷氨酸蛋白(Bone-γ-Carboxyglutamic Acid-Containing protein, BGP) mRNA 的表达水平来刺激 hFOB1.19 成骨细胞的分化。

根据临床需求,许多中药材需要通过炮制改变药性[14-15]。淫羊藿古今记载并应用的炮制方法很多,但目前关于淫羊藿的炮制工艺只有羊脂油炙淫羊藿和盐炙淫羊藿等炮制品收录于《中华人民共和国药典》(2020 年版)和地方炮制规范中[2,16-17]。现行版药典规定淫羊藿生品中以朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的总含量作为其综合质控指标,羊脂油炙的炮制品在生品的基础上又增加了宝藿苷 I 的含量测定。但规定的生品与炮制品的含量下限中,3 个初级黄酮苷和淫羊藿苷的总含量要求不一致。说明淫羊藿在炮制后引起了黄酮类成分含量的变化,但其具体的炮制原理目前尚不明确。

因此,本文利用高效液相色谱法测定淫羊藿及其炮制品中黄酮类成分含量,结合液相色谱指纹图谱及多元统计分析方法,探究淫羊藿中黄酮类化合物在炮制前后变化规律,并通过建立地塞米松(Dexamethasone, DEX)对胚胎成骨细胞前体细胞(Mouse Embryonic Preosteoblast Cells, MC3T3-E1 cell)细胞的成骨抑制模型,探究其对 MC3T3-E1 细胞增殖及成骨能力的影响,对淫羊藿油炙品及盐炙品的炮制原理进行了初步探索。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

LC-2030 高效液相色谱仪(日本岛津公司)、十万分之一电子天平(梅特勒托利多公司)、KQ-250B 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)、高速万能粉碎机(浙江红景天工贸有限公司)、HY-G20E(F)微电脑电磁炉(无锡市小天鹅华印电器有限公司)、旋转蒸发仪、离心机,ALP、骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)和骨钙素(Osteocalcin, OCN)试剂盒(江苏酶免实业有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯(禹王试剂),乙醇为分析纯(北京化工厂),水为纯水。朝藿定 A 对照品(批号 J12HB184811,纯度≥98%),朝藿定 B 对照品(批号 J12HB184812,纯度≥98%),朝藿定 C 对照品(批号 N18GB166250,纯度≥98%),淫羊藿苷对照品(批号 T11A11B111118,纯度≥98%)和宝藿苷 I(批号 A20GB158231,纯度≥98%)均购于上海源叶生物科技有限公司。

实验室共采集朝鲜淫羊藿药材 10 批,均采自吉林省通化县,各批次生药材批号及产地见表 1。上述药材经长春中医药大学中药鉴定教研室蔡广知副教授鉴定为正品朝鲜淫羊藿(*E. koreanum* Nakai)药材。

1.2 淫羊藿及其炮制品的制备

取“1.1”项下淫羊藿药材,按照以下方法分别制成淫羊藿生品及淫羊藿羊脂油炙品和淫羊藿盐炙品饮片,每批药材各制得生品及 2 种炮制品各 100 g。

淫羊藿(生品):除去杂质,摘取叶片,喷淋清水,稍润,切丝,干燥[2]。

羊脂油炙淫羊藿(油炙品):取羊脂油加热熔化,加入淫羊藿丝,用文火炒至均匀有光泽,取出,放凉。每 100 kg 淫羊藿,用羊脂油(炼油)20 kg[2]。

盐炙淫羊藿(盐炙品):取淫羊藿丝,置锅内,用文火炒,边炒边洒食盐水,炒至叶表面绿黄色至黄棕色,取出,晾凉,筛去碎片,即得。每 100 kg 淫羊藿,用食盐 20 kg[16-17]。

淫羊藿及其炮制品代码见表 2。

1.3 液相色谱分析条件

1.3.1 供试品溶液及混合对照品溶液的制备 取“1.2”项下淫羊藿及其炮制品粉末(过 3 号筛)约 0.1 g,精密称定,置具塞

锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 10 mL,称定重量,超声处理 1 h,冷却至室温,再称定重量,用 50% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

精密称定朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷 I 对照品适量,加甲醇分别制成每 1 mL 含 0.10 mg 的对照品储备液。精密量取以上 5 个黄酮类化合物对照品储备液适量,加甲醇制成每 1 mL 含 5 个对照品各 10 μg 的混合对照品溶液。

表 1 淫羊藿生药材批号及产地

批号	采集地
TH190250001	通化县清河镇
TH190250002	通化县五道江镇
TH190250003	通化县万良镇
TH190250004	通化县江东乡
TH190250005	通化县朝阳镇
TH190250006	通化县大泉乡
TH190250007	通化县富江乡
TH190250008	通化县青石镇
TH190250009	通化县金斗乡
TH190251001	通化县快大茂镇

表 2 淫羊藿及其炮制品编号

批号	生品	油炙品	盐炙品
TH190250001	R1	O1	S1
TH190250002	R2	O2	S2
TH190250003	R3	O3	S3
TH190250004	R4	O4	S4
TH190250005	R5	O5	S5
TH190250006	R6	O6	S6
TH190250007	R7	O7	S7
TH190250008	R8	O8	S8
TH190250009	R9	O9	S9
TH190251001	R10	O10	S10

1.3.2 色谱条件 色谱柱采用 Agilent ZORBAX SB – C_{18}(4.6 mm × 250 mm,5 μm)色谱柱。流动相为乙腈(A) – 水(B)溶液,梯度洗脱:0 ~ 29 min,24% A;29 ~ 35 min,24→42% A;35 ~ 55 min,42% A;55 ~ 65 min,42% A。检测波长 270 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL,流速 1 mL/min。

1.3.3 方法学考察及线性关系考察 参考文献[18 – 19]中高效液相色谱指纹图谱方法学考察实验,考察 3 个指标:实验仪器的精密度、样品的稳定性及加样回收率,以分离度较好且保留时间居中的淫羊藿苷的色谱峰为参照峰,记录并计算各色谱峰的相对峰面积相对标准偏差(RSD)值。

取“1.3.1”项下制备的混合对照品溶液各 0.1、1、3、5、7 和 10 mL 加甲醇定容至 10 mL。精密吸取上述溶液 5 μL,注入高效液相色谱仪测定峰面积,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标绘制曲线。

1.4 成骨细胞增殖实验

1.4.1 细胞培养 自液氮中取出冻存的 MC3T3 – E1 细胞复苏,接种于含 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 青霉素及链霉素的 α – MEM 完全培养基,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。2 d 换液 1 次,观察细胞状态,待细胞生长、融合至 80% ~ 90% 时,使用胰酶消化及传代,传 3 代后,待细胞活力恢复用于后续实验。

1.4.2 供试药液制备 取“1.2”项下淫羊藿及其炮制品粉末(过 3 号筛)约 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 200 mL,称定重量,超声处理 1 h,冷却至室温,再称定重量,用 50% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过。滤液旋蒸至无醇味,冻干,即得。

精密称取不同量的淫羊藿及其炮制品提取物粉末,加入完全培养基配成 1、5、10、20、40、60、80、100 μg/mL 的淫羊藿及其炮制品给药药液。

1.4.3 CCK8 检测细胞活力 MC3T3 – E1 细胞以 5×10^3 个/孔的密度种于 96 孔培养板上,细胞孵育过夜。移去培养基,为检测不同浓度 DEX 对 MC3T3 – E1 细胞的细胞活性,加入 25、50、100、200 和 400 μmol/L 的 DEX 孵育 24 h。为检测不同浓度淫羊藿及其炮制品对 MC3T3 – E1 细胞的细胞活性,加入 12.5、25、50、100、200 μg/mL 的淫羊藿及其炮制品孵育 24 d,处理结束时,每孔加入 10 μL CCK8 溶液和 90 μL 完全培养基,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 2 h。将波长设置为 450 nm,以检测吸光度。

1.4.4 成骨标志物检测 取 MC3T3 – E1 细胞,3000 r/min 离心 10 min 取上清。使用酶标仪,参照 ELISA 试剂盒说明书,分别测量各个样本的 ALP、OPG 和 OCN 的含量。

1.5 数据处理

按“1.3”项下方法,对各供试品溶液进行高效液相色谱分析测试,每个供试品平行测定 3 次,记录色谱图。选取基线平稳、保留时间稳定的液相色谱图,以. cdf 格式文件导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版),以编号为 R1 的淫羊藿生品谱图作为参照谱图,以淫羊藿苷为基准点进行多点校正,生成指纹图谱并计算相似度数据。高效液相色谱的各原始峰面积数据导入 IBM SPSS Statistics 25.0,使用系统聚类对 5 个黄酮类化合物进行分类,聚类方法使用中位数聚类法,组间距离使用平方欧式距离。

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 统计学软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察及线性关系考察

方法学考察的实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,精密性实验 RSD 为 1.79% ±0.055%,稳定性实验 RSD 为 2.07% ±0.180%,加样回收实验 RSD 为 2.63% ±0.594%,各方法学考察实验的 RSD 值均小于 5% 且波动小,表明本实验条件的仪器精密度高、稳定性好、准确度高,符合液相色谱定性、定量及建立指纹图谱的要求。采用标准曲线法进行定量分析,各待测物的线性方程、相关系数(R)和线性范围如表 3 所示。混合对照品溶液、淫羊藿及其炮制品的供试品溶液色谱图如图 1 所示,结果表明本方法对 5 个黄酮类化合物的专属性良好。

2.2 淫羊藿及其炮制品液相指纹图谱分析

高效液相色谱技术可以较为全面地反映样品中化合物的种类、含量,建立液相色谱指纹图谱有利于对中药的质量进行整体描述与评价,相似度是衡量不同样品之间差异及差异成分的重要指标[20]。指纹图谱相似度数据(编号为 R1 的淫羊藿生品为参照)如表 4 所示,各批次淫羊藿及其炮制品指纹图谱

相似度较高，各谱图相似度均大于 0.9，表明淫羊藿在炮制过程中主要化学成分总体变化趋势基本一致。

表 3 5 个黄酮类化合物的线性方程、相关系数和线性范围

成分	线性方程	*R*	线性范围/(μg)
朝藿定 A	Y = 8 964.5X − 258.18	0.999 9	1.04 ~ 104.00
朝藿定 B	Y = 8 808.2X + 4 645.8	0.999 8	1.13 ~ 113.00
朝藿定 C	Y = 8 866.2X + 1 958.9	0.999 9	1.02 ~ 102.00
淫羊藿苷	Y = 9 575.1X − 1 098.5	1.000 0	1.58 ~ 158.00
宝藿苷 I	Y = 13 961X + 8 609.7	0.999 2	1.25 ~ 125.00

淫羊藿及其炮制品的指纹图谱如插页 XLX 图 2 所示，共匹配出 16 个共有峰，其中有 5 个为已知峰。从其匹配出的峰中看出，随着炮制方法的不同，炮制品的色谱峰相对峰面积呈一定的变化，推测[21]其原因可能是淫羊藿中黄酮类成分在炮制过程中发生相互转化，因此可以利用多元统计分析结果探索这些成分在炮制前后的变化规律。

2.3 聚类分析结果

聚类分析是一种无监督的识别方法，常用于指纹图谱的统计分析[22]。使用系统聚类中 R 型聚类对本文中所测的 5 个黄酮类化合物进行分类，结果详见图 3。由系统聚类结果可知，本文中的 5 个黄酮类化合物被分为两类：一类为朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C，为初级黄酮苷；另一类为淫羊藿苷和宝藿苷 I，为次级黄酮苷。

2.4 含量测定结果及变化趋势

5 个黄酮类化合物的含量测定结果见表 5 和插页 XLX 图 4 所示。结果可以直观看出淫羊藿及其炮制品中朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 的含量均高于淫羊藿苷和宝藿苷 I 的含量。

取表 5 淫羊藿及其炮制品 5 种黄酮类化合物含量测定结果作极坐标气泡图，见图 5。按下式计算气泡半径 R：气泡半径 R = 某批次炮制品某化合物含量/对应批次生品对应化合物含量。

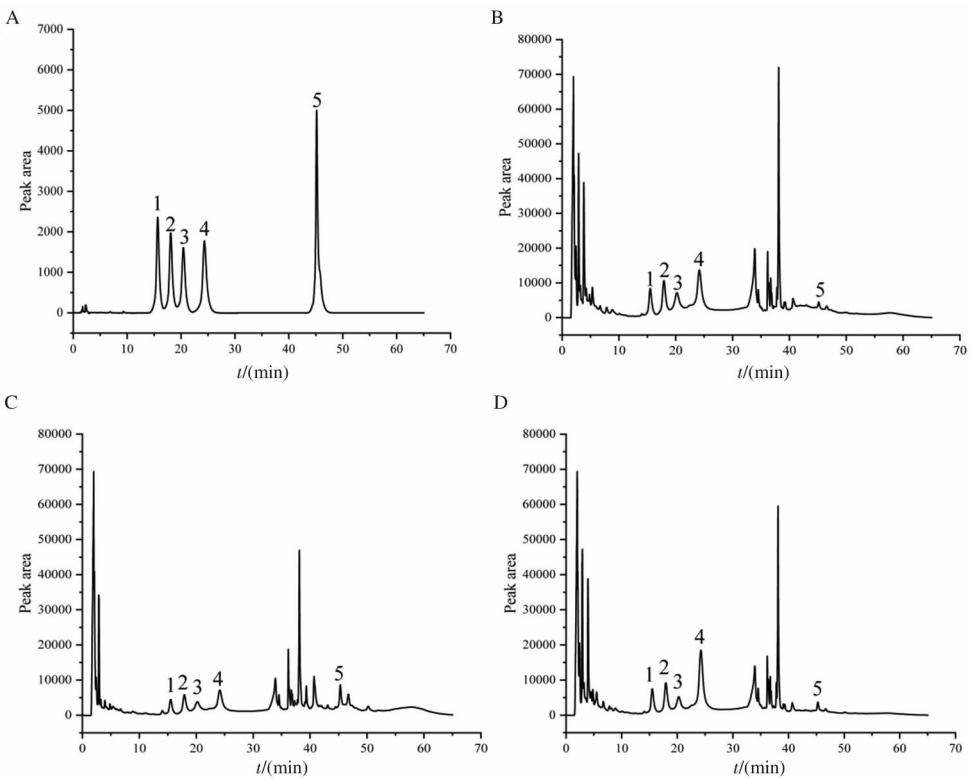
极坐标气泡图结果显示：朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 的气泡半径 R < 1，表明在炮制后整体呈现含量减少的趋势，可能在炮制过程中转变为其他化学成分；淫羊藿苷和宝藿苷 I 的气泡半径 R > 1，表明炮制后呈现含量增加的趋势，可能有与其结构相似的化合物脱去糖基转化为此类成分。

2.5 细胞活力和增殖测定结果

为检测不同浓度 DEX 对 MC3T3 − E1 细胞的细胞活性，加入 25、50、100、200 和 400 μmol/L 的 DEX 孵育 24 h(A)，结果发现在 DEX 浓度为 100 μmol/L 时，细胞存活率为 70% 左右，故选用 DEX 浓度为 100 μmol/L 作为本实验的造模浓度。为检测不同浓度淫羊藿(B. 生品、C. 盐炙品、D. 油炙品)对 MC3T3 − E1 细胞的细胞毒性，加入 12.5、25、50、100、200 μg/mL 的淫羊藿孵育 24 h，结果发现淫羊藿及其炮制品在 200 μg/mL 时对 MC3T3 − E1 的细胞活性均表现出显著的抑制作用，其他浓度均未表现出显著的细胞毒性，故后续使用 100 μg/mL 淫羊藿作为治疗浓度。为检测淫羊藿及其炮制品对 DEX 造成的成骨抑制的增殖作用，本研究利用 100 μmol/L DEX 和 100 μg/mL 淫羊藿及其炮制品共同给药后(E)，发现各淫羊藿组均具有显著的增殖作用，其中，盐炙淫羊藿组的增殖作用最为显著。见插页 LI 图 6。

2.6 成骨标志物检测结果

ALP 在骨形成期间由成骨细胞分泌产生，具有水解磷酸酯的作用，在沉积羟基磷灰石的过程中提供必要的磷酸，同时能够通过水解减轻焦磷酸盐对骨盐形成的抑制作用，其水平是骨



注：1. 朝藿定 A；2. 朝藿定 B；3. 朝藿定 C；4. 淫羊藿苷；5. 宝藿苷 I。

图 1 混合对照品溶液(A)、生品(B)、油炙品(C)、盐炙品(D)HPLC 图

表 4 淫羊藿及其炮制品的指纹图谱相似度数据

图谱编号	样品编号	相似度
S1	R1	0.993
S2	R2	0.988
S3	R3	0.984
S4	R4	0.986
S5	R5	0.991
S6	R6	0.976
S7	R7	0.990
S8	R8	0.992
S9	R9	0.996
S10	R10	0.983
S11	O1	0.995
S12	O2	0.994
S13	O3	0.966
S14	O4	0.981
S15	O5	0.995
S16	O6	0.993
S17	O7	0.994
S18	O8	0.997
S19	O9	0.996
S20	O10	0.987
S21	S1	0.938
S22	S2	0.996
S23	S3	0.972
S24	S4	0.977
S25	S5	0.967
S26	S6	0.989
S27	S7	0.994
S28	S8	0.995
S29	S9	0.974
S30	S10	0.976

表 5 淫羊藿及其炮制品中 5 个黄酮类化合物含量测定结果

样品编号	朝藿定 A /(%)	朝藿定 B /(%)	朝藿定 C /(%)	淫羊藿苷 /(%)	宝藿苷 I /(%)
R1	1.894 8	3.042 6	2.154 6	0.323 9	0.082 4
R2	2.031 3	3.474 6	2.667 9	0.336 7	0.017 1
R3	1.588 5	2.542 2	1.611 3	0.311 0	0.049 3
R4	1.621 8	2.683 8	2.109 4	0.290 9	0.103 9
R5	1.935 6	3.182 9	2.451 9	0.326 3	0.033 2
R6	1.687 2	2.707 6	1.625 3	0.321 2	0.010 5
R7	2.259 3	3.702 0	2.704 7	0.366 2	0.023 9
R8	2.125 7	3.516 3	2.449 7	0.347 2	0.026 1
R9	1.283 2	2.226 1	1.729 9	0.270 1	0.035 2
R10	3.381 1	5.728 2	5.647 2	0.757 4	0.021 7
O1	1.748 1	2.885 7	2.026 9	0.374 8	0.041 2
O2	1.906 3	3.254 4	2.386 9	0.423 8	0.072 0
O3	1.172 3	1.839 3	2.423 2	0.235 2	0.159 2
O4	1.479 2	2.499 9	1.893 3	0.325 6	0.140 5
O5	1.678 6	2.714 6	1.855 6	0.394 0	0.048 5
O6	1.741 4	2.871 0	1.841 5	0.673 8	0.111 0
O7	1.991 6	3.374 8	2.393 7	0.419 6	0.050 0
O8	1.780 2	3.048 4	2.077 4	0.376 3	0.054 2
O9	1.736 0	2.928 1	2.184 6	0.375 1	0.056 9
O10	2.672 9	4.488 2	4.008 3	0.777 1	0.027 6
S1	1.634 4	2.586 5	0.762 1	0.803 4	0.111 6
S2	1.813 3	3.094 7	1.853 9	0.312 3	0.039 9
S3	1.157 0	1.819 8	0.712 8	0.330 7	0.108 6
S4	1.457 5	2.365 2	1.010 4	0.493 4	0.130 3
S5	1.656 3	2.545 5	0.863 2	0.631 4	0.063 0
S6	2.087 8	3.470 8	1.947 3	0.603 4	0.048 4
S7	1.734 8	2.900 9	1.357 0	0.488 2	0.068 6
S8	1.879 6	3.023 6	1.593 7	0.267 6	0.027 6
S9	1.751 6	3.006 5	1.486 6	0.492 4	0.054 6
S10	2.586 0	4.144 4	2.070 5	0.702 2	0.034 5

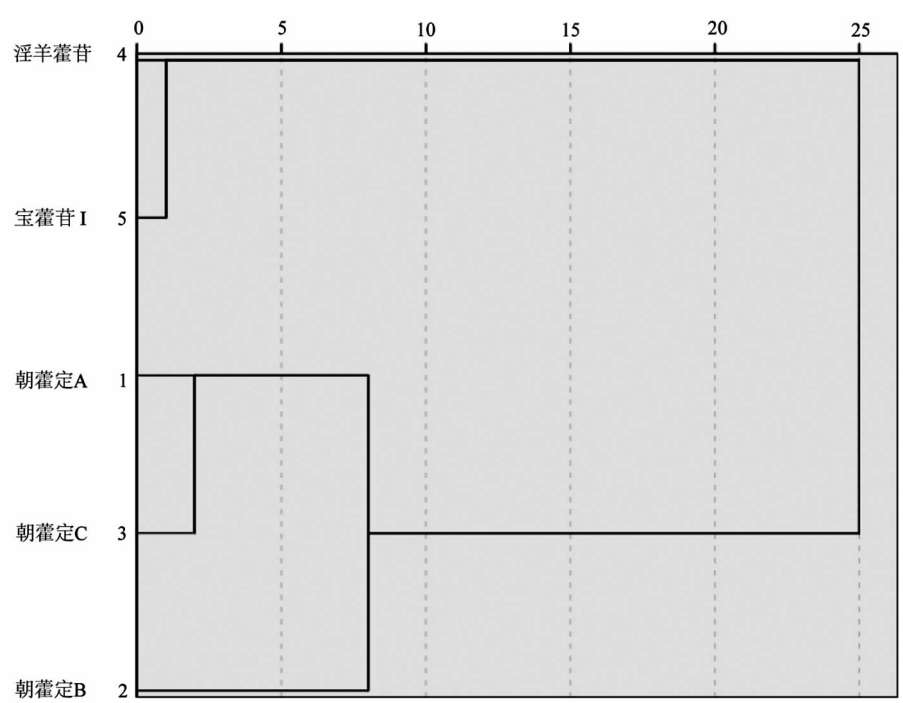


图 3 5 个黄酮化合物的聚类分析结果

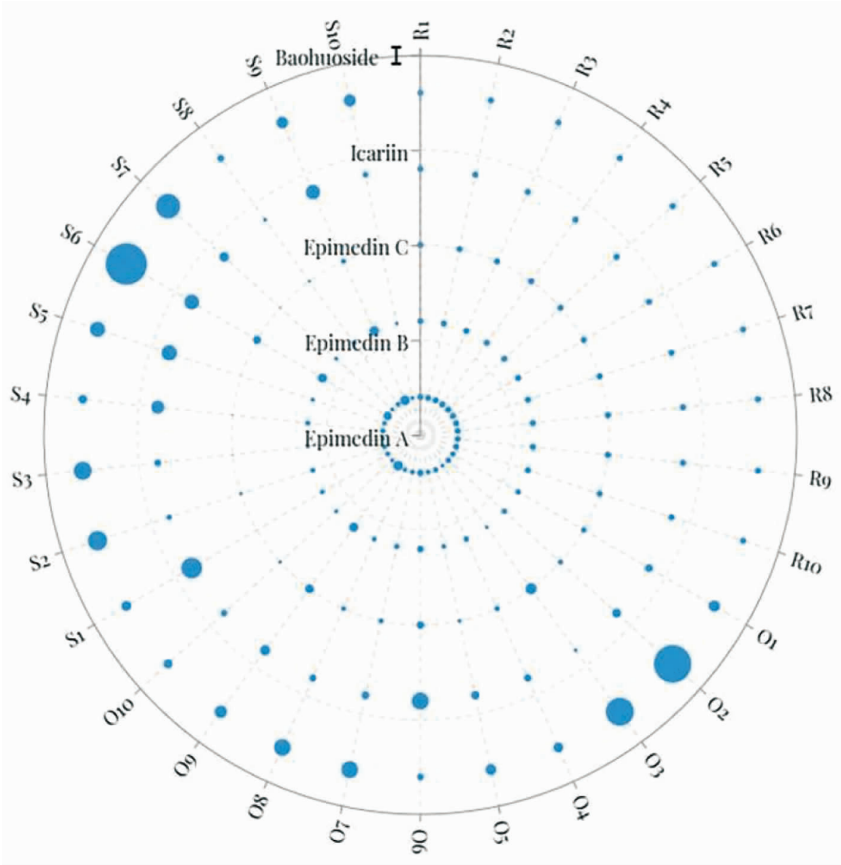


图 5 5 个黄酮化合物在生品、油炙品、盐炙品中的变化趋势极坐标气泡图

形成功能增强或减弱的一个反映，在本研究中，淫羊藿治疗后改善了由 DEX 降低的细胞上清中 ALP 的含量(A)。OPG 属于可溶性蛋白质，可抑制破骨细胞分化、成熟，能够减少骨量丢失，保护骨组织，与 NC 组相比，DEX 组 OPG 水平降低明显，骨保护素显著降低，淫羊藿给药后 OPG 水平明显升高，且差异具有显著性，说明淫羊藿给药后能够调节机体骨代谢，促进 OPG 的形成及释放，继而促进新骨形成，改善骨质，提升骨密度(B)。除此之外，OCN 比 ALP 对骨形成功能的影响更为敏感，它是一种来自成骨细胞的非胶原蛋白，大多数嵌入在骨基质中，含有 3 种 γ－羧基谷氨酸残基，它们与骨羟基磷灰石基质具有高亲和力，测定 OCN 既能反映成骨细胞活性，又能反映骨转换的程度，且 OCN 已被发现是骨质疏松症的重点生物标志物。结果显示，淫羊藿组细胞上清 OCN 水平明显高于 DEX 组，且差异具有统计学意义(C)。三者结果均表明淫羊藿能够改善骨基质矿化水平、提高骨转换和增强骨形成功能，且盐炙淫羊藿组对比其他组在 ALP 和 OPG 水平上具有更为显著的治疗作用。见插页 LI 图 7。

3 结果与讨论

本研究利用 HPLC 测定了淫羊藿及其炮制品中 5 个黄酮类化合物的含量，方法简便、稳定。采用指纹图谱相似度分析和聚类分析对 5 个黄酮类化合物含量的差异进行分析，从而对淫羊藿中黄酮类化合物的变化进行研究。5 个黄酮类化合物的结构如图 8 所示，结合聚类分析和含量测定的结果，发现淫羊藿中的初级黄酮苷由于糖苷键不稳定，受热易断裂，经炮制后脱去部分糖基后成为次级黄酮苷，因此初级黄酮苷含量降

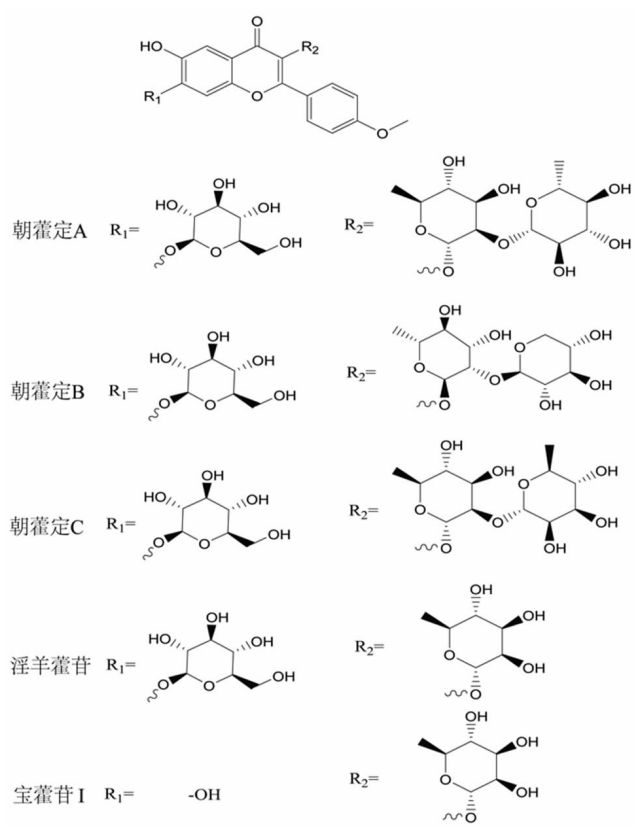


图 8 朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿苷 I 的化学结构

低,次级黄酮苷含量增加。但是辅料的加入使得各炮制品之间的指纹图谱相似度出现差异:一是淫羊藿油炙品指纹图谱相似度数据稳定性更好;二是含量测定结果显示,次级黄酮苷中脂溶性更强的宝藿苷Ⅰ在油炙品中比在盐炙品中含量高,淫羊藿苷则相反。造成上述结果的原因可能是:羊脂油属于脂溶性辅料,食盐水属于水溶离子性辅料;炮制过程中得到的宝藿苷Ⅰ不断地向辅料中聚集,使得化学平衡被打破,正向反应不断进行,因此初级黄酮苷和次级黄酮苷在炮制前后变化规律截然相反。

以上结论提示这两类化合物含量炮制后变化趋势不同可以为寻找淫羊藿炮制改变药性的潜在物质基础奠定基础,如孙娥等[23]从中药的"ADME"角度对炙淫羊藿的炮制机理进行探索,提出了胶束假说,认为淫羊藿在炮制及服用的过程中,淫羊藿中的次级黄酮苷类化合物与胆酸盐、脂肪酸形成热力学和动力学稳定的胶束,从而提高生物利用度。

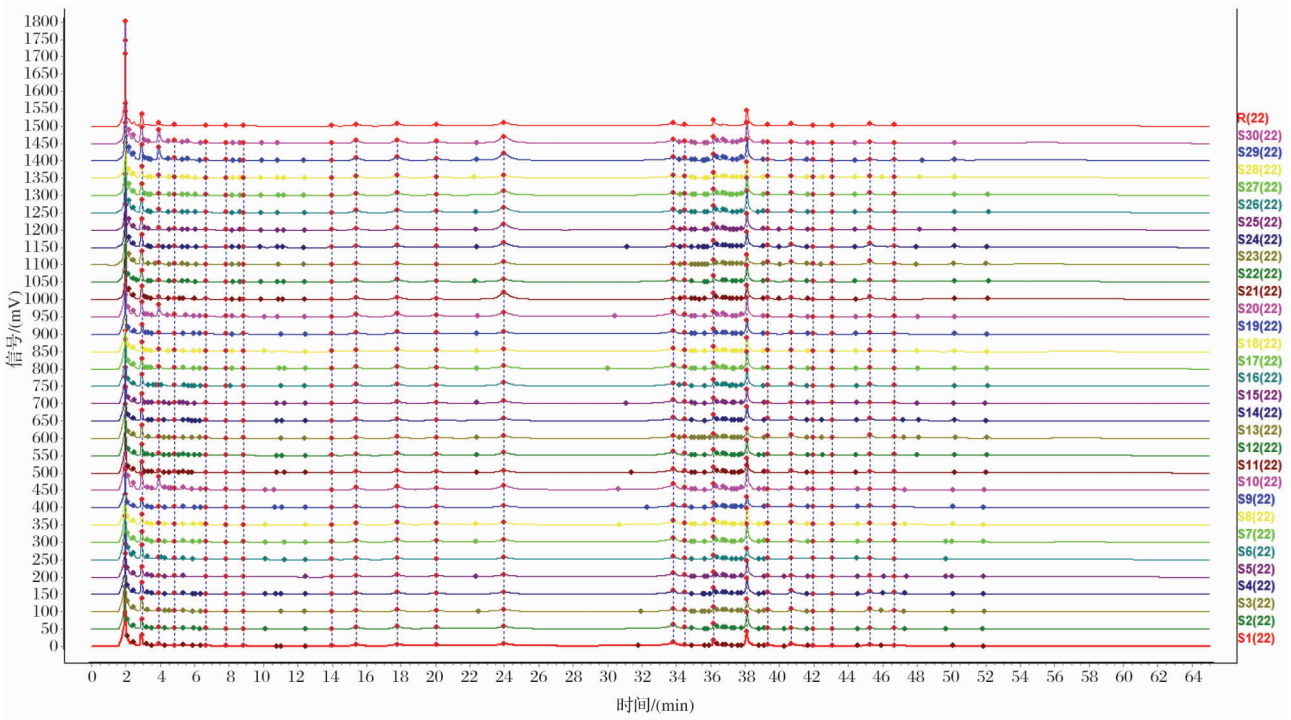
以往的大量研究结果表明,淫羊藿苷在骨质疏松症的治疗上具有显著的作用,能够提高斑马鱼和去卵巢大鼠的骨密度、OPG 水平,降低核因子 κ B 受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear factor - κ B ligand, RANKL)水平[24]。Ⅰ型胶原在骨基质中含量丰富,胶原蛋白Ⅰ型 α2 链(collagen type Ⅰ alpha 2 chain,COL1A2)对骨形成至关重要,淫羊藿苷可以通过提高 COL1A2 水平、降低骨吸收标志物抗酒石酸酸性磷酸酶 5b(tartrate - resistant acidphosphatase 5b,TRAP5b)水平,促进卵巢切除大鼠骨质疏松症后骨折模型的骨形成[25]。淫羊藿苷还可以通过降低 RANKL/OPG 的比例[26],抑制肺癌的骨转移,减轻其导致的溶骨性骨破坏。淫羊藿经盐炙后淫羊藿苷含量增加,对 DEX 引起的 MC3T3 - E1 细胞成骨抑制的增殖作用显著增强,这提示淫羊藿不同炮制品可以产生不同的作用趋势或者临床疗效可能与黄酮类化合物含量的变化有关,也为深入研究淫羊藿炮制原理提供了思路。

参考文献

[1] 王哲, 李波, 刘铭琪, 等. 基于 GIS 技术的吉林省朝鲜淫羊藿生态特征及适生区研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(7): 891 - 898.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
[3] 闫莉, 刘玉翠, 王志纯, 等. 栽培条件对朝鲜淫羊藿生理特性与药材质量影响研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(9): 2258 - 2262.
[4] BI Z Y, ZHANG W, YAN X Y. Anti - inflammatory and immunoregulatory effects of icariin and icaritin[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113180.
[5] 李莉, 王嘉瑞, 王晶, 等. 淫羊藿的主要化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 143 - 151.
[6] BAI L, LIU Y P, ZHANG X H, et al. Osteoporosis remission *via* an anti - inflammaging effect by icariin activated autophagy[J]. Biomaterials, 2023, 297: 122125.
[7] SONG L J, HAN Q X, DING Z B, et al. Icariin ameliorates the cuprizone - induced demyelination associated with antioxidation and anti - inflammation[J]. Inflammopharmacology, 2024, 32(1): 809 - 823.
[8] YANG S L, ZHANG X C, LIAO X F, et al. Icariin regulates RANKL - induced osteoclast differentiation *via* the ERα/c - Src/RANK signaling[J]. Biomed Mater, 2024, 19(2): 025049.
[9] XIANG S Y, ZHAO L L, TANG C, et al. Icariin inhibits osteoblast ferroptosis *via* Nrf2/HO - 1 signaling and enhances healing of osteoporotic fractures[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 965: 176244.
[10] 吴梅剑宗, 秦佳佳, 刘海全. 不同浓度淫羊藿苷对大鼠脂肪干细胞成骨分化相关因子的体外研究[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(12): 1249 - 1256.
[11] 李倩楠, 陈大琴, 吕春明, 等. 淫羊藿苷通过 Nrf2/HO - 1/GPX4 信号通路调节破骨细胞铁代谢的机制研究[J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(S1): 232 - 239.
[12] SI Y H, LI Y, GU K, et al. Icariin ameliorates osteoporosis in ovariectomized rats by targeting Cullin 3/Nrf2/OH pathway for osteoclast inhibition[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 173: 116422.
[13] SUN L J, LI C, WEN X H, et al. Icariin stimulates hFOB 1.19 osteoblast proliferation and differentiation *via* OPG/RANKL mediated by the estrogen receptor[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2021, 22(1): 168 - 175.
[14] 王雅莉, 胡光, 张倩, 等. 炮制对中药的化学成分及药理作用的影响[J]. 重庆理工大学学报(自然科学), 2019, 33(5): 127 - 136.
[15] 周洁,李婕,魏冰斌,等. 基于指纹图谱及网络药理学的当归补血汤药材炮制前后差异质量标志物研究[J]. 中国中药杂志, 2024,49(9):2451 - 2460.
[16] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药炮制规范[M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2009: 221.
[17] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药饮片标准[S]. 昆明: 云南美术出版社, 2005.
[18] 许婷, 黄萌萌, 李瑞云, 等. 多基原淫羊藿不同部位质量评价研究[J]. 中草药, 2020, 51(1): 190 - 196.
[19] 尹艳微, 贾琪, 马文娟, 等. 淫羊藿药材的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(5): 482 - 485.
[20] 龙立梅, 宋沙沙, 曹学丽. 基于香气成分气相色谱 - 质谱指纹图谱的判别分析和相似度评价用于绿茶等级差异研究[J]. 色谱, 2019, 37(3): 325 - 330.
[21] 曾华婷, 郭健, 陈彦. 淫羊藿素药理作用及其新型给药系统的研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(20): 5372 - 5380.
[22] 牛晓静, 鲁静, 段晓颖, 等. 基于聚类分析的淫羊藿黄酮类成分的质量分析研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2386 - 2389.
[23] 孙娥, 徐凤娟, 张振海, 等. 基于化学成分转化 - 肠吸收屏障网络耦联作用的中药炮制机制研究体系的构建[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 370 - 377.
[24] JIANG J, XIAO S C, XU X M, et al. Isomeric flavonoid aglycones derived from Epimedii Folium exerted different intensities in anti - osteoporosis through OPG/RANKL protein targets[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 277 - 286.
[25] ZHANG Y, HAN B, WEI Y, et al. Icariin promotes fracture healing in ovariectomized rats[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e924554.
[26] RUILIAN Z, YING G, HONGMEI S, et al. Exploration of the effect of icariin on nude mice with lung cancer bone metastasis *via* the OPG/RANKL/RANK system[J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 2011625.

淫羊藿及其炮制品化学组成及对 MC3T3 – E1 细胞的增殖和成骨作用研究

（正文见 178 – 184 页）



注：生品 S1 ~ S10；油炙品 S11 ~ S20；盐炙品 S21 ~ S30。

图 2　淫羊藿及其炮制品的指纹图谱

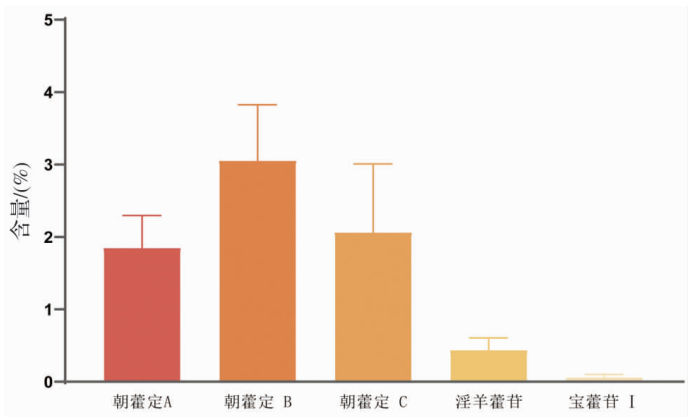
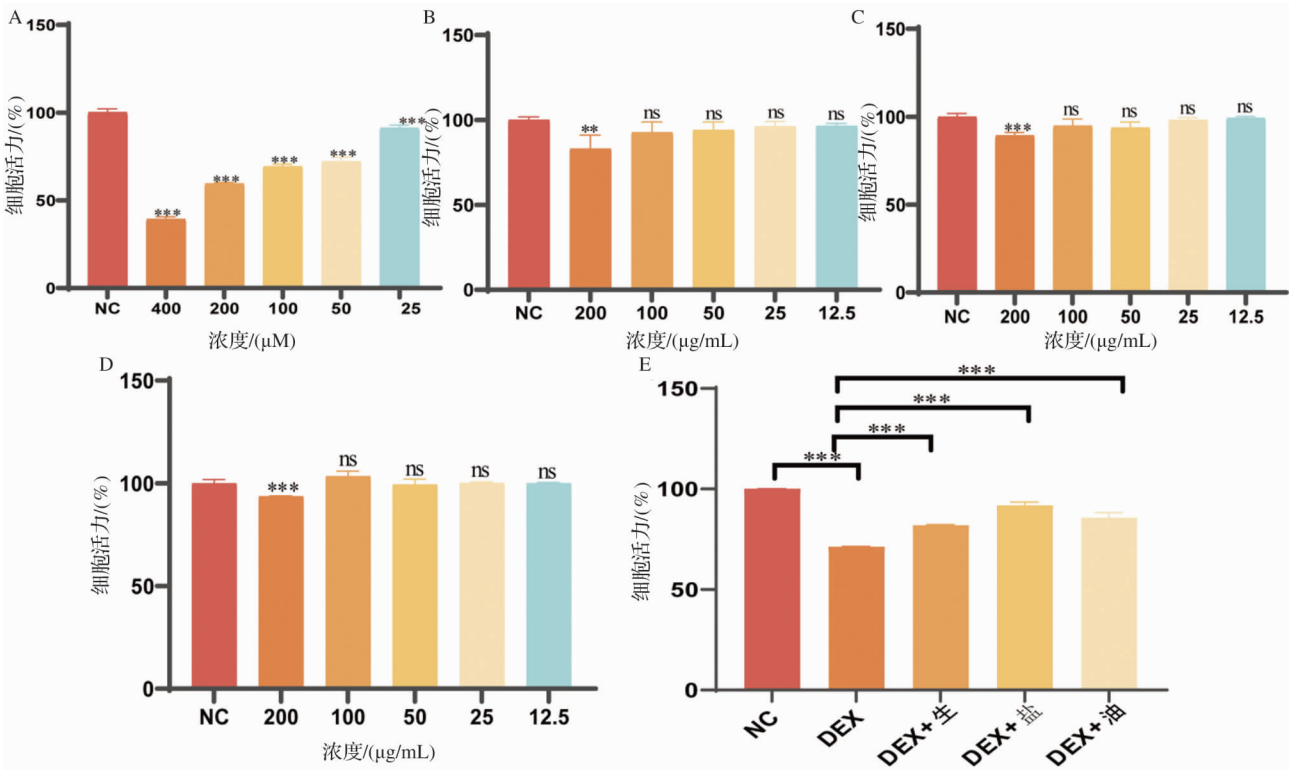
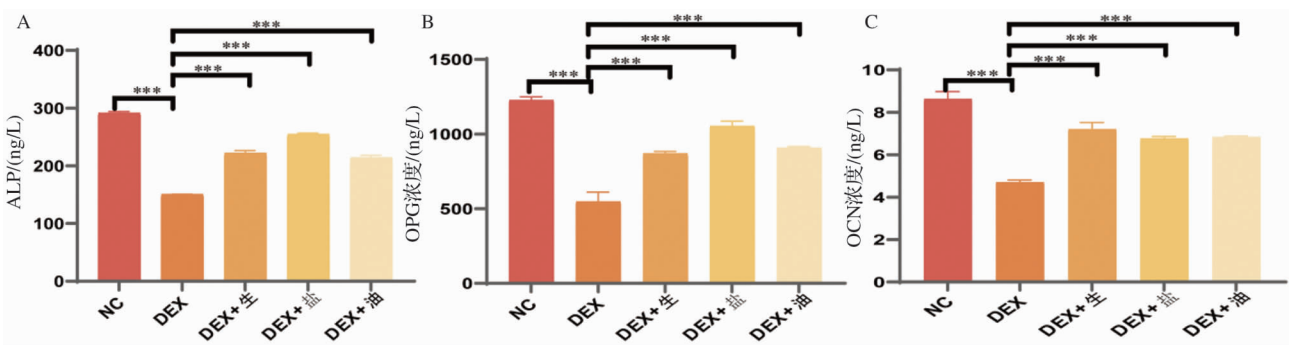


图 4　淫羊藿及其炮制品中 5 个黄酮类化合物含量测定结果图



注：A. 地塞米松造模浓度的筛选；B. 生品细胞毒的筛选；C. 盐炙品细胞毒的筛选；D. 油炙品细胞毒的筛选；E. 淫羊藿及其炮制品对 DEX 造成的成骨抑制的增殖作用；DEX：地塞米松；NC：空白对照组；＊＊$P<0.05$；＊＊＊$P<0.01$。

图 6　细胞活力及细胞增殖测定结果



注：DEX：地塞米松；NC：空白对照组；＊＊$P<0.05$；＊＊＊$P<0.01$。

图 7　淫羊藿治疗对经 DEX 处理的 MC3T3－E1 细胞上清中 ALP(A)、OPG(B)和 OCN(C)的表达的作用