

尖叶假龙胆有效成分的活性追踪分离及对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用研究

吕丽娟¹, 任 凯², 那木汗², 李旻辉^{2,3*}

1. 天津农学院基础科学学院, 天津 300384

2. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060

3. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010020

摘要: 目的 从尖叶假龙胆不同极性部位中寻找对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤具有较强保护作用的化合物。方法 采用活性追踪分离的方式, 通过 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞损伤建立氧化应激损伤模型, 利用实时细胞分析技术 (real-time cell analysis, RTCA) 研究尖叶假龙胆不同极性部位对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用; 采用 HPLC 法测定具有活性的单体化合物的质量分数, 并确定其化学结构。结果 尖叶假龙胆正丁醇和醋酸乙酯部位对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用。同时, 从尖叶假龙胆正丁醇和醋酸乙酯部位中分离得到的化合物 **1**、**2**、**3**、**5** 也对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用。其中化合物 **1** 和 **2** 的保护作用在 3.125~50.000 μmol/L 呈一定剂量依赖性, 浓度为 50.000 μmol/L 时, 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用最强; 而化合物 **3** 和 **5** 的保护作用在 3.125~50.000 μmol/L 内不具有剂量依赖性, 浓度分别为 25.000、3.125 μmol/L 时, 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用最强。经结构鉴定, 化合物 **1**、**2**、**3**、**5** 分别为维菊叶龙胆酮、去甲基维菊叶龙胆酮、当药醇苷及去甲基当药醇苷。结论 化合物 **1**、**2**、**3**、**5** 对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞氧化损伤具有保护作用, 可能是尖叶假龙胆抗氧化的主要活性成分。

关键词: 尖叶假龙胆; PC12 细胞; H₂O₂; 氧化应激; 实时细胞分析技术; 维菊叶龙胆酮; 去甲基维菊叶龙胆酮; 当药醇苷; 去甲基当药醇苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)10-1957-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.005

Bioassay-guided separation of effective components from *Gentianella acuta* and their protective effect on oxidative damage in PC12 cells induced by H₂O₂

LV Li-juan¹, REN Kai², NA Mu-han², LI Min-hui^{2,3}

1. Department of Basic Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China

2. Baotou Medical College, Baotou 014060, China

3. Inner Mongolia Institute of Traditional Chinese Medicine, Hohhot 010020, China

Abstract: Objective To investigate the compounds of *Gentianella acuta* with strong protective effect on oxidative damage in PC12 cells induced by H₂O₂. **Methods** Damage model of PC12 cells was established by H₂O₂ and real-time cell analysis (RTCA) was utilized to evaluate the protective effect of extracts and compounds. Meanwhile, bioassay-guided method was applied to separating effective components, and HPLC was used for the determination and structure confirmation of compounds. **Results** Fractions of *n*-butanol and acetic ether showed protective effect on oxidative damage in PC12 cells induced by H₂O₂. The anti-oxidant activity of compounds **1** and **2** showed dose-dependent manner in the scope of 3.125—50.000 μmol/L, and the protective effect was the strongest at the concentration of 50.000 μmol/L. Compounds **3** and **5** showed the best protective effect at the concentration of 25.000 μmol/L and 3.125 μmol/L respectively. Compounds **1**, **2**, **3**, and **5** were identified as bellidifolin, demethylbellidifolin, swertianolin and norswertianolin, respectively. **Conclusion** Compounds **1**, **2**, **3**, and **5** show protective effect on oxidative damage in PC12 cells induced by H₂O₂, maybe the main active components in *G. acuta*. But the mechanism is still uncertain, and further exploration is imperative.

收稿日期: 2017-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160504, 81303306); 天津市应用基础与前沿技术 Research 计划 (15JCQNJC13400)

作者简介: 吕丽娟 (1982—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为药物分析与晶型药物研究。E-mail: lv_lijuan@aliyun.com

*通信作者 李旻辉 (1978—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为蒙药资源利用与保护。E-mail: li_minhui@aliyun.com

Key words: *Gentianella acuta* (Michx.) Hulten; PC12 cells; H_2O_2 ; oxidative stress; real-time cell analysis; bellidifolin; demethylbellidifolin; swertianolin; norswertianolin

氧化应激 (oxidative stress) 是指机体内氧自由基的产生与清除失去平衡, 或外源性氧化剂的过量摄入导致活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在体内堆积引起细胞毒性^[1]。研究表明, 与衰老相关的中枢神经系统退行性病变的发病机制均与氧化应激有一定的关系, 如帕金森病、老年痴呆及多发性硬化等^[2-4]。

尖叶假龙胆 *Gentianella acuta* (Michx.) Hulten, 又名苦龙胆, 蒙药名为阿古特-其其格, 是龙胆科假龙胆属一年生草本植物, 在前期研究中发现该植物主要含有吡啶类、裂环烯醚萜类、萜类和甾醇类化合物^[5]。吡啶类化合物主要由苯甲酮转化而来, 是近代天然产物中的一类重要活性成分, 多分布于龙胆科^[6]、藤黄科^[7]、远志科^[8]和豆科^[9]。近年来的研究已经表明吡啶类化合物具有显著的抗氧化活性^[10-11]。

本研究利用 PC12 细胞代替神经元, 进行神经细胞培养, 并利用 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤制备模型。采用活性追踪分离的方法, 并结合 HPLC 法和实时细胞分析技术 (real-time cell analysis, RTCA) 从尖叶假龙胆不同极性部位中寻找对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤具有较强保护作用的化合物, 为明确尖叶假龙胆的物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo 311 CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司); UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (美国 Thermo 公司); Gen Pure 超纯水系统 (美国 Thermo 公司); E-Plate 16 细胞检测板、xCELLigence RTCA 实时细胞功能分析仪 (艾森生物-杭州有限公司); BSC-IIA2 生物安全柜 (上海上净净化设备有限公司); ME 204 型分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); HVE-50 型高压灭菌锅 (上海博讯实业有限公司); SW-CJ 超净台 (上海新苗医疗器械制造有限公司); 101-2-型电热恒温鼓风干燥箱 (上海乔枫实业有限公司); XDS-1B 倒置显微镜 (上海比目仪器厂); XB.K.25 血球计数板 (上海求精生化试剂仪器有限公司); E4 XLS 移液器 (德国 RAININ 公司)。

1.2 药品与试剂

尖叶假龙胆植株于 2013 年 7 月采集于内蒙古自治区根河市, 由包头医学院张春红教授鉴定为龙胆科假龙胆属植物尖叶假龙胆 *Gentianella acuta*

(Michx.) Hulten; DMEM 高糖培养基、马血清均购自 Gibco 公司; 四季青胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司; H_2O_2 购自天津富宇试剂有限公司; PBS、DMSO、青霉素和链霉素均购自海克隆生物化学制品有限公司; 多聚赖氨酸购自 Sigma 公司。雏菊叶龙胆酮、去甲基雏菊叶龙胆酮、当药醇苷、去甲基当药醇苷 4 种对照品均为自制, 经 MS、NMR 鉴定, HPLC 测定质量分数均大于 95%。

1.3 细胞

低分化大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 (PC12 细胞) 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

2 方法与结果

2.1 PC12 细胞的培养

将 PC12 细胞培养于含 5% 胎牛血清、5% 马血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 完全培养基中, 置于饱和湿度的 CO_2 培养箱中 (条件为 37 °C、5% CO_2), 每 2~3 天传代 1 次。选取生长状态良好的对数生长期细胞进行实验。

2.2 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化应激损伤最佳浓度及作用时间的确定

向 E-plate 16 孔板中加入 DMEM 完全培养基, 每孔 50 μ L, 放入 xCELLigence RTCA 实时细胞功能分析仪中, 进行基线校准。将 PC12 细胞悬液浓度调整为 2×10^5 个/mL, 接种于 E-plate 16 孔板, 每孔加 100 μ L, 37 °C、5% CO_2 条件下孵育 12 h 后, 弃去原培养液, 将 PC12 细胞分为对照组、模型组。模型组加入不同浓度的 H_2O_2 (50、100、200、400、600 μ mol/L) 溶液, 每个浓度设置 3 个复孔, 每孔加入 100 μ L, 造成细胞的氧化损伤; 对照组加入 100 μ L DMEM 完全培养基, 设置 3 个复孔。重新将 E-plate 16 放回 xCELLigence RTCA 内, 每隔 15 min 监测 1 次并记录细胞指数值 (cell index, CI), 连续检测 33 h (从接种细胞开始计时)。以时间为横坐标, CI 值为纵坐标, 绘制不同浓度 H_2O_2 致 PC12 细胞损伤曲线, 确定 PC12 细胞氧化应激模型的最佳 H_2O_2 浓度及作用时间, 结果见图 1。

结果表明, H_2O_2 作用于 PC12 细胞后, 与对照组相比, 模型组随着 H_2O_2 浓度的增加, PC12 细胞 CI 值逐渐降低, 呈现一定剂量依赖性, 浓度为 600 μ mol/L 时细胞 CI 值最低; 而 H_2O_2 浓度为 50、100、

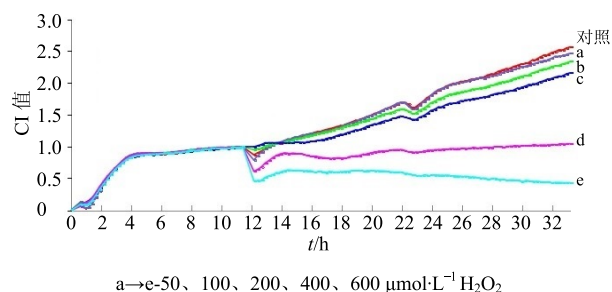


图 1 不同浓度 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤程度比较

Fig. 1 Comparison on degree of damage of PC12 cells induced by H_2O_2

200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 PC12 细胞的氧化损伤不明显。在 400、600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于 PC12 细胞 2~6 h 内, 对细胞的氧化损伤趋于平稳, 故本实验选择 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 6 h 进行后续实验。

2.3 尖叶假龙胆各极性部位对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

2.3.1 尖叶假龙胆各极性部位的制备 取尖叶假

龙胆干燥粉末 305 g, 用 70%乙醇连续提取 3 次, 得到 101 g 提取物。在室温下, 用水溶解, 然后依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得到提取物 5.94、15.37、13.61 g, 以及水相浸膏 15.52 g。

2.3.2 RTCA 测定各极性部位对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用 调整 PC12 细胞浓度至 2.0×10^5 个/mL, 接种于 E-plate 16 孔板, 每孔加 100 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 12 h 后, 将 PC12 细胞分为对照组、模型组及给药组。弃去原培养液, 给药组加入不同质量浓度 (6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/mL}$) 4 个极性部位溶液, 模型组、对照组加入 DMEM 完全培养基, 进行预处理, 每个质量浓度设置 3 个平行, 每孔加 100 μL , 预处理 12 h; 预处理后给药组和模型组加入 H_2O_2 溶液, 使其终浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$, 放入 xCELLigence RTCA 中, 其余操作与“2.2”项中数据采集及曲线绘制方法相同, 结果见图 2。

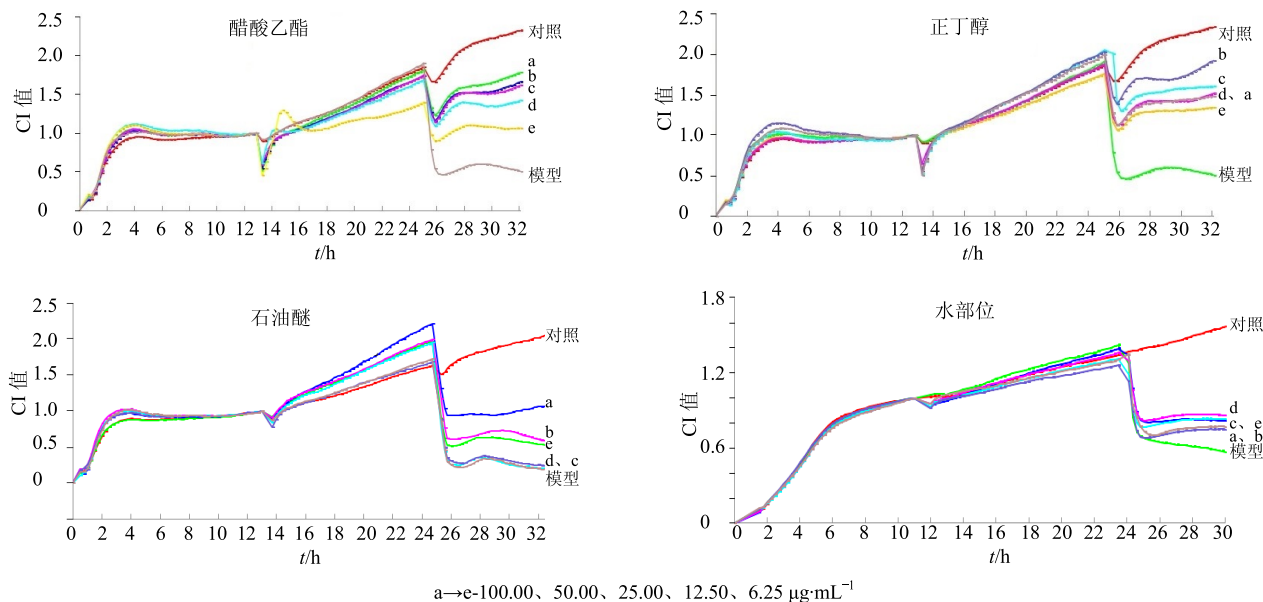


图 2 RTCA 实时监测尖叶假龙胆不同极性部位对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

Fig. 2 Protective effect of different extracts from *G. acuta* on oxidative damage in PC12 cells induced by H_2O_2 detected by RTCA

从图 2 可以看出, 12 h 时用不同质量浓度醋酸乙酯部位处理 PC12 细胞, 细胞生长状态良好, 表明醋酸乙酯部分对 PC12 细胞无明显毒性作用; 在 24 h 时加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 和对照组相比, 模型组细胞 CI 值明显降低, 表明 H_2O_2 造模成功; 而且醋酸乙酯部位质量浓度在 6.25~100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能够明显减弱 H_2O_2 对 PC12 细胞的损伤, 当质量浓度为 100.00 $\mu\text{g/mL}$ 时对 PC12 细胞损伤的保护作用

最强。

12 h 时用不同质量浓度正丁醇部位处理 PC12 细胞, 细胞仍成对数生长, 表明对 PC12 细胞无毒性作用; 在 24 h 时加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 经过正丁醇部位预处理后的细胞 CI 值明显高于模型组, 但并不呈现剂量依赖性, 质量浓度为 50.00 $\mu\text{g/mL}$ 时对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用最强。从图 2 可以看出, 石油醚与水部位对 H_2O_2 诱导 PC12

细胞损伤无保护作用。

2.4 尖叶假龙胆正丁醇及醋酸乙酯部位馏分对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

2.4.1 尖叶假龙胆正丁醇及醋酸乙酯部位馏分的制备 将醋酸乙酯部位 (10 g) 通过硅胶柱 (200~300 目, 150 g, 石油醚-醋酸乙酯, 7:3) 分离, 得到 6 个主要馏分 (A1~A6)。然后通过硅胶柱 (200~300 目, 150 g, 石油醚-醋酸乙酯, 7:3) 进一步纯化 A3 (6.91 g), 得到 20 个馏分 (B1~B20)。再通过薄层色谱 (TLC) 将它们分成 3 组 B1~B2 (1.4 g)、B3~B11 (4.47 g)、B12~B20 (0.86 g)。将正丁醇

部位 (10 g) 通过硅胶柱 (200~300 目, 200 g, 醋酸乙酯-甲醇, 7:3) 分离, 得到 4 个馏分 C1 (1.72 g)、C2 (5.7 g)、C3 (1.53 g)、C4 (0.48 g)。

2.4.2 RTCA 测定正丁醇及醋酸乙酯部位各馏分对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用 基于上述结果, 进一步跟踪了正丁醇及醋酸乙酯部位的 7 个馏分 (B1~B2、B3~B11、B12~B20 和 C1、C2、C3、C4) 的抗氧化活性, 加药组加入不同质量浓度 (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{g/mL}$) 各馏分 100 μL 。其余实验操作及数据处理方式与“2.3.2”项相同, 结果见图 3。

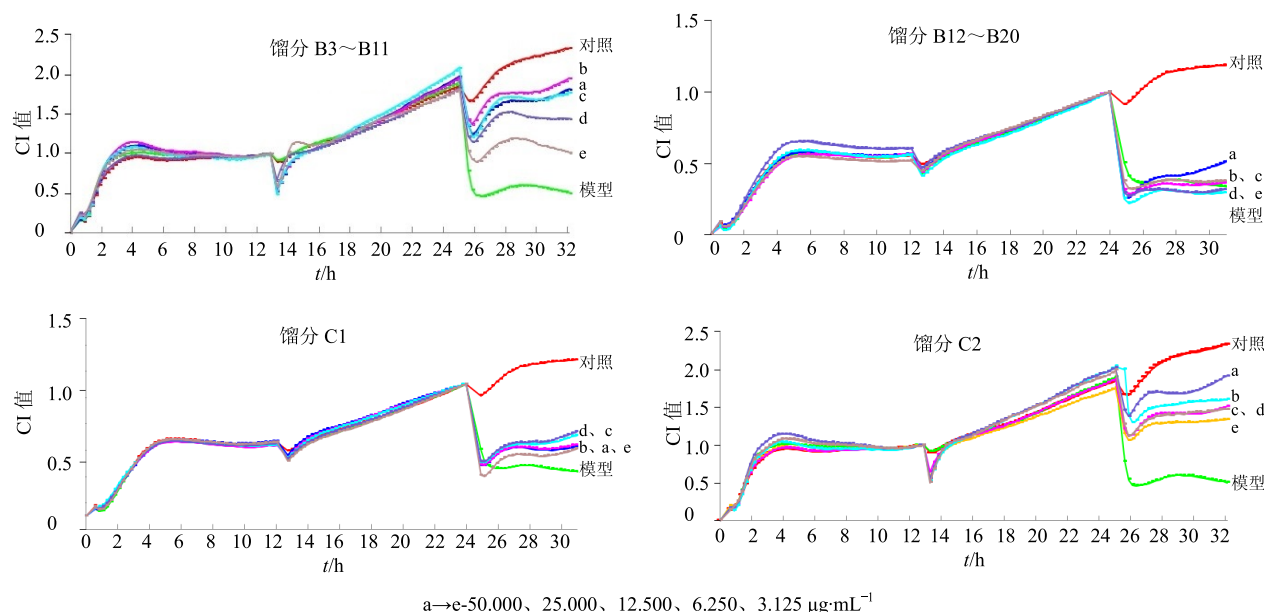


图 3 RTCA 实时监测尖叶假龙胆正丁醇及醋酸乙酯部位各馏分对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

Fig. 3 Protective effect of different *n*-butanol and ethyl acetate extracts from *G. acuta* on oxidative damage in PC12 cells induced by H_2O_2 detected by RTCA

从图 3 可以看出, 醋酸乙酯和正丁醇部位各馏分对 PC12 细胞无明显毒性作用, 而且 H_2O_2 能够明显降低 CI 值。其中, 馏分 B3~B11 和 C2 质量浓度为 3.125~50.000 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能够明显改善 H_2O_2 对 PC12 细胞的氧化损伤, 但并不呈现剂量依赖性。此外, 醋酸乙酯和正丁醇部位的其他 5 个馏分 (B1~B2、B12~B20、C1、C3、C4) 对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤无保护作用, 因此只举了 B12~B20 和 C1 实例, 其余馏分的 RTCA 图与上述 2 部分图形趋势相同, 故未列出。

2.5 单体化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

2.5.1 单体化合物的制备 将馏分 B3~B11 经

Sephadex LH-20 柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (7:3) 洗脱, 得到化合物 1 (22 mg) 和 2 (18 mg)。

将馏分 C2 经 Sephadex LH-20 柱色谱, 以 60% 甲醇洗脱, 得到化合物 3 (21 mg)、4 (14 mg)、5 (15 mg) 和 6 (19 mg)。

2.5.2 RTCA 测定 6 个单体化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用 进一步研究从馏分 B3~B11 和 C2 分离得到的单体化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用, 给药组加入不同浓度 (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{mol/L}$) 化合物 1~6, 其余实验操作及数据处理方式与“2.3.2”项相同, 结果见图 4。

从图 4 可以看出, 12 h 时用不同浓度单体化合

物 1 与 2 处理 PC12 细胞, 细胞生长状态良好, 表明单体化合物 1 与 2 对 PC12 细胞无明显毒性作用; 在 24 h 时加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 与对照组相比, 模型组能够明显降低细胞 CI 值, 表明 H_2O_2 造模成功; 而且单体化合物 1 与 2 在 3.125~50.000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能够明显改善 H_2O_2 对 PC12 细胞的氧化损伤, 呈现浓度依赖性, 在药液浓度为 50.000 $\mu\text{mol/L}$ 时对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用最强。从图 4 可以看出, 12 h 时加入浓度为 3.125~50.000 $\mu\text{mol/L}$

的单体化合物 3 与 5, 细胞仍呈对数生长, 表明单体化合物 3 与 5 对 PC12 细胞无毒性作用; 加入 H_2O_2 后, 单体化合物 3 与 5 预处理的细胞 CI 值明显高于模型组, 但并不呈现剂量依赖性, 浓度分别为 25、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 时对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用最强。结果表明, 单体化合物 1、2、3、5 能提高 H_2O_2 处理过的 PC12 细胞的活力, 具有抗氧化作用。从图 4 可以看出, 化合物 4、6 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞氧化损伤无保护作用。

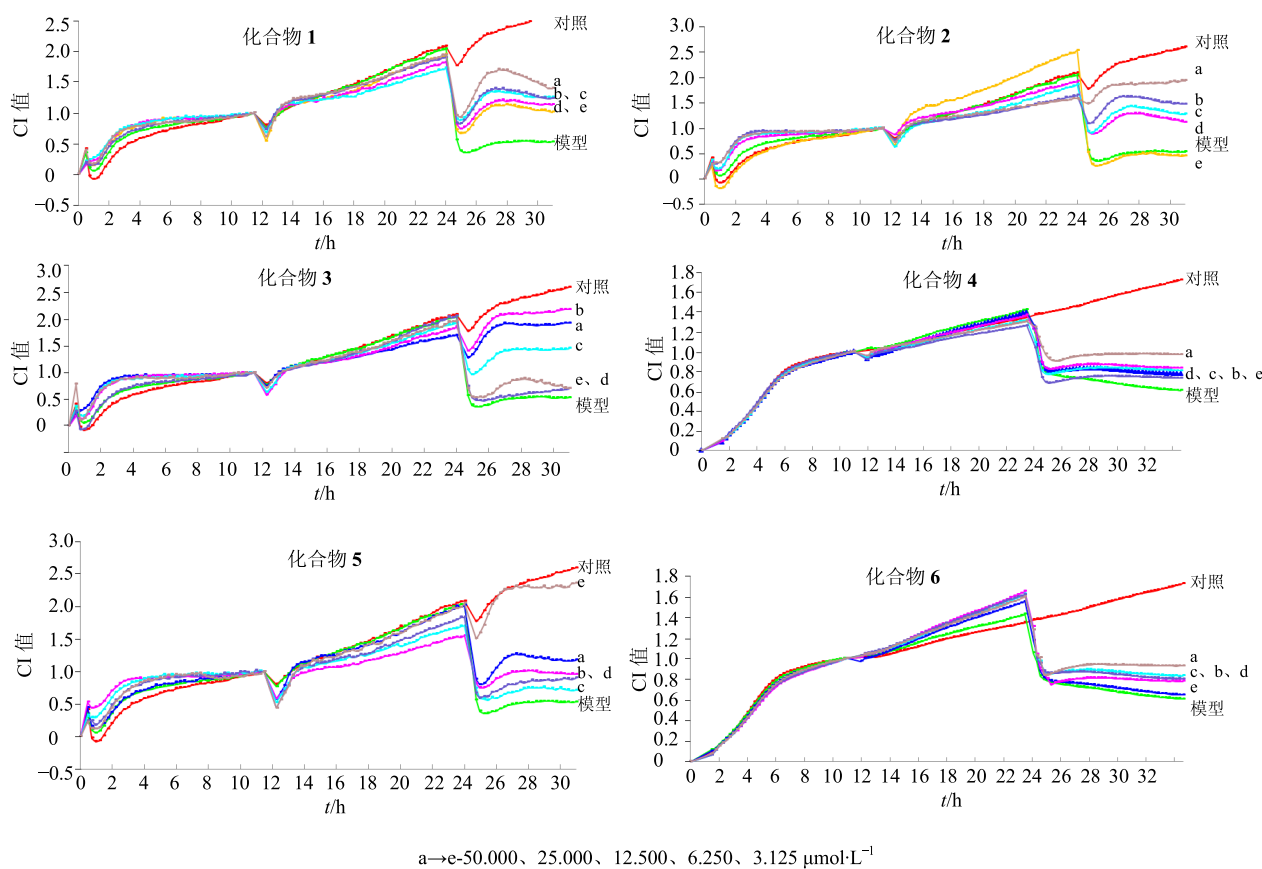


图 4 尖叶假龙胆中分离的单体化合物对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用

Fig. 4 Protective effect of monomeric compounds from *G. acuta* on oxidative damage in PC12 cells induced by H_2O_2

2.6 化合物 1、2、3、5 的结构鉴定

经 EI-MS、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 等光谱法确定化合物 1、2、3、5 分别为雏菊叶龙胆酮^[12]、去甲基雏菊叶龙胆酮^[13]、当药醇苷^[14]及去甲基当药醇苷^[15]。化合物 4 和化合物 6 对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤无保护作用, 因此未对其进行结构鉴定。

2.7 4 个单体化合物的 HPLC 测定^[16-17]

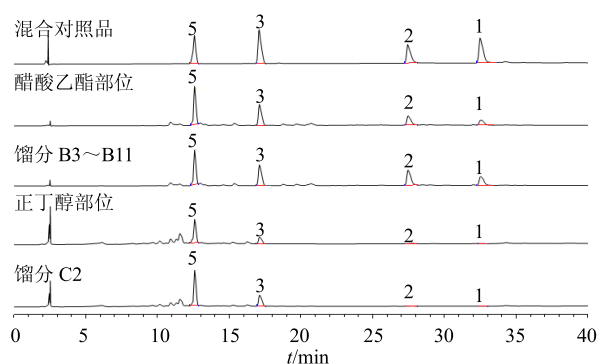
通过 HPLC 法分析尖叶假龙胆正丁醇与醋酸乙酯 2 个极性部位及其馏分 B3~B11 和 C2 中 4 个单体化合物。分别称取 4 个单体化合物对照

品 1 mg, 用甲醇 10 mL 溶解, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取滤液作为混合对照品溶液。色谱条件: 色谱柱为 Waters Symmetry C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 254 nm; 柱温为室温; 进样量 10 μL ; 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1, 色谱图见图 5。化合物 1、2、3、5 对应峰的保留时间分别为 32.483、27.443、17.080、12.563 min, 4 个单体化合物的质量分数见表 2。

表1 HPLC 洗脱程序

Table 1 Elution program of HPLC

时间/min	乙腈/%	0.1%磷酸水溶液/%
0	15	85
5	15	85
10	20	80
20	30	70
40	65	35
50	65	35
50.1	15	85
55	15	85



1-雏菊叶龙胆酮 2-去甲基雏菊叶龙胆酮 3-当药醇苷 5-去甲基当药醇苷
1-bellidifolin 2-demethylbellidifolin 3-swertianolin 5-norswertianolin

图5 4种单体化合物的HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of four monomeric compounds

表2 4个单体化合物在不同极性部位或馏分中的质量分数
Table 2 Relative content of four monomeric compounds in different extracts

部位或馏分	质量分数/%			
	1	2	3	5
醋酸乙酯部位	6.43	9.13	14.03	19.99
馏分 B3~B11	9.71	14.73	15.05	20.00
正丁醇部位	0.29	0.34	2.87	7.89
馏分 C2	0.43	0.66	7.01	14.50

3 讨论

本研究建立了尖叶假龙胆抗氧化有效成分的活性追踪分离方法。通过 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤建立氧化应激损伤模型，利用 RTCA 研究尖叶假龙胆不同极性部位对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞氧化损伤的保护作用，以活性测定的结果为指导，进行有效成分的分离。这种活性追踪的分离模式与传统的先分离化合物再进行活性筛选的模式相比，可以快速、

准确地获得活性化合物，有利于阐明药用植物生物活性的物质基础，更有助于发现活性化合物或先导化合物，为新药研发打下基础。同时用细胞进行活性测试，反应快而准确、用量少、操作简便。因此，结合细胞活性测试的活性追踪分离模式在天然产物研究中具有重要应用价值。

本研究对色谱条件，如检测波长，流动相的组成和比例，柱温和体积流量都进行了系统研究。由于酸能改善峰的拖尾，实现更好的分离，因此尝试了纯净水和乙腈与甲酸的各种混合比例。结果发现，应用梯度洗脱模式，采用 0.1% 甲酸水溶液 (pH 2.6) - 乙腈为流动相可实现各峰的良好分离。

课题组经筛选发现，醋酸乙酯和正丁醇部位对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤具有保护作用，通过测定细胞增殖评价馏分和单体化合物的活性。在 xCELLigence RTCA 系统的帮助下，进一步发现呋喃类化合物 1、2、3 和 5 对 PC12 细胞氧化损伤具有较强的保护作用。经结构鉴定，化合物 1、2、3、5 分别为雏菊叶龙胆酮、去甲基雏菊叶龙胆酮、当药醇苷及去甲基当药醇苷。其中，化合物 2 和 3 的抗氧化活性相对较好，经 HPLC 测定其在不同极性部位及馏分中质量分数较高，提示其可能为尖叶假龙胆的主要抗氧化活性成分，但其作用机制尚不明确，有待深入研究。

参考文献

- [1] Simonian N A, Coyle J T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Annual Rev Pharmacol Toxicol*, 1996, 36(1): 83-106.
- [2] Kennedy G, Spence V A, McLaren M, et al. Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(5): 584-589.
- [3] Mu X, He G, Cheng Y, et al. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism *in vivo* and *in vitro* [J]. *Harmacol Biochem Behav*, 2009, 92(4): 642-648.
- [4] Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 480(3): 206-210.
- [5] 魏 茜. 尖叶假龙胆化学成分及含量测定研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [6] 郭爱华. 龙胆科獐牙菜属药用植物化学成分和药理作

- 用的研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2005, 6(1): 57-59.
- [7] 杨虹, 丛晓东. 藤黄属植物化学成分与药理活性 [J]. 国外医药·植物药分册, 1999, 14(6): 238-242.
- [8] 姜勇, 屠鹏飞. 远志属植物中吡啶类化合物的结构特征和谱学规律 [J]. 北京大学学报医学版, 2004, 36(1): 94-98.
- [9] Chen Y P, Liu L, Zhou Y H, *et al.* Chemical constituents from *Sappan Lignum* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2008, 17(1): 82-86.
- [10] Ashida S, Noguchi S F, Suzuki T. Antioxidative components, xanthone derivatives, in *Swertia japonica* Makino [J]. *J Amer Oil Chem Soc*, 1994, 71(10): 1095-1099.
- [11] Hutadilok-Towatana N, Kongkachuay S, Mahabusarakam W. Inhibition of human lipoprotein oxidation by morelloflavone and camboginol from *Garcinia dulcis* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(7): 655-662.
- [12] Menkovic N, Savikin-Fodulovic K, Bulatovic V, *et al.* Xanthones from *Swertia punctata* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(4): 415-420.
- [13] Sakamoto I, Tanaka T, Tanaka O, *et al.* Xanthone glucosides of *Swertia japonica* Makino and a related plant: structure of a new glucoside, isoswertianolin and structure revision of swertianolin and norswertianolin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(11): 4088-4091.
- [14] Shi K L, Wang Y Q, Jiang Q, *et al.* Chemical constituents of *Gentianella azurea* [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(6): 425-428.
- [15] 吴琼. 尖叶假龙胆化学成分及吡啶类成分药代动力学研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [16] 郭国栋, 张佳, 杨丹, 等. 尖叶假龙胆中 norswertianolin 的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 69-71.
- [17] Li M H, Zhou L S, Fang H Y, *et al.* Quantification of xanthones in a Mongolian health tea using high-performance liquid chromatography [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(17): 1704-1707.