

· 综述 ·

苗药黑骨藤研究进展[△]

杨波, 张建锋*

国药集团同济堂(贵州)制药有限公司, 贵州 贵阳 550009

[摘要] 苗药黑骨藤是民间广泛用于治疗风湿、类风湿等风湿类疾病的民族药, 本文对其提取工艺、化学成分、质量控制、药理作用、临床应用等方面进行综述, 以为黑骨藤进一步研究与开发利用提供参考。

[关键词] 黑骨藤; 提取工艺; 化学成分; 质量控制; 药理作用; 临床应用

[中图分类号] R282.71 [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2019)08-1122-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190424005

Research Progress of Miao Medicine *Periploca forrestii*

YANG Bo, ZHANG Jian-feng*

Tongjitang Of Sinopharm Group Guizhou Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550009, China

[Abstract] *Periploca forrestii*, a Miao nationality herbal is widely used in folk medicine to treat rheumatism, rheumatoid and other rheumatic diseases, the paper were reviewed on aspects of the extraction process, chemical composition, quality control, pharmacological effects and clinical applications, it provides basis for the further research and development and rational utilization of *P. forrestii*.

[Keywords] *Periploca forrestii* Schltr.; extraction technology; chemical composition; quality control; pharmacological effects; clinical applications

黑骨藤是贵州苗族地区常用药物之一, 其味苦、辛, 性温, 有小毒; 具有祛风除湿、活血消痛之功效, 常用于治疗跌打损伤、风湿痛、骨折等。黑骨藤为萝藦科植物西南杠柳 *Periploca forrestii* Schltr. 的根或全株。该种主要分布于贵州、云南、西藏等, 在其他民族也有药用, 《广西药用植物名录》(铁散沙、牛尾蕨、铁骨头、山筋线)、《贵州草药》(黑骨头、柳叶过山龙)、《昆明民间常用草药》(山杨柳、青蛇胆、小青蛇、柳叶夹)、《云南中草药选》(飞仙藤、达风藤)、《云南中草药》(小黑牛、青香藤、奶浆藤、青色丹、青风藤)等中均有药用记载^[1]。关于黑骨藤已有较多研究报道, 本文对其提取工艺、化学成分、质量控制、药理作用等研究概况进行综述, 为其进一步研究和开发利用提供参考。

1 提取工艺研究

贾荷丽等^[2]对苗医药的复方黑骨藤提取工艺进行研究, 以总生物碱得率和干膏得率的综合评分为指标, 采用正交设计考察了乙醇体积分数、固液比、提取时间、提取次数等参数。确定最佳提取工艺为药材粗粉加6倍量70%乙醇提取3次, 每次1h。最终优选的提取工艺稳定可行, 用于制备复方黑骨藤新制剂。袁德彬等^[3]以杠柳苷提取率为指标, 采用正交试验优选提取工艺参数。确定的最佳工艺条件: 溶剂为50%乙醇, 料液比为1:15, 功率为800W, 温度为50℃, 提取2次, 每次20min。此工艺合理可行, 适用于黑骨藤中杠柳苷的提取。周秋月等^[4]以黑骨藤中杠柳苷、秦艽中龙胆苦苷和元胡中延胡索乙素为检测指标, 采用HPLC考察3种大孔树脂

[△] [基金项目] 贵州省科技厅项目(黔科合中药字[2013]5020号)

* [通信作者] 张建锋, 副主任药师、执业药师, 研究方向: 中药制剂新技术和中药配方颗粒质量标准研究; E-mail: 286911082@qq.com

(D-101、AB-8、NKA-9)对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的吸附分离性能,并考察分离纯化杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素成分的最佳工艺条件。结果显示,采用大孔树脂 D-101 对复方黑骨藤药物中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素成分进行分离、纯化为好,可作为复方黑骨藤药物质量控制方法。陈坤等^[5]采用 D-101 型大孔树脂,以总萜、总黄酮和总生物碱的转移率评价上样质量浓度、上样量、吸附时间和洗脱液体积流量对纯化效果的影响,以落干酸、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、杠柳苷、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的转移率评价洗脱液浓度对纯化效果的影响,以延胡索甲素的转移率确定洗脱终点,最终优化出最佳纯化工艺条件,该纯化工艺稳定可行,可作为黑骨藤复方药物有效部位制备工艺。

2 化学成分研究

据文献报道,黑骨藤根茎中含有杠柳苷、杠柳苷元、8-羟基杠柳苷元和滇杠柳苷,还含胡萝卜苷、熊果酸、北五加皮苷等成分。张宏等^[6]首次利用 HPLC 测定不同产地黑骨藤中杠柳苷的含量,建立了 HPLC 测定黑骨藤中杠柳苷的方法,并用于不同产地黑骨藤中杠柳苷的测定,具有简便快速的特点,为黑骨藤药材的质量标准建立提供参考依据。徐宏等^[7]采用反相高效液相色谱法测定黑骨藤中滇杠柳苷 I 的含量,发现黑骨藤中滇杠柳苷 I 对多种肿瘤细胞具有显著的细胞毒活性,可将该成分作为黑骨藤质量控制的指标成分,对提高黑骨藤的质量控制水平提供了一定的依据。采用多种柱色谱及制备型 HPLC 等方法进行分离纯化,并运用现代波谱学方法,如理化分析、核磁共振和质谱等鉴定其结构,对黑骨藤的化学成分进行研究。在黑骨藤 70% 乙醇提取物中分离得到 19 个化合物中,其中化合物 16 种为首次从该属植物中分离得到,化合物 4 种为首次从该植物中分离得到^[8-9]。赵超等^[10]采用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 柱色谱法等进行分离纯化,并通过理化常数测定和质谱、一维、二维核磁共振等波谱方法分析鉴定其化学结构,研究黑骨藤化学成分。从黑骨藤中分离鉴定了 2 个神经酰胺类化合物,分别为 1-O- β -D-葡萄糖-(2S, 3S, 4R, 10E)-2-[(2R)-2-羟基二十四烷酰氨基-10-十八烷-

3, 4-二醇(1), (2S, 3S, 4R, 10E)-2-[(2R)-2-羟基二十四烷酰氨基]-10-十八烷-1, 3, 4-三醇(2)。所有化合物均首次从黑骨藤中分离得到,采用二维核磁技术确定化合物 2 的结构,并对其二维谱数据进行归属。

3 质量控制研究

质量控制研究包括建立质量标准、多指标定量测定、质量分析等诸多内容,徐宏^[11]以对多种肿瘤细胞具有显著细胞毒活性的滇杠柳苷和专属性很强的新化合物羽扇豆烷壬酸酯作为指标成分,采用 HPLC 和薄层色谱扫描法(TLCS)建立其含量测定方法,为进一步提升黑骨藤质量标准提供实验依据并制定黑骨藤的质量标准(草案)。同时,对苗药黑骨藤的指纹图谱进行探索性研究,在其有效成分不完全明确的前提下,以作为黑骨藤质量控制的辅助手段,为提高黑骨藤的质量控制水平和科技含量提供依据。王文春等^[12]采用高效液相色谱法,对不同产地黑骨藤药材中槲皮素-3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖苷的含量进行测定,结果有明显差异,初步说明湿度、产地、光照等因素均对黑骨藤中该成分的含量有影响。胡茜等^[13]采用响应面法优化液相色谱条件,同时通过响应面法对黑骨藤指纹图谱液相色谱方法进行研究,并得到优化黑骨藤的色谱分析条件:Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-水,梯度洗脱,时间为 50 min,流速为 1.5 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温为 50 $^{\circ}$ C。利用响应面法成功对黑骨藤指纹图谱的液相色谱条件进行优化。徐艳等^[14]采用 HPLC 同时测定复方黑骨藤中落干酸、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、杠柳苷、延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素 9 种有效成分的含量。使用 Kromasil C₁₈ 色谱柱,通过调节波长进行检测,在波长 206 nm 成分为延胡索乙素、四氢小檗碱、延胡索甲素,波长 225 nm 成分为落干酸和杠柳苷,波长 243 nm 成分为獐牙菜苦苷和獐牙菜苷,波长 275 nm 成分为 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷和龙胆苦苷。其中,落干酸、6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、杠柳苷、延胡索乙素、四氢小檗碱和延胡索甲素的质量浓度在一定范围内与峰面积呈良好的线性关系;经方法学验证,本方法可用于黑骨藤复方药物中 9 种有效成分的分析 and 含量测定,为复方黑骨藤药物的

质量控制奠定基础。李琪等^[15]建立了对复方黑骨藤提取物中龙胆苦苷、延胡索乙素和杠柳苷3种成分的含量进行测定的分析方法,本实验分别对色谱条件和样品的前处理进行考察,在最佳的实验条件下对复方黑骨藤中的龙胆苦苷、延胡索乙素和杠柳苷3个成分同时进行反相高效液相色谱(RP-HPLC)的分析。确定该分析方法对于样品前处理简单易行、准确性高、重复性好、实用性强,达到了实验预期目的,为后续复方黑骨藤的质量控制打下良好的基础。

4 药理作用研究

在风湿性关节炎及类风湿性关节炎等疾病的治疗中,苗药黑骨藤被广泛应用,其生物活性主要有镇痛、抗炎及强心作用,除此还具有抗癌作用。冉启军等^[16]采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶致大鼠足趾肿胀2种动物模型,检测黑骨藤总黄酮的抗炎作用;采用小鼠热板法镇痛实验及冰醋酸致小鼠扭体反应模型检测其镇痛作用。结果表明,黑骨藤总黄酮具有较好的抗炎消肿与镇痛作用,提示其黄酮类成分可作为黑骨藤药材的指标性成份。梁勇等^[17]通过对黑骨藤抗肿瘤活性成分进行筛选,并对其化学成分进行提取分离,发现质量浓度在 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,黑骨藤乙酸乙酯部位对白血病K562抑制率可达到80.71%。从该部位分离所得化合物VI和化合物IX在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度下肿瘤抑制率分别达到97.48%、40.56%。揭示苗药黑骨藤抗肿瘤活性的有效成分、有效部位和作用机制,为黑骨藤在抗肿瘤方面的研究、开发和利用奠定坚实的理论基础。甄茹等^[18]采用维生素D3诱导兔骨髓细胞法获得破骨细胞,以形态学观察苏木素、伊红染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色鉴定破骨细胞,通过测定黑骨藤各极性部位不同剂量对破骨细胞TRAP酶活力,根据TRAP⁺细胞计数及骨吸收陷窝面积的影响来确定活性部位,从而研究黑骨藤对破骨细胞分化的影响。最终确定黑骨藤主要活性部位是乙酸乙酯部位,它可以抑制骨髓细胞向破骨细胞分化及骨吸收能力。李慧敏等^[19]将黑骨藤95%乙醇提取物分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇等溶剂进行萃取,把乙酸乙酯萃取物用硅胶层析法进行分离,研究黑骨藤中抗类风湿性关节炎的有效成分。把各分离物进行小鼠耳廓肿胀和大鼠足趾肿胀实验,并测定各分离物中总

黄酮和总皂苷的含量。黑骨藤醇提物乙酸乙酯萃取物的三氯甲烷-甲醇(5:1)片段的抗炎作用最好,进一步研究发现,黑骨藤分离物中总黄酮和总皂苷的含量越高其抗炎作用越强。王恒等^[20]将成年雄性SD大鼠120只分为4组,分别为假手术组(A组)、模型组(B组)、黑骨藤 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(C组)、黑骨藤 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(D组),每组30只。研究黑骨藤乙醇提取物对大鼠坐骨神经钳夹损伤的作用及可能的作用机制。B、C、D组大鼠进行坐骨神经损伤(SNI)手术, A组仅暴露游离坐骨神经,术后每日分别给予0.90%氯化钠(A、B组)或相应剂量的黑骨藤乙醇提取物(C、D组)灌胃。各组分为3个时间点测定坐骨神经功能指数(SNI);取坐骨神经,进行HE染色,观察大鼠坐骨神经的组织形态学变化;取股动脉血,ELISA法检测各组大鼠血清中白细胞介素和肿瘤坏死因子的表达水平。黑骨藤乙醇提取物可改善大鼠SNI,其作用机制可能与抑制免疫炎症因子有关。王霞等^[21]采用 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TNF- α 活MH7A细胞,研究黑骨藤中分离得到的8个咖啡酰基奎宁酸类单体化合物抑制人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞(MH7A)增殖的作用,并对其活性较好的2个化合物进行可能的分子机制研究。发现黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类化合物具有较好的抗类风湿性关节炎活性,其作用机制可能与抑制MAPK信号通路的激活,降低NF- κ B活性,抑制下游炎症因子表达,进而减轻炎症反应有关。

5 临床应用研究

对黑骨藤提取物和黑骨藤制剂的临床应用已有研究报道。张贵源等^[22]通过实验发现,黑骨藤可使线虫被损伤的神经恢复功能,揭示黑骨藤在治疗神经退化性疾病方面的价值。PC12细胞被广泛用于神经保护作用药物筛选研究,在使用 H_2O_2 氧化损伤之前,PC12细胞先接受黑骨藤乙醇提取物的药物作用,可提升PC12细胞的存活率,说明黑骨藤具有抗氧化损伤作用。黑骨藤既具有神经保护作用又具有抗氧化作用,具有开发成治疗神经退化性疾病药物的潜能,为进一步探索黑骨藤的新用途提供了参考。黄明进等^[23]观察黑骨藤提取物对AA大鼠足趾肿胀、体质量、器官指数及血清与炎性组织液中白介素-1 β (IL-6)、白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因

子 α (TNF- α)含量水平的影响,结果表明黑骨藤提取物能有效下调胸腺指数、抑制AA大鼠足肿胀、降低AA大鼠血清与炎性组织液中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6的含量水平。黑骨藤具有良好的抗类风湿关节炎(RA)作用,其作用机制可能与调节免疫器官功能及促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的含量水平有关。张鹰等^[24]采用磺酰罗丹明B比色法和网络药理学考察苗药黑骨藤抗肺癌活性部位,并对西南地区苗药黑骨藤防治肺癌的分子机制进行研究。通过文献查阅筛选出黑骨藤中与肺癌相关的活性成分。黑骨藤抗肺癌活性成分共42个,活性成分与疾病作用的关键靶点53个,GO富集分析显示,黑骨藤作用于肺癌的关键节点为EGFR、GRB2、P53、NF- κ B;信号通路主要富集在细胞增殖、凋亡、应激及泛素介导的水解、MAPK等16条信号通路。进一步证明黑骨藤抗肺癌可能是通过PI3K-AKT和MAKB信号通路发挥作用。莫礼华等^[25]观察隔苗药黑骨藤追风液纸火法治疗急性期肩周炎的临床疗效,治疗60例急性期肩周炎。临床治愈38例,显效12例,有效10例,无效1例,总有效率96.9%,其中1个疗程治愈40例,2个疗程治愈11例,显效9例。隔苗药黑骨藤追风液纸火法治疗急性期肩周炎果明显,疗效确切。张兆奎等^[26]采用随机、对照临床试验的方法,将60例膝骨性关节炎患者随机分为隔苗药黑骨藤追风液纸火法组(治疗组)和热奄包组(对照组)。研究苗药黑骨藤追风液治疗膝骨性关节炎的临床疗效,并运用膝骨性关节炎治疗效果判定标准(JOA)进行临床评分,比较两组临床疗效。对比发现,治疗组临床疗效优于对照组,治疗组在用药过程中未见不良反应。隔苗药黑骨藤追风液纸火法治疗膝骨性关节炎是一种安全有效的方法。梁江等^[27]观察黑骨藤乙醇提取物对人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的增殖以及环氧化酶-2、前列腺素2的表达影响。离体培养第4代的人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞,同时设立空白对照组和实验组,两组细胞均先予白介素-1 β 干预刺激,实验组予不同质量浓度的PFE(125、250、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)干预细胞,24 h后,采用MTT法检测细胞抑制率。用实时定量荧光PCR(RT-PCR)法测定COX-2的mRNA表达。免疫蛋白印记(WB法)检测COX-2的表达量,ELISA法检测48 h末,细胞培养上清中PGE2的含量,干预48 h

后,PFE对细胞抑制率呈量效正相关性,各剂量组的PFE对PGE2、COX-2 mRNA及其蛋白的表达量有明显抑制($P < 0.05$),PFE能抑制IL-1 β 诱导的RAS增殖,在mRNA和蛋白两个层面均对RAS高表达的COX-2有明显抑制效果,同时对该细胞分泌的炎症效应分子PGE2也有抑制作用,这可能是黑骨藤治疗类风湿关节炎的潜在机制之一。

6 展望

近年来,随着黑骨藤的应用越来越广泛,部分研究学者对黑骨藤资源学、分子生药学、提取方法、化学成分、生物活性和临床应用等方面进行深入细致的研究,研制出以黑骨藤为主药的系列产品,包括:黑骨藤追风活络胶囊、黑骨藤追风液、黑骨藤伸筋透骨液、黑骨藤伤湿贴、复方仙灵风湿酒、生龙驱风药酒、枫荷除痹酊等品种。在临床对风湿病、类风湿病的治疗方面,黑骨藤及其复方制剂具有良好的治疗效果和应用价值,彰显良好的发展潜力。对苗药黑骨藤进行全面、细致、深入研究和开发尤为重要,让其进一步标准化、规范化进行种植和管理,使之朝着产业化方向快速发展。

参考文献

- [1] 王瑾,杜江,邱德文.苗药黑骨藤的研究概况[C]//2003全国苗医药学术研讨会.贵阳:2003.
- [2] 贾荷丽,王宇卿,杨媛媛,等.正交试验优选复方黑骨藤提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):37-39.
- [3] 袁德彬,张宏,廖颖,等.正交试验优选黑骨藤的超声提取工艺研究[J].中草药,2012,43(8):1543-1546.
- [4] 周秋月,李琪,李慧敏,等.大孔树脂分离复方黑骨藤药物有效成分工艺的研究[J].中草药,2014,45(21):3098-3104.
- [5] 陈坤,李琪,胡茜,等.大孔树脂D-101纯化黑骨藤复方药物有效部位工艺研究[J].离子交换与吸附,2017,33(4):322-330.
- [6] 张宏,袁德彬,赵爱萍.HPLC测定不同产地黑骨藤中杠柳苷的含量[J].药物分析杂志,2012,32(2):241-245.
- [7] 徐宏,杜江.反相高效液相色谱法测定黑骨藤中杠柳苷I的含量[J].中国民族医药杂志,2009(7):53-54.
- [8] 赵珊,张宝,熊丹丹,等.苗药黑骨藤的化学成分研

- 究[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1513-1518.
- [9] 何燕玲, 李小双, 马雪, 等. 苗药黑骨藤的化学成分研究(II)[J]. 中药材, 2019, 42(2): 311-314.
- [10] 赵超, 甘秀海, 龚小见, 等. 黑骨藤中神经酰胺类化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 83-85.
- [11] 徐宏. 苗药黑骨藤的质量控制研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2008.
- [12] 王文春, 李江, 杨阳. 黔不同产地苗药黑骨藤的质量分析[J]. 中国民族医药杂志, 2012(8): 60-62.
- [13] 胡茜, 李琪, 陈坤, 等. 响应面法优化黑骨藤指纹图谱的液相色谱条件[J]. 中药材, 2017, 40(11): 2632-2637.
- [14] 徐艳, 李琪, 姚瑾, 等. 建立 HPLC 法同时测定复方黑骨藤中 9 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1190-1198.
- [15] 李琪, 陈姚, 周秋月, 等. HPLC 法同时测定复方黑骨藤提取物中 3 种成分的含量[J]. 中药材, 2016, 38(10): 2184-2186.
- [16] 冉启军, 赵建峰. 贵州苗药黑骨藤总黄酮的抗炎镇痛作用[J]. 遵义医学院学报, 2012, 35(4): 283-286.
- [17] 梁勇, 廖颖, 张宏, 等. 黑骨藤的抗肿瘤活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 119-122.
- [18] 甄茹, 俸婷婷, 赵致, 等. 黑骨藤抑制破骨细胞分化及骨吸收能力的活性部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 112-116.
- [19] 李慧敏, 赵喜玲, 李小云, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎的有效成分研究[J]. 中药材, 2016, 39(3): 649-651.
- [20] 王恒, 吉杨丹, 王燕林, 等. 黑骨藤对坐骨神经损伤大鼠的保护作用[J]. 重庆医学, 2019, 48(9): 1489-1492, 1499.
- [21] 王霞, 蒋礼, 何燕玲, 等. 黑骨藤中咖啡酰基奎宁酸类化合物体外抗类风湿性关节炎机制研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1362-1367.
- [22] 张贵源, 龚莉莉, 余跃生. 黑骨藤对 PC12 细胞氧化损伤的保护研究[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(8): 139-140.
- [23] 黄明进, 罗春丽, 郭刚, 等. 黑骨藤抗类风湿性关节炎作用及其分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 174-177.
- [24] 张鹰, 赵苒, 李轩豪, 等. 基于网络药理学的苗药黑骨藤防治肺癌分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 42(2): 399-404.
- [25] 莫礼华, 王兴桂. 隔苗药黑骨藤追风液纸火法治疗急性期肩周炎临床体会[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(20): 96-97.
- [26] 张兆奎, 徐衍华, 肖亚平, 等. 隔苗药黑骨藤追风液纸火法治疗膝骨性关节炎的临床观察[J]. 贵阳中医学院学报, 2012, 34(1): 149-150.
- [27] 梁江, 马武开, 刘正奇, 等. 黑骨藤乙醇提取物影响人类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖及 COX-2、PGE-2 表达的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 24-27.

(收稿日期: 2018-04-24 编辑: 王笑辉)