

益肾降糖胶囊水提液澄清工艺的优选

黄燕, 潘旭东, 林雄, 单丽

作者单位: 福建中医药大学附属人民医院制剂室, 福建 福州 350004

基金项目: 福建省科技厅引导性项目(2018Y0044)

摘要:目的 优选益肾降糖胶囊提取液的澄清工艺。方法 以芍药苷、二苯乙烯苷含量及干浸膏得率为综合评价指标, 选择药液比、壳聚糖加入量、絮凝温度、搅拌时间为考察因素, 设计正交试验优选益肾降糖胶囊的壳聚糖澄清工艺; 同时采用单因素法优选益肾降糖胶囊的醇沉工艺。结果 益肾降糖胶囊提取液最佳的澄清工艺为壳聚糖絮凝工艺, 即药液比 1:2, 絮凝温度 60 ℃, 搅拌时间 20 min, 每 1 克药材加入壳聚糖 0.4 mL。结论 壳聚糖澄清剂处理益肾降糖胶囊水提液的澄清效果良好。优选的澄清工艺稳定可行, 适合于益肾降糖胶囊的制备。

关键词: 中草药; 提取法; 胶囊; 益肾降糖胶囊; 壳聚糖; 芍药苷; 二苯乙烯苷; 工艺学, 制药; 澄清工艺

Optimization of clarification process for the water-extraction solution of *Yishen Jiangtang* capsule

HUANG Yan, PAN Xudong, LIN Xiong, SHAN Li

Author Affiliation: Department of Preparation, Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

Abstract: Objective To optimize clarification process for the extract of *Yishen Jiangtang* capsule. **Methods** The content of paeoniflorin and stilbene glucoside and extract yield was comprehensively evaluated. The solid-liquid ratio, the amount of chitosan, flocculation temperature and stirring time were selected as factors to be investigated. The orthogonal test was adopted to optimize clarification process of *Yishen Jiangtang* capsule by chitosan. The single factor method was adopted to optimize the clarification process for the extract of *Yishen Jiangtang* capsule by alcohol. **Results** The best clarification process for the water-extraction solution of *Yishen Jiangtang* capsule was chitosan flocculation process, solid-liquid ratio was 1:2, the flocculation temperature was 60 ℃, the stirring time was 20 min, and chitosan was added to 0.4 mL per 1 g of medicinal material. **Conclusions** Clarification effect of chitosan as clarifying agent for the water-extraction solution of *Yishen Jiangtang* capsule is effective. The optimized process is stable and feasible, and it is suitable for preparation of *Yishen Jiangtang* capsule.

Key words: Drugs, Chinese herbal; Extraction; Capsules; *Yishen Jiangtang* capsule; Chitosan; Paeoniflorin; Stilbene glucoside; Technology, pharmaceutical; Clarification Process

益肾降糖饮是福建中医药大学附属人民医院的院内制剂(批准文号闽药制字 Z061060503), 由制何首乌、赤芍、黄芩、玄参、地黄、黄芪等 14 味中药组成, 具有滋阴养血、益肾通络之功效, 用于糖尿病之肾虚气弱、阴血亏损、脉络瘀阻证。本品临床使用二十几年, 经临床验证本方对于糖尿病肾病之蛋白尿, 延缓糖尿病肾病的进展有较好的疗效^[1]。因益肾降糖饮为合剂, 未经任何澄清工艺, 久置易产生大量沉淀, 外观差, 且药品体积大不易携带, 液体制剂稳定性较差, 容易酸败; 故本试验拟将其剂型改为胶囊剂。相比其他固体制剂, 胶囊剂具有掩盖药物不良气味和口味、服用方便、崩解快、溶出度高、吸收好、生物利用度高等优点, 成为临床常用的剂

型之一^[2]。因胶囊填充剂量有限, 服用量不可过大, 故需对提取液进行澄清处理, 尽可能去除杂质, 保留适量的浸膏, 要求较低的浸膏得率。处方中何首乌、赤芍为主要成分, 二者的主要活性成分为二苯乙烯苷和芍药苷^[3-5], 因此, 本试验于 2018 年 4—6 月以二苯乙烯苷、芍药苷含量及干浸膏得率为澄清工艺优选的评价指标, 比较壳聚糖澄清与醇沉的澄清效果, 优选较佳的澄清工艺, 为益肾降糖胶囊的工业化生产提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Ulit Mate-3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司); 赛多利斯 CPA-225D 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司); 中佳 SC-3614 型

低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);RW20.DZM.n型悬臂式搅拌机(广州仪科实验室技术有限公司),DZF-6050型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试剂 芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110736—200629);2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号110844—201512,含量以91.0%计);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。制何首乌、赤芍、黄芩、山药等中药饮片均购自福建承创堂有限公司,经该院副主任中药师陈豪鉴定,均符合2015年版《中国药典》一部各饮片项下的规定。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定

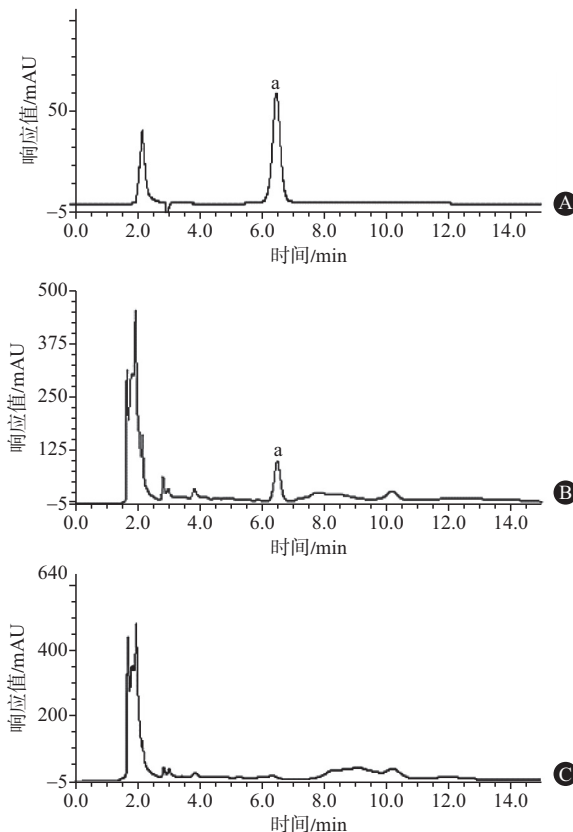
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,置25 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成每1毫升含芍药苷0.392 mg的对照品贮备液。精密吸取上述溶液3 mL置25 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成每1毫升含芍药苷47.04 μ g的溶液

2.1.2 供试品溶液的制备 精密吸取益肾降糖胶囊内容物制成的澄清液2 mL,置25 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性供试品溶液的制备 精密吸取缺赤芍的供试品澄清液2 mL,置25 mL容量瓶,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得阴性供试品溶液。

2.1.4 色谱条件与系统适用性试验^[6-8] 色谱柱:AccLaim 120 C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(19:81);流速:0.8 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C,进样量:10 μ L。理论板数按芍药苷峰计算应不低于3 000。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液,按上述色谱条件进样10 μ L,记录色谱图,结果表明,在与对照品溶液色谱相应位置上,供试品溶液中芍药苷与其它组分分离度良好,阴性供试品溶液无干扰,见图1。

2.1.5 线性关系考察 取2.1.1项下配制的对照品贮备液,分别配制成浓度为31.36、47.04、62.72、78.40、94.08 μ g/mL对照品溶液,按上述色谱条件,依次进样,分别测定两次,记录芍药苷的峰面积,以芍药苷浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $\hat{Y}=0.257\ 1X+1.156\ 0$ ($r=0.999\ 6$),表明芍药苷在31.36~94.08 μ g/mL范围内与峰面积成良好的线性关系。



注:a为芍药苷

图1 各种溶液的高效液相色谱图:A为对照品;B为供试品;C为阴性供试品

2.1.6 精密度试验 精密吸取2.1.1项下的对照品溶液,重复进样6次,每次10 μ L,记录芍药苷的峰面积,并计算相对标准偏差(RSD)为0.08%($n=6$),表明精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批次样品,平行制备6份供试品溶液,按上述色谱条件测定芍药苷峰面积,RSD为1.82%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h测定,记录芍药苷的峰面积,并计算其RSD值为1.33%($n=6$),表明供试品在12 h内基本稳定。

2.1.9 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品溶液1 mL,平行操作6份,置25 mL容量瓶中,各精密加入已知含量的芍药苷对照品贮备液2.5 mL,并用50%甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得加样回收率试验供试品溶液,按2.1.4项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表1。

2.2 二苯乙烯苷含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品适量,置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液;精密吸取上述溶液1.0 mL置50 mL容量瓶中,

表1 芍药苷加样回收率试验结果($n=6$)

试验号	样品中含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回收 率/%	平均加样 回收率/%	RSD /%
1	0.993 8	0.98	1.980 1	100.64		
2	0.993 8	0.98	1.962 1	98.81		
3	0.993 8	0.98	1.970 5	99.66		
4	0.993 8	0.98	1.969 2	99.53	99.64	0.61
5	0.993 8	0.98	1.967 0	99.31		
6	0.993 8	0.98	1.972 6	99.88		

加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成每1毫升含二苯乙烯苷17.654 μg 的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取2.1.2项下的供试品溶液。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 精密吸取缺制何首乌的供试品溶液按2.1.3项下方法制备,即得阴性供试品溶液。

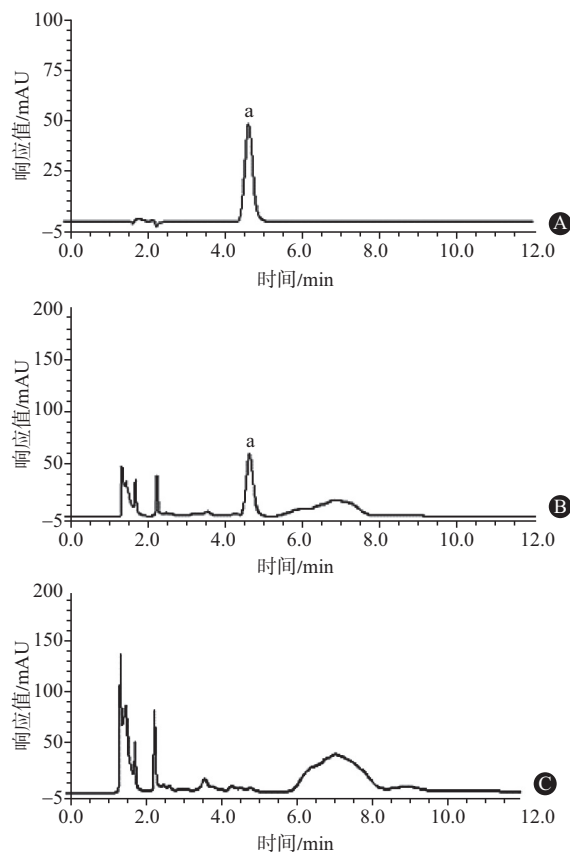
2.2.4 色谱条件与系统适用性试验^[9-11] 色谱柱: AccLaim 120 C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(23:77);流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:320 nm,进样量:10 μL 。理论板数按2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷峰计算应不低于2 000。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性供试品溶液,按上述色谱条件进样10 μL ,记录色谱图,结果表明,在与对照品色谱相应位置上,供试品溶液中二苯乙烯苷与其它组分分离度良好,阴性供试品溶液无干扰,见图2。

2.2.5 线性关系考察 取2.2.1项下配制的对照品贮备溶液,分别稀释成浓度为3.530 8、7.061 6、8.827 0、17.654 0、26.475 0、44.135 0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按2.2.4项下色谱条件,依次进样,分别测定两次,记录二苯乙烯苷的峰面积,以二苯乙烯苷浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $\hat{Y}=0.581\ 5X+0.210\ 8(r=0.999\ 6)$,表明二苯乙烯苷在3.530 8~44.135 0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 精密吸取2.2.1项下的对照品溶液,重复进样6次,记录二苯乙烯苷的峰面积,并计算其RSD为0.36%($n=6$),表明精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批次样品,平行制备6份供试品溶液,按上述色谱条件测定二苯乙烯苷的峰面积,RSD为0.98%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h测定,记录二苯乙烯苷峰面积,并计算其RSD为1.12%($n=6$),表明供试品在12 h内基本稳定。



注:a为二苯乙烯苷

图2 各种溶液的高效液相色谱图:A为对照品;B为供试品;C为阴性供试品

2.2.9 加样回收率试验 精密吸取已知含量的样品溶液1 mL,平行操作6份,置25 mL容量瓶中,各精密加入已知含量的二苯乙烯苷对照品溶液10 mL,并用50%甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得加样回收率试验供试品溶液,按2.2.4项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表2。

表2 二苯乙烯苷加样回收率试验结果($n=6$)

试验号	样品中含 量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回 收率/%	平均加样回 收率/%	RSD/%
1	179.07	176.54	351.54	97.69		
2	179.07	176.54	349.82	96.72		
3	179.07	176.54	353.59	98.86		
4	179.07	176.54	348.83	96.16	97.77	1.38
5	179.07	176.54	350.99	97.38		
6	179.07	176.54	355.22	99.78		

2.3 益肾降糖胶囊提取液的制备 按100 mL处方量称取药材,加8倍量的水,煎煮两次,每次1 h,药液过滤,合并滤液备用。

2.4 浸膏得率的测定 取2.3项下的滤液,按以下各澄清工艺澄清药液,取澄清液,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,置真空干燥箱60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至

恒重,移至干燥器中,冷却 30 min,迅速称重。计算干浸膏得率(%) = 干浸膏质量/药材质量×100%。

2.5 壳聚糖澄清工艺的优化

2.5.1 壳聚糖溶液的配制 称取 10 g 壳聚糖,加 1% 醋酸溶液 1 000 mL,搅拌,静置使其充分溶胀,搅匀,即得 1% 壳聚糖溶液。

2.5.2 壳聚糖澄清水提液的制备 取 2.3 项下的滤液 9 份,分别将药液浓缩为药液比(药材质量:药液体积)1:2、1:4、1:6 的溶液各 3 份。

2.5.3 壳聚糖澄清工艺参数的筛选 参考相关文献^[12-14],壳聚糖的澄清效果主要与药液比、壳聚糖加入量(每 1 克药材所需壳聚糖溶液的体积)、絮凝温度、搅拌时间、药液 PH、搅拌速率、静置时间等因素有关,根据预试验结果,筛选 A 药液比、B 壳聚糖加入量、C 絮凝温度、D 搅拌时间进行优化,选择 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,对 2.5.2 项下的 9 份提取液,按表 3 设计进行澄清工艺处理,将 9 份絮凝液室温静置 24 h,离心(转速 4 000 r/min,时间 30 min),取上清液,将药液浓缩至 100 mL,备用。以澄清液中芍药苷、二苯乙烯苷含量和浸膏得率为评价指标,采用综合加权评分法进行数据处理,三项指标权重系数分别为 0.4、0.4、0.2;综合评分 = 芍药苷含量/芍药苷含量最大值×100×0.4 + 二苯乙烯苷含量/二苯乙烯苷含量最大值×100×0.4 + 最小浸膏得率/浸膏得率×100×0.2;满分为 100 分,综合评分值越大,表示澄清效果越好。试验安排及结果见表 4、5。

2.5.4 统计学方法 本试验正交设计选用 $L_9(3^4)$ 表头,采用正交助手 II V3.1 分析软件进行数据分析,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

表 3 澄清工艺正交试验因素水平表

水平	A 药液比/ g:mL	B 壳聚糖加入量/ (mL/g)	C 絮凝温 度/℃	D 搅拌时间/ min
1	1:2	0.4	20	10
2	1:4	0.8	40	15
3	1:6	1.2	60	20

表 5 综合评分方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P 值
A	247.609	2	232.061	< 0.01
B(误差)	1.067	2	1.00	
C	27.953	2	26.198	< 0.05
D	19.198	2	17.993	> 0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

2.5.5 壳聚糖澄清工艺结果分析 本正交试验以芍药苷、二苯乙烯苷、浸膏得率为指标,进行综合评分。由各因素直观分析的 K 值高低可以得出影响絮凝效果的因素主次顺序为 A > C > D > B,即药液比 > 絮凝温度 > 搅拌时间 > 壳聚糖加入量,最佳絮凝工艺组合为 $A_1B_1C_3D_3$ 。以极差值最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明搅拌时间差异无统计学意义($P > 0.05$),药液比、絮凝温度对壳聚糖絮凝纯化工艺的影响均差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)^[15]。

2.5.6 壳聚糖澄清工艺验证试验 按处方比例称取 200 mL 处方量药材,按 2.3 项下方法制得水提液,平行操作 3 份,按照最佳壳聚糖澄清工艺进行 3 次重复验证试验,测定芍药苷、二苯乙烯苷的含量及浸膏得率,结果分别为 1.113 mg/mL、0.207 2 mg/mL、

表 4 正交试验设计 $L_9(3^4)$ 与结果考察

试验号	A	B	C	D	芍药苷含量/ (mg/mL)	二苯乙烯苷含量/ (mg/mL)	干浸膏得率/%	综合评分/分
1	1	1	1	1	1.036 8	0.164 2	18.77	91.71
2	1	2	2	2	1.045 7	0.163 3	18.34	92.27
3	1	3	3	3	1.164 8	0.179 1	19.48	98.73
4	2	1	2	3	0.858 0	0.155 5	19.35	83.04
5	2	2	3	1	0.832 2	0.150 6	18.29	82.16
6	2	3	1	2	0.788 4	0.144 4	18.24	79.32
7	3	1	3	2	0.993 8	0.163 5	20.31	88.61
8	3	2	1	3	0.977 8	0.152 1	19.35	86.40
9	3	3	2	1	0.982 2	0.142 2	19.61	84.09
K_1 值	94.237	87.787	85.810	85.987				
K_2 值	81.507	86.943	86.467	86.733				
K_3 值	86.367	87.380	89.833	89.390				
R 值	12.730	0.844	4.023	3.403				

注: K_1 、 K_2 、 K_3 分别为试验水平为 1、2、3 时各因素综合评分均值, R 为极差

17.65%(RSD分别为0.59%、1.42%、1.82%, $n=3$),说明该工艺稳定可行。

2.6 醇沉工艺 乙醇沉淀法能去除药液中的淀粉、树胶等多糖类和蛋白质等杂质,影响醇沉效果的主要因素有药液浓缩比(药材质量:药液体积)和药液含醇量,故采用单因素试验对这两个因素进行考察^[16-17]。

2.6.1 药液浓缩比的考察 取2.3项下的滤液3份,将药液分别浓缩至2:1、1:1、1:2,加入95%乙醇,边加边搅拌,使药液含醇量为70%,药液静置24 h,离心(转速4 000 r/min,时间30 min),取上清液,将药液浓缩至100 mL。按2.1、2.2、2.4项下方法分别测定澄清液中芍药苷、二苯乙炔苷含量及浸膏得率,按2.5.3项下方法进行综合评分,结果见表6。

表6 药液浓缩比考察结果

试验号	药液浓缩比/(g:mL)	芍药苷含量/(mg/mL)	二苯乙炔苷含量/(mg/mL)	浸膏得率/%	综合评分/分
1	2:1	0.971 4	0.189 6	14.82	96.06
2	1:1	0.976 2	0.195 2	15.15	96.89
3	1:2	0.982 1	0.207 8	15.42	99.22

表6结果表明:药液浓缩比为1:2时,综合评分最高,因此选择药液浓缩比1:2。

2.6.2 药液含醇量的考察 取2.3项下的滤液7份,将药液浓缩为1:2,分别加入95%乙醇,边加边搅拌,使含醇量分别为50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%,药液静置24 h,离心(转速4 000 r/min,时间30 min),取上清液,将药液浓缩至100 mL。按2.1、2.2、2.4项下方法分别测定澄清液中芍药苷、二苯乙炔苷含量及浸膏得率,按2.5.3项下方法进行综合评分,结果见表7。

表7 药液含醇量考察结果

试验号	药液含醇量/%	芍药苷含量/(mg/mL)	二苯乙炔苷含量/(mg/mL)	浸膏得率/%	综合评分/分
1	50	1.127 7	0.155 1	16.52	88.55
2	55	1.075 2	0.166 4	16.42	89.05
3	60	0.944 2	0.188 9	16.25	89.06
4	65	0.969 7	0.197 7	15.86	92.17
5	70	0.981 1	0.200 8	15.44	93.69
6	75	0.976 4	0.197 0	14.79	93.59
7	80	0.968 4	0.195 0	14.58	93.19

表7结果表明:含醇量为70%时,综合评分最高,因此选择药液含醇量为70%。

2.6.3 醇沉工艺验证试验 按处方比例称取200 mL处方量药材,按2.3项下方法制得水提液,平行操作3份,将药液浓缩为1:2,加入95%乙醇,边加边

搅拌,使含醇量为70%,药液静置24 h,离心(转速4 000 r/min,时间30 min),取上清液,将上清液浓缩至200 mL,备用。测定芍药苷、二苯乙炔苷的含量及浸膏得率,结果分别为0.980 6 mg/mL、0.207 9 mg/mL、15.24%(RSD分别为0.78%、1.28%、1.22%, $n=3$),说明该工艺稳定可行。

2.7 最佳澄清工艺的确定 将2.5.4与2.6.3项下两种工艺验证结果进行比较,壳聚糖澄清处理的样品芍药苷含量比醇沉工艺高13.5%,二苯乙炔苷的含量差别不大,但浸膏得率也高15.4%。壳聚糖澄清工艺不利于填充,可在后续成型工艺中优化,但在大规模生产中,若采取醇沉工艺,生产车间需要防爆设计,建造成本高,安全性能要求高。综合考虑生产成本、生产安全性,采用壳聚糖澄清工艺,具有更明显的优势,更适合医院制剂的发展,故最终确定益肾降糖胶囊水提液的澄清工艺采用壳聚糖絮凝澄清法,即药液浓缩比1:2,在60℃絮凝温度,每1克药材壳聚糖加入量为0.4 mL,搅拌时间20 min。

根据最佳澄清工艺,100 mL澄清液可约得9 g干浸膏,初步设想浸膏:辅料的比例为3:1,采用95%乙醇制软材,过二号筛制粒,四号筛整粒,选择零号胶囊,每粒装0.5 g,可得24粒胶囊。后续具体工艺将在益肾降糖胶囊成型工艺研究中继续探讨。

3 讨论

本研究含量测定选择的指标为芍药苷、二苯乙炔苷,用于优化益肾降糖胶囊水提液的澄清工艺。益肾降糖胶囊由14味中药组成,成分复杂,芍药苷、二苯乙炔苷只是其众多有效物质的其中2种,以两种成分反映整个复方制剂的情况有一定的片面性。后续会在指标成分的选择上做进一步的研究,希望能更客观地反映整个复方制剂的情况。

参考文献

- [1] 叶彬华,钟索娅,张政,等.益肾降糖饮治疗糖尿病肾病Ⅲ期气阴两虚夹瘀疗效及舌象观察30例[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(5):45-47.
- [2] 崔春子.浅谈影响中药硬胶囊剂质量的因素及对策[J].医学信息,2011,24(10):191-192.
- [3] 任红微,魏静,高秀梅,等.何首乌及其主要化学成分药理作用及机制研究进展[J].药物评价研究,2018,41(7):1357-1361.
- [4] 黄世琼,张毅,杨军宣.何首乌主要成分二苯乙炔苷的研究进展[J].海峡药学,2016,28(6):37-39.
- [5] 王凤红,王丽,侯慧卿,等.赤芍药化学成分及抗肿瘤活性研究进展[J].河北中医,2015,37(4):614-618.
- [6] 王军仓.HPLC法快速测定妇宝颗粒中芍药苷的含量[J].西北药学杂志,2017,32(2):160-162.
- [7] 陈永荣,张荣嘎,吴勇,等.HPLC法测定十味桂芪真武颗粒中芍

- 药苷的含量[J].安徽医药, 2014, 18(12): 2258-2260.
- [8] 黄卫娟, 何秀云, 刘杰, 等. HPLC法测定八珍丸(浓缩丸)中芍药苷的含量[J].中国药房, 2016, 27(15): 2126-2127.
- [9] 徐冲, 刘霞, 范智琴, 等. 高效液相色谱法测定补肾养血颗粒中二苯乙烯苷含量[J].中国药业, 2017, 26(9): 20-22.
- [10] 胡翔. 参芪首乌颗粒质量标准研究[J].安徽医药, 2018, 22(5): 819-821.
- [11] 尹思泳, 陈钟扬, 梁华伦, 等. HPLC法测定乙肝宁颗粒中二苯乙烯苷含量[J].中国民族民间医药, 2015, 24(15): 11-12.
- [12] 黄燕, 沈小苹, 潘旭东. 艾可胶囊的澄清工艺优选[J].中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 58-61.
- [13] 王柏强, 刘福, 何效平, 等. 杜仲叶水提液除杂工艺的优化[J].中成药, 2016, 38(6): 1418-1421.
- [14] 王勇, 邹韵, 李永辉. 正交试验优选裸花紫珠水提液的壳聚糖絮凝澄清工艺[J].海南医学院学报, 2015, 21(1): 7-9.
- [15] 张玉婷, 高家荣, 刘健, 等. 正交试验法优选五味温通除痹胶囊水提工艺[J].安徽医药, 2014, 18(10): 1833-1836.
- [16] 胡俊杰, 肖伊, 吕秋霞, 等. 活血消癥片水提液的澄清工艺研究[J].中成药, 2012, 34(10): 2037-2040.
- [17] 彭颖, 雷昌, 唐颖楠, 等. 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺对党参水提液的影响[J].中国中医药信息杂志, 2017, 24(12): 81-84.
- (收稿日期: 2018-12-07, 修回日期: 2019-01-16)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.007

◇ 药学研究 ◇

CRISPR/Cas 9 介导的基质 Gla 蛋白基因敲除对破骨细胞分化的影响

赵俐婷¹, 王乃宁², 贺芳¹, 张燕¹作者单位:¹西安交通大学第一附属医院转化医学中心, 陕西 西安 710061;²西安交通大学生命学院, 陕西 西安 710061

通信作者: 张燕, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为骨稳态调控机制, E-mail: zhangyan1114@xjtu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670806, 81972133, 81300716); 中央高校基本科研业务费(xzy01201909);

陕西省自然科学基金基础研究计划(2017JM8015)

摘要:目的 利用 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术, 构建基质 Gla 蛋白(MGP)基因敲除的 RAW264.7 巨噬细胞系, 明确 MGP 基因在破骨细胞分化过程中的作用。方法 利用在线软件分析并筛选出 3 个针对 MGP 基因外显子区的单链向导 RNA(gRNA), 人工合成 gRNA 寡核苷酸序列, 并将其插入线性化的 LentiCRISPRv2 质粒中, 构建成 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒。将重组质粒与 psPAX2、VSVG 包装质粒一同转染 293-T 细胞, 包装并收集重组慢病毒, 将其感染 RAW264.7 细胞。经嘌呤霉素筛选得到稳定 RAW264.7 细胞系, 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)、蛋白质印迹法(Western Blot)验证 MGP mRNA 及蛋白表达水平。qPCR 检测破骨细胞分化标志分子的表达情况。结果 成功构建了 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA 重组质粒, 成功包装了含有 MGP-gRNA 的重组慢病毒, 筛选得到了稳定低表达 MGP 的 RAW264.7 细胞系。qPCR 及蛋白质印迹法检测显示, 其 MGP mRNA、蛋白表达显著性下调($P < 0.05$)。qPCR 结果显示, 最具有代表性的 LentiCRISPRv2-MGP-gRNA1 细胞破骨标志分子 Itgb3 (2.29 ± 0.17)、Acp5 (2.86 ± 0.15)、Ctsk (2.07 ± 0.13) 的 mRNA 水平均显著上调($P < 0.05$)。结论 利用 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术成功构建了 MGP 基因敲除的 RAW264.7 细胞系, 敲除 MGP 后 RAW264.7 细胞破骨分化能力增强。

关键词: 基因敲除技术; 骨钙素; 破骨细胞; 转染; CRISPR/Cas 9; RAW264.7 细胞(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)

The effect of CRISPR/Cas 9-mediated MGP knockout on osteoclast differentiation

ZHAO Liting¹, WANG Naining², HE Fang¹, ZHANG Yan¹

Author Affiliations: ¹Center for Translational Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; ²School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: Objective To construct matrix Gla protein (MGP) knockout RAW264.7 cell line by CRISPR/Cas 9 technology and to make clear the role of MGP in osteoclast differentiation. **Methods** Three single-stranded guide RNAs (gRNAs) targeting MGP gene exons were screened using the online tool before synthesized gRNAs were inserted into the linear LentiCRISPRv2 plasmid respectively, and the LentiCRISPRv2-MGP-gRNA recombinant plasmids were constructed. Then the recombinant plasmids, together