

基于化学指纹-细胞代谢组学相关性分析淫羊藿及 巫山淫羊藿促成骨分化的药效物质基础

黄云芬¹, 赵林超¹, 吴松南¹, 徐芳竹¹, 高慧¹, 陈雪莲², 袁子民^{1*}, 王静^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 山东省妇幼保健院, 济南 250000)

[摘要] 目的: 确定淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的药效物质基础, 并建立一种基于化学指纹与细胞代谢组学相关性分析中药药效物质基础的方法。方法: 采用超高效液相-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)分析4种基原15批淫羊藿和3批巫山淫羊藿药材的化学指纹, 通过偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)对不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹峰面积进行统计学分析; 运用细胞增殖与活性检测法(CCK-8)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)分别检测淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1成骨前体细胞增殖活力及成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性的影响, 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1细胞代谢组学的影响。构建细胞代谢组峰表, 并引入平均药效作用指标 $\text{mean } Y_0$, 采用PLS及Pearson相关性分析计算各组 $\text{mean } Y_0$ 和化学指纹的相关性, 依据变量重要性投影(VIP)值>1筛选淫羊藿促成骨分化的药效成分, 依据各组的 $\text{mean } Y_0$ 评价淫羊藿及巫山淫羊藿的药效作用。结果: 各基原淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹可完全分离。与空白组比较, 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿组MC3T3-E1细胞活力均明显增加, 淫羊藿(甘肃)、朝鲜淫羊藿、柔毛淫羊藿组均可明显增强MC3T3-E1细胞ALP活性($P < 0.05$)。细胞代谢组学结果显示, 空白组与模型组有明显的分离趋势, 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿与模型组距离有差异, 表明不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化作用具有差异。化学指纹-细胞代谢组学整合分析筛选出9个成分与药效关系密切, 包括双藜苷B、朝藜定C、淫羊藿苷、宝藜苷I、yinyanghuo B、 β -脱水淫羊藿素、木兰花碱、隐绿原酸和槲皮素, 以朝鲜淫羊藿促成骨分化的药效作用最强。结论: 该研究确定了不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的药效物质基础多为黄酮类、生物碱类和有机酸类成分, 为中药药效相关成分筛选及中药药效预测提供思路与方法。

[关键词] 淫羊藿; 巫山淫羊藿; 药效物质基础; 细胞代谢组学; 化学指纹; 促成骨分化; 超高效液相-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)

[中图分类号] R22; R969.1; R28; O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)17-0155-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240869 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240418.1457.001>

[网络出版日期] 2024-04-19 18:03:17

Pharmacodynamic Substances in Promoting Osteogenic Differentiation of Epimedii Folium and Epimedii Wushanensis Folium Based on Chemical Fingerprint-cell Metabolomics Correlation Analysis

HUANG Yunfen¹, ZHAO Linchao¹, WU Songnan¹, XU Fangzhu¹, GAO Hui¹,
CHEN Xuelian², YUAN Zimin^{1*}, WANG Jing^{1*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Shandong Maternal and Child Health Care Hospital, Jinan 250000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the pharmacodynamic substance basis of Epimedii Folium (EF)

[收稿日期] 2024-01-23

[基金项目] 国家中医药管理局中药炮制技术传承创新项目(GZY-KJS-2022-049)

[第一作者] 黄云芬, 在读硕士, 从事中药质量评价及物质基础研究, E-mail: 2252937353@qq.com

[通信作者] * 王静, 博士, 副教授, 从事中药质量评价及物质基础研究, E-mail: wjyuanmeng@163.com;

* 袁子民, 博士, 教授, 从事中药药剂及炮制机理研究, Tel: 0411-85890145, E-mail: yuanzmin@163.com

and *Epimedii Wushanensis Folium* (EWF) in promoting osteogenic differentiation, and to establish a method to analyze the material basis of Chinese materia medica based on the correlation between chemical fingerprint and cellular metabolomics. **Method:** The chemical fingerprints of 15 batches of EF with 4 species and 3 batches of EWF were analyzed by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS), and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was used to analyze the peak areas of chemical fingerprints of samples. The effects of different samples on proliferative activity of MC3T3-E1 osteoblast precursors, as well as the activity of alkaline phosphatase (ALP) in osteoblasts were detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the same time, UPLC-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to analyze the effects of different samples on the metabolomics of MC3T3-E1 cells, then metabolic peak table of osteogenic differentiation cells was constructed, and pharmacodynamic index mean Y_0 was introduced into the peak table. PLS was used to calculate mean Y_0 of each group, and the mean Y_0 was added to the peak table of chemical fingerprint to construct the correlation between chemical fingerprint and cell metabolome, the pharmacodynamic components of EF and EWF that promote bone differentiation were screened according to variable importance in the projection (VIP) value > 1. The pharmacodynamic effects of EF and EWF were evaluated according to the mean Y_0 of each group. **Result:** The chemical fingerprints of EF with different origins and EWF were completely separated. Compared with the blank group, the activity of MC3T3-E1 cells in EF and EWF groups was significantly increased, the activity of ALP in the *Epimedium brevicornu* (Gansu province), *E. koreanum* and *E. pubescens* groups was significantly increased ($P < 0.05$). The results of cell metabolomics showed that the blank group and the model group had an obvious trend of separation. EF with different origins and EWF had different distance from the model group, indicating that EF with different origins and EWF had different effect on promoting osteogenic differentiation. Chemical fingerprint-cell metabolomics integration analysis screened 9 components closely related to the efficacy of EF and EWF, including diphyllouside B, epimedin C, icariin, baohuoside I, yinyanghuo B, β -anhydroicaritin, magnoflorine, cryptochlorogenic acid and quercetin. *E. koreanum* had the strongest effect on promoting osteogenic differentiation. **Conclusion:** This study determined that the material basis of EF and EWF promoting osteogenic differentiation were mostly flavonoids, alkaloids and organic acids, which provided ideas and methods for the screening of pharmacodynamic components and the prediction of therapeutic effect of Chinese materia medica.

[Keywords] *Epimedii Folium*; *Epimedii Wushanensis Folium*; pharmacodynamic substances; cell metabolomics; chemical fingerprint; promoting osteogenic differentiation; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)

淫羊藿味辛、甘，温，归肝、肾经，具有补肾阳，强筋骨，祛风湿的功效。主要用于肾阳虚衰，阳痿遗精，筋骨痿软，风湿痹痛，麻木拘挛等^[1]。淫羊藿主要含有淫羊藿苷、朝藿定A，朝藿定B，朝藿定C、宝藿苷I等黄酮类化学成分^[2-3]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定其来源为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu*、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* 的干燥叶。巫山淫羊藿在2020年版《中国药典》单独列出，为小檗科植物巫山淫羊藿 *E. wushanense* 的干燥叶，其性味归经及功效与淫羊

藿相同。研究发现，不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的化学成分具有差异性，其中柔毛淫羊藿化学成分差异最明显，而朝鲜淫羊藿与箭叶淫羊藿，淫羊藿与巫山淫羊藿之间的化学成分及含量相似^[4]。

淫羊藿及巫山淫羊藿临床应用广泛，具有抗骨质疏松、抗肿瘤、降血糖、抗抑郁、抗炎等多种药理作用^[5-11]。骨质疏松症是一种以骨微结构破坏和骨质流失为特征的常见骨科疾病^[12-13]，机体内成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收功能失衡是导致骨质疏松症发生的重要原因^[14]。目前有文献报道淫羊藿水提取物及药渣对骨质疏松有治疗

作用^[15-16]。淫羊藿总黄酮通过骨形态发生蛋白(BMP)/Runx2相关转录因子2(Runx2)/特异性转录因子(Osx)信号通路对绝经后骨质疏松模型大鼠有治疗作用^[17],淫羊藿黄酮低糖苷可通过改善股骨的骨丢失程度,增加骨小梁数量和厚度,降低骨小梁孔隙度和分离度,促进骨基质钙化,加快骨形成,发挥抗继发性骨质疏松疗效^[18]。淫羊藿苷可有效抑制磷酸酶-张力蛋白基因(PTEN)激活成骨基因表达,促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化,缓解大鼠骨质疏松症^[19]。宝藿苷Ⅱ能够促进MC3T3-E1成骨前体细胞增殖分化,具有抗骨质疏松的作用^[20]。相关研究多集中考察淫羊藿中黄酮类成分,而其他成分是否有抗骨质疏松作用未见报道,淫羊藿抗骨质疏松的单体成分研究仍不够深入和全面。

代谢组学可动态分析生物体代谢情况变化的整体性、系统性特点与中药多靶点、多途径的作用特点相一致^[21],被广泛运用在中药作用机制及物质基础的研究。因此本研究以不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿为研究对象,采用细胞代谢组学与化学指纹的整合分析,确定淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的药效物质基础,旨在为中药药效物质基础的筛选提供新的思路,并为淫羊藿及巫山淫羊藿抗骨质疏松的深入研究提供科学依据。

1 材料

HF240型二氧化碳培养箱[立新仪器(上海)有限公司],SCI506型低速离心机(赛洛捷克生物科技有限公司),HBS-1096A型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司),MS105DU型十万分之一分析天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司),H1850R型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),CV600型冷冻真空浓缩仪(北京吉艾姆科技有限公司),Vanquish型超高效液相色谱仪、Q Exactive型四极杆-静电场轨道阱质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),Nexera LC-40型高效液相色谱仪(日本岛津公司),Zeno TOF7600型质谱仪(美国Sciex公司)。

地塞米松、 β -甘油磷酸钠五水合物、维生素C、细胞增殖与活性检测法(CCK-8)试剂盒、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为404B021、1216P021、222Q0212、1112U011、710N0310、P1010),宝藿苷Ⅰ、朝藿定B、淫羊藿苷、朝藿定C对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为wkq20062306, wkq19111505, wkq0042802,

wkq20042308,纯度均>98.0%),隐绿原酸、朝藿定A1、 β -脱水淫羊藿素、木兰花碱对照品(乐美天医药德思特生物有限公司,批号分别为DSTDY003503、DST30703-064、DST210829-044、DSTDY000402,纯度均>98.0%),槲皮素对照品(纯度>98%)、TritonX-100、 α -EME培养基、0.25% Trypsin-EDTA、1%青-链霉素双抗(大连美仑生物技术有限公司,批号A0409BS、MB2486、MA0216、MA0232-Nov-23H2、MA0110-May-12I),成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒、蛋白定量法(BCA)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,批号分别为20230708、20230708),胎牛血清(FBS,德国PAN-Seratech公司,批号ST210101),乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。18批淫羊藿药材经辽宁中医药大学药用植物教研室尹海波教授鉴定,为小檗科植物淫羊藿*E. brevicomu*,箭叶淫羊藿*E. sagittatum*,柔毛淫羊藿*E. Pubescens*,巫山淫羊藿*E. wushanense*或朝鲜淫羊藿*E. koreanum*的干燥叶。具体信息见表1。

表1 淫羊藿及巫山淫羊藿药材信息
Table 1 Information of Epimedium Folium and Epimedium Wushanensis Folium

编号	基原	产地	批号
X1	淫羊藿	甘肃省	20201115
X2	淫羊藿	甘肃省	20201117
X3	淫羊藿	甘肃省	20201118
Y1	淫羊藿	陕西省商洛市	20200621
Y2	淫羊藿	陕西省商洛市	20200613
Y3	淫羊藿	陕西省商洛市	20200615
W1	巫山淫羊藿	贵州黔南州	20201101
W2	巫山淫羊藿	贵州黔南州	20201102
W3	巫山淫羊藿	贵州黔南州	20201103
C1	朝鲜淫羊藿	辽宁省本溪桓仁	20200715
C2	朝鲜淫羊藿	辽宁省本溪桓仁	20200618
C3	朝鲜淫羊藿	辽宁省本溪桓仁	20200617
R1	柔毛淫羊藿	甘肃陇南市	20200601
R2	柔毛淫羊藿	甘肃陇南市	20200602
R3	柔毛淫羊藿	甘肃陇南市	20200603
J1	箭叶淫羊藿	贵州毕节市	20201109
J2	箭叶淫羊藿	贵州毕节市	20201106
J3	箭叶淫羊藿	贵州毕节市	20201110

MC3T3-E1小鼠胚胎成骨前体细胞购自北京协和细胞资源中心,订单编号2023062127457,实验时

传至6~8代。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 分别称取不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿各10 g,加10倍量50%乙醇,回流提取1.5 h,过滤后加8倍量50%乙醇回流提取1.5 h,合并2次滤液,减压浓缩,残渣用50%乙醇配制成质量浓度为 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,用于化学指纹研究。其中X1、Y1、W1、C1、R1、J1的供试品溶液用PBS稀释为终质量浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液,用于细胞代谢组学研究。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别取宝藿苷I,朝藿定B,朝藿定C,淫羊藿苷,朝藿定A1,隐绿原酸,槲皮素, β -脱水淫羊藿素,木兰花碱对照品1.19、1.20、2.18、0.81、1.69、2.06、1.32、2.25、2.20 mg置于10 mL量瓶中,甲醇定容制成混合对照品溶液。

2.2 化学指纹分析

2.2.1 检测条件 正离子模式色谱条件为Waters BEH C₈色谱柱($2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~0.5 min, 5%B; 0.5~2 min, 5%~40%B; 2~8 min, 40%~100%B; 8~10 min, 100%B; 10~10.1 min, 100%~5%B; 10.1~12 min, 5%B),进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$,流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。负离子模式色谱条件为ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱($2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$),流动相含 $6.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_4\text{HCO}_3$ 的水溶液(A)-含 $6.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_4\text{HCO}_3$ 的95%甲醇水溶液(B)梯度洗脱(0~0.5 min, 2%B; 0.5~2 min, 2%~40%B; 2~8 min, 40%~100%B; 8~10 min, 100%B; 10~10.1 min, 100%~2%B; 10.1~12 min, 2%B),进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$,流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。质谱条件为,电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,喷雾电压 3.50 kV (ESI⁺)、 3.00 kV (ESI⁻),毛细管温度 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$,离子源温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,辅助加热气温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$,辅助气流量45 arb,鞘气体流量10 arb,全扫描模式采集,扫描范围 m/z 80~1 200,全MS扫描分辨率70 000,MS/MS分辨率17 500。

2.2.2 化学成分鉴定 根据中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中医药综合数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>)等在线数据库及相关文献建立的淫羊藿化学成分谱库,通过化学成分的分子量、二

级碎片离子信息、保留时间(t_R)及对照品比对等,对化学成分进行最终确认。

2.2.3 数据处理 质谱所得原始数据采用Trace Finder ver3.2.512.0数据处理软件进行峰匹配,去除背景噪音,整合数据得到。不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材的化学指纹峰表采用SIMICA 13.0软件进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)。

2.3 CCK-8检测 MC3T3-E1细胞活力 每孔加 α -MEM完全培养基(含 α -MEM基础培养基、10% FBS、1%青-链霉素溶液,下同) $180\text{ }\mu\text{L}$,分别取对数生长期的MC3T3-E1细胞,以 1.0×10^4 个/孔的细胞密度接种在96孔培养板上,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养,培养12 h后,待细胞贴壁细胞数约占60%~80%,即可给予药物干预。细胞分为培养基组(无细胞)、空白组(培养基+细胞)、给药组[培养基+细胞+不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿供试品溶液 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (终质量浓度)],每个处理组设置4个复孔,给药后置于恒温培养箱中培养24 h后,取出培养板,弃去培养液,更换新鲜培养液,每孔加入CCK-8试剂 $10\text{ }\mu\text{L}$,在培养箱中继续培养2 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度 A ,计算细胞活力。细胞活力= $(A_{\text{加药}}-A_{\text{空白}})/(A_{\text{未加药}}-A_{\text{空白}})\times 100\%$ 。

2.4 MC3T3-E1细胞中ALP活性的检测 取对数生长期、生长状态良好的MC3T3-E1细胞,PBS清洗2次,用0.25%胰蛋白酶消化,细胞皱缩时,加入 α -MEM完全培养基停止消化, $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min(离心半径10 cm),弃去上清液,完全培养基重悬细胞,调整细胞悬液密度为 2×10^4 个/孔,按照每孔 $500\text{ }\mu\text{L}$ 接种于24孔细胞板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养12 h后,待贴壁细胞约为60%~80%,即可给予药物干预细胞分组为空白组(培养基)、模型组(培养基+成骨诱导液)、给药组[培养基+成骨诱导液+不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿供试品溶液 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (终质量浓度)]。成骨诱导液为 $0.05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 维生素C、 $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\beta$ -甘油磷酸钠的混合溶液。培养7 d,换液1次/3 d,培养结束后PBS清洗3次,加入细胞裂解液冰上裂解30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $13\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min(离心半径6.219 cm),取上清液,按试剂盒说明进行ALP活性测定。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 细胞分组与处理 每皿加 α -MEM培养基1.8 mL,分别取对数生长期的MC3T3-E1细胞,以 3.5×10^5 个/皿细胞密度接种在48个培养皿中,在细

胞培养箱内培养12 h后,待贴壁细胞约为60%~80%,即可给予药物干预。细胞分为空白组(培养基)、模型组(培养基+成骨诱导液)、给药组[培养基+成骨诱导液+不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿供试品溶液 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (终质量浓度)],每组平行6个培养皿,培养7 d,换液1次/3 d,弃去培养基,用PBS清洗2次,每组随机选取一个培养皿进行细胞计数,其余用液氮淬灭3 min,每个培养皿加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的80%甲醇水溶液1.5 mL,刮取细胞, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

2.5.2 细胞样品的制备 细胞样品用氮气吹干后加入甲醇萃取剂(含内标肉碱C2:0-d3 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、肉碱C8:0-d3 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、肉碱C16:0-d3 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、溶血磷脂酰胆碱19:0 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、棕榈酸-d3 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、硬脂酸-d3 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、色氨酸-d5 $0.85\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、苯丙氨酸-d5 $0.72\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、胆酸-d4 $0.37\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、鹅去氧胆酸 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),将悬浮液 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径6 cm)冷冻干燥12 h,冻干粉用25%乙腈水溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$ 重悬进行分析。

2.5.3 检测条件 正离子模式按2.2.1项下正离子模式方法检测。负离子模式采用Waters HSS T3色谱柱($2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$),按2.2.1项下负离子模式方法检测。质谱条件采用ESI,正、负离子模式检测,喷雾电压 5.50 kV (ESI⁺)、 4.5 kV (ESI⁻),毛细管温度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$,离子源温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$,碰撞能量 30 eV ,辅助气流量 50 arb ,鞘气体流量 15 arb ,辅助加热气温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$,全MS扫描分辨率 $60\text{ }000$,MS/MS分辨率 $15\text{ }000$,扫描范围 $m/z\text{ }85\sim 1\text{ }250$ 。质谱分析采用信息依赖获取(IDA)模式,获得强度最大的10个母离子的MS/MS谱。

2.5.4 数据处理 质谱获得的原始数据用Profiling Solution V2.01进行预处理,用于峰拾取和对准。数据使用SIMCA-P 11.5软件,进行PCA、PLS-DA和PLS处理。采用SPSS 13.0进行单因素方差分析和 t 检验,对应的统计变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.6 化学指纹-细胞代谢组学的相关性分析 在不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促进成骨分化的细胞代谢组学研究的峰表中,引入变量 Y_0 为药效作用指标,设正常组每个培养皿 $Y_0=0$,模型组 $Y_0=1$,对峰表进行PLS处理,计算各给药组每个培养皿的 Y_0 及其均值 $\text{mean } Y_0$ 。将计算得到的 $\text{mean } Y_0$ 带入到不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹峰表中,作为相应药材促进成骨分化的药效作用指标,并对整合后不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹峰表中

峰面积及其对应 $\text{mean } Y_0$ 进行PLS处理,得到各淫羊藿及巫山淫羊藿药材的 Y_1 ,去掉一个基原药材的 $\text{mean } Y_0$,再次对峰面积及 $\text{mean } Y_0$ 进行Scatter-plot Loading分析,即计算得到该药材的药效作用指标的预测值 $Y_{1\text{-predict}}$,分别计算 $\text{mean } Y_0$ 与 Y_1 、 $Y_{1\text{-predict}}$ 的Pearson相关系数,在有 $\text{mean } Y_0$ 的化学指纹峰表中,依据变量重要性投影(VIP)值 >1 的变量筛选药效成分。仅保留VIP值 >1 的变量,形成一个新峰表,将 $\text{mean } Y_0$ 带入新峰表中,对峰面积及 $\text{mean } Y_0$ 采用PLS,计算得到各淫羊藿及巫山淫羊藿药材 Y_2 及其预测值 $Y_{2\text{-predict}}$,再次计算 $\text{mean } Y_0$ 与 Y_2 、 $Y_{2\text{-predict}}$ 的Pearson相关系数。最后,将VIP值 >1 的变量的化学指纹峰表进行PCA处理,得到各药材的第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)的数值,分别以PC1和PC2为自变量 X 和变量 Y ,以 $\text{mean } Y_0$ 为气泡直径的变量值,得到淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹和细胞代谢组学相关性的气泡图。

3 结果

3.1 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹分析 淫羊藿及巫山淫羊藿正、负离子模式下的总离子流图,见增强出版附加材料。不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿PLS-DA结果见增强出版附加材料。正离子模式PLS-DA模型 R^2X (对自变量的拟合程度)、 R^2Y (模型对因变量的拟合程度)和 Q^2 (预测能力)分别为 0.846 、 0.975 和 0.88 ,验证模型 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.331 和 -0.7 ;负离子模式PLS-DA模型 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 的值分别为 0.789 、 0.796 和 0.462 ,验证模型 R^2 和 Q^2 的截距分别为 0.361 和 -0.694 ,结果表明正、负离子模式PLS-DA模型均具有良好的拟合度和可预测性。PLS-DA结果表明,不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿可明显区分,其中箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿和淫羊藿(陕西)空间距离较近,淫羊藿(甘肃)、柔毛淫羊藿、朝鲜淫羊藿相互之间分离较远,淫羊藿基原相同,产地不同,亦有差异。依据VIP值 >1 筛选得到不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的10个差异化学成分,以黄酮类成分为主,还包括生物碱类、酚酸类等。黄酮类化合物包括朝藿定B、朝藿定C、槲皮素、朝藿定A1、宝藿苷I、yinyanghuo B、淫羊藿苷、 β -脱水淫羊藿素,生物碱类化合物包括木兰花碱,酚酸类化合物包括隐绿原酸。见增强出版附加材料。

3.2 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1细胞增殖的影响 与空白组比较,不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材均能够促进MC3T3-E1细胞增殖

($P<0.05$),其中,淫羊藿(陕西)和巫山淫羊藿细胞增殖作用最强,见表2。

表2 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1细胞增殖活力的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Epimedii Folium with different origins and Epimedii Wushanensis Folium on viability of MC3T3-E1 cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞活力/%
空白组		93.31±7.78
淫羊藿(甘肃)组	0.1	128.20±14.06 ¹⁾
淫羊藿(陕西)组	0.1	144.48±17.89 ¹⁾
巫山淫羊藿组	0.1	134.47±11.93 ¹⁾
朝鲜淫羊藿组	0.1	134.43±4.27 ¹⁾
柔毛淫羊藿组	0.1	133.58±2.14 ¹⁾
箭叶淫羊藿组	0.1	123.92±12.37 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$

3.3 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1细胞中ALP活性的影响 ALP在成骨诱导过程中最先反应,在成骨分化开始时ALP活性增加,随着成骨分化能力的增强,其活性逐渐增加,其活性高低与成骨分化能力正相关。与空白组比较,模型组中的ALP活性明显增加,表明成骨诱导液能促进MC3T3-E1细胞的成骨分化。与模型组比较,淫羊藿(甘肃)、朝鲜淫羊藿、柔毛淫羊藿均能明显增加MC3T3-E1细胞中ALP活性,说明这3种淫羊藿具有促进MC3T3-E1细胞成骨分化作用,见表3。

表3 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿对MC3T3-E1细胞ALP活力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Epimedii Folium with different origins and Epimedii Wushanensis Folium on ALP activity of MC3T3-E1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	ALP活力/金氏单位
空白组		3.47±0.39
模型组		5.31±0.90 ¹⁾
淫羊藿(甘肃)组	0.1	10.56±1.31 ²⁾
淫羊藿(陕西)组	0.1	4.87±1.30
巫山淫羊藿组	0.1	6.34±1.89
朝鲜淫羊藿组	0.1	8.37±1.02 ²⁾
柔毛淫羊藿组	0.1	20.79±4.74 ²⁾
箭叶淫羊藿组	0.1	6.54±0.20

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,与模型组比较²⁾ $P<0.05$

3.4 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的细胞代谢组学分析 PLS-DA结果见增强出版附加材料,与空白组比较,模型组有明显的分离趋势,不同基原淫

羊藿及巫山淫羊藿组与模型组分离远近有差异,从远至近依次为朝鲜淫羊藿、巫山淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、淫羊藿(甘肃)、淫羊藿(陕西),表明不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的作用具有差异。正离子模式 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 的模型参数分别为0.817、0.560和0.359,表明拟合和预测能力较好,验证模型中正离子模式下 R^2 和 Q^2 的截距分别为0.246和-0.400。负离子模式 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 的模型参数分别为0.769、0.549和0.244,负离子模式下 R^2 和 Q^2 的截距分别为0.267和-0.424说明没有过拟合。

3.5 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹-细胞代谢组学相关性分析 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促进成骨分化的细胞代谢组学PLS分析模型参数为, $R^2X=0.695$, $R^2Y=0.458$, $Q^2=0.21$,其中, Q^2 的数值较小,与淫羊藿及巫山淫羊藿的基原较多,细胞样品分组较多有关,验证模型的 R^2 和 Q^2 的截距分别0.208,和-0.331,表示模型验证试验未过拟合,PLS分析结果可靠。结果显示,不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的药效指标 $\text{mean } Y_0$ 分别与 Y_1 、 $Y_{1-\text{predict}}$ 的Pearson相关系数为0.998和0.790, Pearson相关系数0.8~1为极强相关,0.6~0.8为强相关,0.6以下为弱相关,结果表明淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹与其促进成骨分化的药效作用有良好的相关性。在含有药效作用指标 $\text{mean } Y_0$ 的淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹中,筛选有9个变量与促进成骨分化的药效作用相关,包括木兰花碱、双藜苷B、朝藜定C、淫羊藿苷、宝藜苷I、yinyanghuo B、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸和槲皮素。不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化的药效指标 $\text{mean } Y_0$ 与 Y_2 、 $Y_{2-\text{predict}}$ 的Pearson相关系数分别为0.967和0.953,研究表明VIP>1的9个变量与淫羊藿及巫山淫羊藿的药效作用有强相关性,可作为潜在药效成分。见增强出版附加材料。

9个潜在药效成分在不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹中的相对丰度变化,与朝鲜淫羊藿组比较,淫羊藿(甘肃)组中木兰花碱、宝藜苷I、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸、槲皮素和淫羊藿苷的相对丰度明显降低,双藜苷和朝藜定C的相对丰度明显升高($P<0.05$);淫羊藿(陕西)组中宝藜苷I、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸和淫羊藿苷明显降低,双藜苷、槲皮素、朝藜定C和yinyanghuo B明显升高($P<0.05$);巫山淫羊藿组中木兰花碱、宝藜苷I、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸、槲皮素和淫羊藿苷的相对丰度明显降低,朝藜定C的相对丰度明显升高($P<0.05$);柔毛淫羊藿

组中木兰花碱、宝藿苷 I、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸和淫羊藿苷的相对丰度明显降低,双藿苷和朝藿定 C 的相对丰度明显升高($P<0.05$);箭叶淫羊藿组中的宝藿苷 I、 β -脱水淫羊藿素、隐绿原酸、槲皮素和淫羊藿苷的相对丰度明显降低,木兰花碱和朝藿定 C 的相对丰度明显升高($P<0.05$)。见表4。

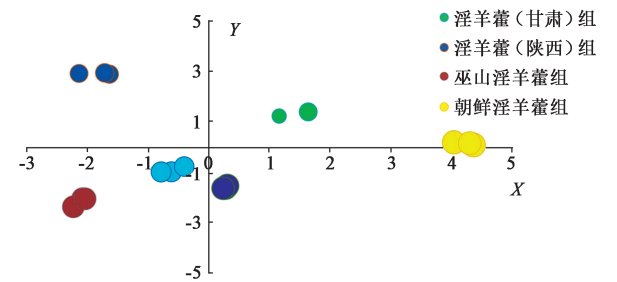
表4 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿中9个潜在药效成分的相对丰度变化($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Relative abundance changes of 9 potential pharmacodynamic components in Epimedium Folium with different origins and Epimedium Wushanensis Folium ($\bar{x}\pm s, n=3$)
×10⁷

组别	木兰花碱	宝藿苷 I	双藿苷	β -脱水淫羊藿素	隐绿原酸
朝鲜淫羊藿组	59.00±2.69	15.12±0.65	2.36±0.13	10.46±0.41	9.20±0.41
淫羊藿(甘肃)组	11.11±0.70 ¹⁾	11.07±0.46 ¹⁾	11.8±0.73 ¹⁾	6.73±0.21 ¹⁾	1.16±0.06 ¹⁾
淫羊藿(陕西)组	42.26±7.28	4.71±0.36 ¹⁾	13.5±0.51 ¹⁾	2.84±0.22 ¹⁾	1.81±0.04 ¹⁾
巫山淫羊藿组	35.67±3.33 ¹⁾	1.85±0.05 ¹⁾	2.88±0.38	1.18±0.04 ¹⁾	0.64±0.06 ¹⁾
柔毛淫羊藿组	32.29±3.05 ¹⁾	5.03±0.32 ¹⁾	3.11±0.30 ¹⁾	3.60±0.19 ¹⁾	0.89±0.04 ¹⁾
箭叶淫羊藿组	68.65±10.00 ¹⁾	4.90±0.14 ¹⁾	2.04±0.41	3.89±0.03 ¹⁾	1.61±0.15 ¹⁾

组别	槲皮素	朝藿定 C	淫羊藿苷	yinyanghuo B
朝鲜淫羊藿组	0.61±0.04	1.13±0.13	3.01±0.09	0.19±0.01
淫羊藿(甘肃)组	0.29±0.02 ¹⁾	8.81±0.40 ¹⁾	1.93±0.15 ¹⁾	0.67±0.05
淫羊藿(陕西)组	6.30±0.10 ¹⁾	7.31±1.17 ¹⁾	1.55±0.04 ¹⁾	2.80±0.04 ¹⁾
巫山淫羊藿组	0.28±0.03 ¹⁾	27.63±4.28 ¹⁾	0.65±0.05 ¹⁾	0.33±0.02
柔毛淫羊藿组	0.63±0.09	13.47±1.84 ¹⁾	1.47±0.21 ¹⁾	1.09±0.08
箭叶淫羊藿组	0.21±0.01 ¹⁾	11.35±0.55 ¹⁾	1.58±0.13 ¹⁾	—

注:与朝鲜淫羊藿组比较¹⁾ $P<0.05$;—,未检出

淫羊藿及巫山淫羊藿的化学指纹和细胞代谢组学的相关性气泡图见图1,淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化药效作用从强至弱顺序为朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿、柔毛淫羊藿、淫羊藿(陕西)、淫羊藿(甘肃)。



注:气泡直径代表促成骨分化药效作用,直径越大,淫羊藿促成骨分化药效作用越强

图1 不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹-细胞代谢组学的相关性气泡

Fig. 1 Bubble diagram of correlation of chemical fingerprint-cell metabolomics of Epimedium Folium with different origins and Epimedium Wushanensis Folium

4 讨论

本研究通过化学指纹与细胞代谢组相关分析确定了淫羊藿促成骨前体细胞成骨分化的药效物质,主要为黄酮类、生物碱类和酚酸类成分,其中黄酮类成分为双藿苷 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、宝藿

苷 I、yinyanghuo B、 β -脱水淫羊藿素和槲皮素;生物碱类成分为木兰花碱;酚酸类为隐绿原酸。

据报道,淫羊藿总黄酮能够有效促进体外成骨细胞增殖和分化成熟,具备促骨形成的活性,能够有效对抗骨质疏松^[22]。其中淫羊藿苷可通过雌激素受体- α (ER- α)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/沉默信息调节因子1(SIRT1)信号通路去乙酰化,通过提高成骨细胞 Runx2 及碱性磷酸酶蛋白表达、通过降低成骨前体细胞的 p65 磷酸化水平等代谢途径促进成骨增殖分化,延缓骨质疏松症的发生^[23-25],并可能通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路调控骨微血管内皮细胞自噬,进而改善非创伤性骨坏死^[26]。宝藿苷 I^[27]和槲皮素^[28]均可促进小鼠前体成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的成骨分化,抑制 RAW264.7 细胞形成破骨细胞,对骨代谢具有积极作用。 β -脱水淫羊藿素能明显提高 ALP 活性、钙含量和骨钙素含量,提高成骨分化的关键基因 BMP-2、OSX 和 Runx2 信使核糖核酸(mRNA)水平,起到骨保护作用^[29]。上述的黄酮醇苷类成分均能增强成骨细胞活力,促进成骨分化,这与本研究确定的淫羊藿促成骨分化的药效物质基本一致。但 β -脱水淫羊藿素在不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿中含量很低,淫羊藿苷、宝藿苷 I、朝藿定 C 和双藿

苷B的含量较高。淫羊藿苷在机体内被吸收入血浓度比较低^[30],容易被肠道菌群代谢,脱去单糖化合物,降解成 β -脱水淫羊藿素,有报道发现大鼠腹腔注射淫羊藿素($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后,体内会迅速代谢成葡萄糖醛酸Ⅱ相代谢物(即淫羊藿素葡萄糖醛酸代谢物),并在2 h其代谢产物达到最大浓度^[31]。而本研究确定的淫羊藿中促成骨前体细胞向成骨分化的药效物质既有黄酮醇苷类化合物,又有低含量的 β -脱水淫羊藿素,推测可能是淫羊藿黄酮苷元化合物结构中的异戊烯基与成骨分化的作用靶点相互作用。另外,隐绿原酸能够促进成骨基因远端缺失同源盒5(Dlx5)、DNA结合蛋白抑制剂(Id1)和Runx2的表达,进而促进早期的成骨细胞分化^[32]。木兰花碱可降低去卵巢诱导^[33]和炎症性小鼠骨质疏松模型^[34]的骨吸收,提高骨密度。二者作为确定的药效物质,与文献报道相一致。

在化学成分研究方面,有文献报道不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材中黄酮醇苷类化合物的含量差异较大,其中绿原酸、朝藿定C和宝藿苷I含量差异最大。且绿原酸和宝藿苷I在朝鲜淫羊藿中含量最高,朝藿定C在朝鲜淫羊藿中含量最低,淫羊藿苷在不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿药材中含量差异变化不大,木兰花碱在朝鲜淫羊藿中含量最高,但是在其他基原淫羊藿中含量无明显性差异^[35]。本研究确定的9个药效成分在淫羊藿及巫山淫羊藿中含量亦有差异,可建立含有该9个药效成分的淫羊藿及巫山淫羊藿化学指纹图谱,用于淫羊藿及巫山淫羊藿的质量控制和评价,这将更具有科学性、合理性。

本研究为中药药效物质基础的筛选提供了一种新的方法和技术,与中药提取物、中药单体化合物的相关靶标、细胞、器官或动物模型的活性测试,探寻与药理活性相关的药效成分^[36-37],这种传统的中药药效物质基础筛选方法比较,本研究构建了体外-体内成分相关、化学成分-细胞整体药效作用相关,整合分析确定中药药效物质基础,该研究思路更符合中药多成分、多靶点的药效作用特点,但是由于细胞实验的局限性,不能完全代替整体动物给药后的药效作用,因此本研究需要构建整体动物骨质疏松症模型,开展给药淫羊藿及巫山淫羊藿后的血样、尿样、组织样品的代谢组学研究,构建化学指纹-代谢组学相关分析,筛选淫羊藿治疗骨质疏松的药效物质基础,这也是本课题组下一步的研究计划。

综上所述,本研究以淫羊藿及巫山淫羊藿促成骨分化为例,建立了一种基于化学指纹与细胞代谢组学相关性的中药质量评价新策略。化学指纹分析结果表明,不同基原淫羊藿及巫山淫羊藿化学成分有明显变化。基于代谢组学,不同基原的淫羊藿及巫山淫羊藿具有不同的细胞代谢组。通过PLS分析,并引入疗效参数,确定化学指纹与细胞代谢组具有良好的相关性。确定了与促进成骨分化药效相关的9个变量,这些质量标记成分可用于淫羊藿的质量评价。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:340-342.
- [2] 刘鑫,何小英,刘柏龙,等. UPLC结合一测多评法测定药典中淫羊藿的13种化学成分[J]. 中国中药杂志,2024,49(4):981-988.
- [3] 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.
- [4] 边帅杰,康忠禹,赵大庆,等. 基于UHPLC-Q Exactive Orbitrap/MS结合多元统计方法分析不同基原淫羊藿化学成分的差异[J]. 中药材,2024,47(1):106-110.
- [5] 周晓洁,姚辛敏,周妍妍. 淫羊藿的药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2022,50(11):112-115.
- [6] LIM R Z L, LI L, YONG E L, et al. STAT-3 regulation of CXCR4 is necessary for the prenylflavonoid icaritin to enhance mesenchymal stem cell proliferation, migration and osteogenic differentiation[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2018, 1862(7):1680-1692.
- [7] LIU H, XIONG Y, WANG H, et al. Effects of water extract from *Epimedium* on neuropeptide signaling in an ovariectomized osteoporosis rat model [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 221:126-136.
- [8] 张正,陈江平,程学仁,等. 淫羊藿配方颗粒UPLC特征图谱及主要成分含量测定研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(14):20-23, 28.
- [9] LI H F, GUAN X Y, YANG W Z, et al. Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(1):44-48.
- [10] 司玉芳,严少普,王文博. 淫羊藿苷改善中枢神经系统疾病的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4):988-994.
- [11] 谢娟平,谢人明,王小微. 巫山淫羊藿主要成分朝藿定C和双藿苷A抗炎作用研究[J]. 中国现代应用药

- 学,2012,29(3):198-201.
- [12] HU L, XIE X, XUE H, et al. MiR-1224-5p modulates osteogenesis by coordinating osteoblast/osteoclast differentiation via the Rap1 signaling target ADCY2 [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(7):961-972.
- [13] 夏维波,余卫,王以朋,等. 原发性骨质疏松症社区诊疗指导原则[J]. *中国全科医学*, 2019, 22(10):1125-1132.
- [14] RIVADENEIRA F, MÄKITIE O. Osteoporosis and bone mass disorders: From dene pathways to treatments [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(5):262-281.
- [15] 周雅婷,刘颖,毕亚男,等. 淫羊藿水提物及提取药渣的抗骨质疏松药效比较研究[J]. *天津中医药大学学报*, 2020, 39(1):87-91.
- [16] 李天娇,于洋,王帅,等. 仙灵脾颗粒体外抗骨质疏松作用及谱效关系研究[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(7):1573-1576.
- [17] 徐众华,莫雨晴,周驰. 基于BMP/Runx2/Osx信号通路研究淫羊藿总黄酮改善绝经后骨质疏松模型大鼠的作用机制[J]. *中国药房*, 2020, 31(19):2333-2338.
- [18] 毛玉芝,曾敬其,杨冰,等. 淫羊藿黄酮低糖苷组分对维甲酸致骨质疏松大鼠的疗效及作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(16):4446-4453.
- [19] 金珪,徐鹏辉,卞泗善,等. 淫羊藿苷调节PTEN激活成骨基因表达缓解大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. *中医药信息*, 2023, 40(6):38-43, 53.
- [20] 徐忠坤,殷洪梅,李芳,等. 淫羊藿总黄酮胶囊中黄酮类成分含量测定及抗骨质疏松活性研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(15):3140-3144.
- [21] 徐杨,何芷绮,刘晓凤,等. 代谢组学在中药复方制剂领域的研究进展及面临的挑战[J]. *中草药*, 2024, 55(4):1354-1364.
- [22] 刘姬艳,胡定慧,胡芳华,等. 淫羊藿总黄酮对血管生成抑制作用的初步研究[J]. *杭州师范大学学报:自然科学版*, 2014, 13(3):304-306.
- [23] 姜涛. 基于ER α /AMPK/Sirt1信号通路探讨PMOP的发病机制及淫羊藿苷的干预[D]. 广州:广州中医药大学, 2020.
- [24] 付殷,刘宇洲,胡晓阳,等. 基于铁死亡通路研究淫羊藿苷对大鼠成骨细胞增殖分化的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(9):2100-2103.
- [25] 杨冰璇,姜涛,贾敏,等. 淫羊藿苷增强自噬促进小鼠前成骨细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(1):64-69.
- [26] 岳峥嵘,张悦,汤建成,等. 淫羊藿苷经PI3K/Akt/mTOR通路调控激素对骨微血内皮细胞自噬的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(15):73-80.
- [27] XIA Y H, JIANG T W, YU J M, et al. Preliminary studies on the anti-osteoporosis activity of baohuoside I [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019 (115):108850.
- [28] SATUÉ M, ARRIERO, M D, et al. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86 (10):1476-1486.
- [29] 宋鹏,姚娟,马慧萍,等. 脱水淫羊藿素与山柰素对体外培养成骨细胞成熟矿化影响的比较研究[J]. *药学报*, 2012, 47(7):890-896.
- [30] YU L, JIN Y, SONG M, et al. When natural compounds meet nanotechnology: Nature-inspired nanomedicines for cancer immunotherapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (8):1589.
- [31] 张双庆,孙丽翠,黄振武. 大鼠体内淫羊藿素葡萄糖醛酸代谢物的定量研究[J]. *卫生研究*, 2015, 44(1):91-94.
- [32] KIM K M, KIM T H, JANG W G. Effect of cryptochlorogenic acid extracted from fruits of *Sorbus commixta* on osteoblast differentiation [J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2017, 46(3):314-319.
- [33] HUNG T M, NA M, MIN B S, et al. Protective effect of magnoflorine isolated from *Coptidis Rhizoma* on Cu²⁺-induced oxidation of human low density lipoprotein [J]. *Planta Med*, 2007, 73(12):1281-1284.
- [34] SUN Z, ZENG J, WANG W, et al. Magnoflorine suppresses MAPK and NF- κ B signaling to prevent inflammatory osteolysis induced by titanium particles *in vivo* and osteoclastogenesis via RANKL *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:389.
- [35] 成丽媛,霍香香,杨莉,等. UPLC法测定不同基源淫羊藿中11种有效成分的含量[J]. *天津中医药大学学报*, 2022, 41(2):237-242.
- [36] 毕肖林,马世堂,狄留庆,等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展[J]. *中草药*, 2018, 49(22):5229-5234.
- [37] 李建锋,荀丽英,李航,等. 中药成分的生物学活性评价及筛选[J]. *中草药*, 2015, 46(4):588-594.

[责任编辑 李嘉麟]