

## 基于 UPLC-MS 联用技术的头花蓼抗炎谱效关系初探

薛鑫宇<sup>1</sup>, 刘昌孝<sup>2</sup>, 周英<sup>1</sup>, 王静蓉<sup>3</sup>, 谢立敏<sup>3</sup>, 唐靖雯<sup>4</sup>, 姚元贵<sup>1</sup>, 张丽艳<sup>1\*</sup>

1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002

2. 天津药物研究院 新药评价研究中心 现代中药研究中心, 天津 300193

3. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078

4. 贵州威门药业股份有限公司, 贵州 贵阳 550004

**摘要:** 目的 初步阐明头花蓼 *Polygonum capitatum* 醇提物和水提物与其体外抗炎活性之间的谱效关系。方法 采用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠 RAW264.7 细胞制备细胞炎症模型, 利用 NO、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒检测细胞炎症因子释放量, 利用偏最小二乘法关联 UPLC-MS 方法建立的指纹图谱数据和头花蓼不同提取物的药效活性指标, 建立头花蓼化学成分的谱效关系。结果 头花蓼不同提取物在质量浓度小于 250 mg/L 时无细胞毒性, 且均具有炎症抑制作用, 存在一定的量效关系。应用偏最小二乘法对药效指标 TNF- $\alpha$  和色谱峰进行关联度比较发现, 峰 24、17、22、23、20 与抗炎药效呈正相关, 峰 11、1、7、15、5、3 与抗炎药效呈负相关。对峰 24、17、22、23、20 分析发现, 除 17 号峰为鞣花酸外, 其余 4 个峰均为黄酮类化合物。结论 头花蓼不同提取物均可以抑制 RAW264.7 细胞的炎症反应, 谱效关系分析得出槲皮苷、鞣花酸、金丝桃苷对头花蓼的抗炎药效 (调节 TNF- $\alpha$  水平) 有较大贡献。

**关键词:** 头花蓼; 炎症因子; 抗炎活性; 细胞毒性; 谱效关系; 槲皮苷; 鞣花酸; 金丝桃苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-5134-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.026

## Spectrum-effect relationship of anti-inflammatory effect of different part from *Polygonum capitatum*

XUE Xin-yu<sup>1</sup>, LIU Chang-xiao<sup>2</sup>, ZHOU Ying<sup>1</sup>, WANG Jing-rong<sup>3</sup>, XIE Li-min<sup>3</sup>, TANG Jing-wen<sup>4</sup>,  
YAO Yuan-gui<sup>1</sup>, ZHANG Li-yan<sup>1</sup>

1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

2. China Research Center for New Drug Evaluation, Research Center for Modern Chinese Medicines, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China

4. Guizhou Weimen Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550004, China

**Abstract: Objective** To study the spectrum effect relationship between the water and ethanol extracts of *Polygonum capitatum* and its anti-inflammatory activity. **Methods** The inflammatory model of mice RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) was established, and the release of inflammatory factors was detected by NO and TNF- $\alpha$  kit. The relationship of chemical constituents of *P. capitatum* was established by using the partial least square method to associate the fingerprint data established by UPLC-MS method and the pharmacodynamics index of different extracts of *P. capitatum*. **Results** Different extracts of *P. capitatum* had no cytotoxicity in the range of concentration less than 250 mg/L, and all of them had anti-inflammatory effect, which had a dose-effect relationship. By using partial least square method, the correlation degree between TNF- $\alpha$  and chromatographic peak was compared. The results showed that the correlation among the peaks 24, 17, 22, 23, 20 and the anti-inflammatory effect was positive, and the anti-inflammatory effect was negatively correlated with the peaks 11, 1, 7, 15, 5, 3. From the analysis of the five peaks, the results showed that all the four peaks were flavonoids except for the tannic acid at peak 17. **Conclusion** Different extracts of *P. capitatum* inhibited the inflammatory response of RAW264.7 cells. The flavonoids in *P. capitatum* had significant anti-inflammatory activity. The results showed that quercetin, tannic acid, and hyperoside had great contribution to the anti-inflammatory effect of *P. capitatum*.

收稿日期: 2018-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260640); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2014GX09301307-017)

作者简介: 薛鑫宇 (1992—), 在读硕士研究生, 主要从事中药质量控制与新药研究。Tel: 17685021010 E-mail: 931368346@qq.com

\*通信作者 张丽艳 (1964—), 教授, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制与新药研究。Tel: 13984870641 E-mail: zly1964@163.com

**Key words:** *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don; inflammatory factors; anti-inflammatory activity; cytotoxicity; spectrum effect relationship; quercitrin; tannic acid; hyperoside

头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 是蓼科蓼属多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 全草入药, 具有清热利湿、活血止痛的功效, 主要用于治疗痢疾、肾盂肾炎、膀胱炎、尿路结石、风湿痛、跌打损伤、疔疮、疮疡、湿疹等<sup>[2]</sup>。前期对头花蓼 UPLC-MS 指纹图谱进行了研究, 鉴定并建立了头花蓼醇提物与水提物化合物数据库, 并确认了部分色谱峰<sup>[3]</sup>。但是, 各化合物与头花蓼的抗炎作用之间的关系尚不明确。因此, 本研究以头花蓼不同质量浓度醇提物和水提物为研究对象, 分别研究其对小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) 的毒性作用, 以及对脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的影响, 以期初步阐明头花蓼乙醇提取物和水提物成分与其抗炎活性之间的关系。

## 1 材料

### 1.1 药材

头花蓼药材由贵州威门药业股份有限公司提供 (物料编号 Y001-16-12-26-27, 批号 J17053), 经贵阳中医学院药用植物栽培与鉴定教研室魏升华副教授鉴定为蓼科蓼属植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 的干燥全草。

### 1.2 试剂与仪器

甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯 (ACS 公司); MilliQ 水由 Millipak-20 Filter Unit 处理, 其他试剂均为分析纯; DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司, 批号 131124); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT, GENVIEW 公司, 批号 46170204106); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 520C0314); LPS (北京索莱宝科技有限公司, 批号 606K034); 一氧化氮 (NO) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20170424、20170428); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA Kit 酶联免疫试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 批号 20170425); 对照品鞣花酸 (批号 111959-201501, 质量分数 89.6%)、没食子酸 (批号 110831-201502, 质量分数 90.6%)、槲皮苷 (批号 111538-201402, 质量分数 90.6%)、原儿茶酸 (批号 110809-200604, 质量分数 99.9%)、金丝桃苷 (批号 111521-200303, 质量分数 96.2%), 均购于中国食品药品检定研究院。1290 Infinity 液相色谱系统、6230 飞行时间质

谱仪、MassHunter 工作站 (Agilent, 美国); FA1004 电子天平 (上海精科科学仪器有限公司); 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国); XD20-RFL 倒置荧光显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 1510 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国)。

### 1.3 细胞

RAW264.7 细胞购自中国科学院昆明动物研究所细胞库。

## 2 方法

### 2.1 头花蓼醇提物和水提物体外抗炎实验<sup>[4-5]</sup>

**2.1.1 样品制备** 取头花蓼药材 5 份, 分别加入 7 倍量水或 30%、50%、70%、95%乙醇加热回流, 提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 回收乙醇后, 减压干燥, 粉碎, 即得。头花蓼乙醇提取物和水提物均由贵州威门药业股份有限公司技术部提供。

**2.1.2 RAW 264.7 细胞培养** RAW 264.7 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下, 用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养, 2 d 换液 1 次。

**2.1.3 RAW 264.7 细胞炎症模型的制备** 取对数生长期的 RAW 264.7 细胞以  $2 \times 10^4$  个接种于 96 孔板。于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜后, 吸弃上清液, 加入 LPS (终质量浓度为 10 mg/L) 的含药培养基, 使细胞发生炎症反应, 并采用 NO 检测试剂盒检测细胞, 验证模型是否成功。实验重复 3 次。

**2.1.4 头花蓼醇提物和水提物对 RAW 264.7 细胞的毒性考察** 按“2.1.3”项方法, 每孔加入终质量浓度为 0.1~1 000 mg/L (倍半稀释) 的头花蓼醇提物和水提物的含药培养基溶液, 同时设地塞米松 (20 mg/L) 阳性对照组、正常细胞对照组、LPS 模型 (终质量浓度为 10 mg/L 的 LPS) 组和空白培养基组。按“2.1.3”中方法培养 24 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ L 5 mg/mL MTT 溶液。37 °C 孵育 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 震荡 10 min, 于 490 nm 检测吸光度 (*A*) 值。计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

**2.1.5 头花蓼醇提物和水提物对炎症模型细胞 NO 和 TNF- $\alpha$  释放的影响** 按“2.1.3”中方法, 每孔加入 200  $\mu$ L 终质量浓度为 200、40、8、1.6 mg/L 的

不含胎牛血清的头花蓼不同质量浓度醇提物和水提物,同时设地塞米松(20 mg/L)阳性对照组、正常细胞对照组、LPS 模型组(终质量浓度为 10 mg/L 的 LPS)和空白培养基组。最后于培养箱中 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h 后,依照 NO 和 TNF- $\alpha$  检测试剂盒说明,取上清液测定 A 值,分别计算 NO 和 TNF- $\alpha$  的含量。实验重复 3 次。

## 2.2 头花蓼提取物化学成分分析

**2.2.1 头花蓼醇提物与水提物的指纹图谱** 本课题组前期对头花蓼醇提物与水提物建立了 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱数据库<sup>[3]</sup>,并对本次药效研究用到的各提取物测定了相应的指纹图谱。

**2.2.2 色谱条件** 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m),以 0.1%甲酸水溶液为流动相(A),0.1%甲酸-乙腈溶液为流动相(B),梯度洗脱:0~0.5 min, 5% B; 0.5~20 min, 5%~18.5% B; 20~28 min, 18.5%~100% B; 28~30 min, 100% B; 30~30.1 min, 100%~5% B; 30.1~32 min, 5% B; 体积流量 0.35 mL/min; 自动进样 2  $\mu$ L; 柱温 40 ℃。

**2.2.3 质谱条件** 利用 Bruker Q-TOF 采集一级质谱数据:ESI 离子源,离子源温度 180 ℃,毛细管电压 4 500 V; 负离子检测模式; 喷雾压力 250 kPa (2.5 bar); 干燥氮气体积流量 8.0 L/min; 扫描范围  $m/z$  100~2 000。利用 Agilent Q TOF 采集二级质谱数据:ESI 离子源,离子源温度 250 ℃,干燥氮气体积流量 13 L/min,鞘气(氮气)温度 300 ℃,鞘气体积流量 11 L/min; 负离子检测模式; 扫描范围  $m/z$  100~2 000,碰撞能量 10~40 eV。

## 2.3 数据处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理,数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。

## 3 结果

### 3.1 头花蓼醇提物和水提物对 RAW264.7 细胞增殖的影响

与对照组比较,头花蓼醇提物和水提物质量浓度在 1 000、500、250 mg/L 时对细胞增殖有明显的抑制作用,质量浓度小于 250 mg/L 的各给药组对细胞增殖无明显抑制作用,结果见表 1。从实验结果得出各提取物的无毒质量浓度为 250~1.0 mg/L,以无毒质量浓度设计 200、40、8、1.6 mg/L 给药组进行后续实验。

### 3.2 头花蓼醇提物和水提物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- $\alpha$ 的影响

头花蓼不同质量浓度醇提物和水提物均可一定程度抑制 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放细胞炎症因子 NO、TNF- $\alpha$ ,且各组的药效呈现明显的质量浓度依赖性。头花蓼水提物组、30%乙醇提取物组、50%乙醇提取物组、70%乙醇提取物组、95%乙醇提取物组 NO、TNF- $\alpha$  水平与模型组比较,差异均显著( $P < 0.05$ ),结果见表 2。

### 3.3 头花蓼醇提物与水提物的化学成分指认

头花蓼醇提物和水提物所得的 UPLC-QTOF-MS 色谱图见图 1。结果从头花蓼的 5 种提取物中共鉴定出 25 个化合物,其鉴定结果见表 3。从图 1 可见,没食子酸(峰 1)和槲皮苷(峰 22)为头花蓼醇提物与水提物中的主要成分。

### 3.4 头花蓼醇提物和水提物的 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱的峰面积

头花蓼各醇提物和水提物的 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱中各峰的峰面积结果见表 4。

### 3.5 头花蓼醇提物和水提物的谱效关系分析

利用 SPSS 22.0 软件进行偏最小二乘法分析,关联头花蓼醇提物和水提物指纹图谱中 25 个峰峰面积及各提取物组 TNF- $\alpha$  释放量之间的关系。其中,峰 24、17、22、23、20 对于药效的贡献较大,峰 18、8、19、16、4、6、13 对于药效的贡献次之,峰 21、2、12、9、14、25 对于药效的贡献较小,峰 11、1、7、15、5、3 与药效呈负相关。关联度分析见表 5。

头花蓼醇提物和水提物指纹图谱中 25 个峰峰面积及各提取物组 NO 释放量之间的关系分析结果表明,峰 16、23、24、8 与头花蓼抗炎药效间呈正相关,其余各峰与药效呈现负相关。关联度见表 6。

## 4 讨论

### 4.1 炎症反应的影响

炎症反应是机体组织受到病原体、损伤细胞或者其他危害刺激时产生的复杂生物反应,其中免疫细胞、免疫分子参与其中,从而清除坏死细胞,并且对组织进行修复,常见的反应表现为红、肿、热和痛<sup>[6]</sup>。炎症可以分为急性炎症和慢性炎症,其中急性炎症是机体受到有害病原体感染时快速发生的,表现为血液中白细胞数目迅速增多并且由血液进入损伤组织发挥作用<sup>[6]</sup>。过量一氧化氮合酶(iNOS)

表 1 头花蓼醇提物和水提物对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 1 Effects of ethanol extract and water extract from *P. capitatum* on proliferation of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别     | $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | 增殖率/%           | 组别     | $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | 增殖率/%           |
|--------|----------------------------------------|-----------------|--------|----------------------------------------|-----------------|
| 水提物    | 1 000.00                               | 13.0 $\pm$ 0.0  | 70%醇提物 | 1 000.00                               | 38.8 $\pm$ 6.7  |
|        | 500.00                                 | 16.0 $\pm$ 0.2  |        | 500.00                                 | 41.1 $\pm$ 8.9  |
|        | 250.00                                 | 63.5 $\pm$ 0.3  |        | 250.00                                 | 112.3 $\pm$ 2.0 |
|        | 125.00                                 | 114.9 $\pm$ 3.3 |        | 125.00                                 | 116.4 $\pm$ 8.7 |
|        | 62.50                                  | 114.5 $\pm$ 8.3 |        | 62.50                                  | 106.4 $\pm$ 1.2 |
|        | 31.25                                  | 118.7 $\pm$ 2.2 |        | 31.25                                  | 117.5 $\pm$ 1.1 |
|        | 15.62                                  | 111.5 $\pm$ 5.4 |        | 15.62                                  | 96.8 $\pm$ 2.2  |
|        | 7.81                                   | 110.9 $\pm$ 2.8 |        | 7.81                                   | 96.0 $\pm$ 3.4  |
|        | 3.91                                   | 100.6 $\pm$ 6.7 |        | 3.91                                   | 94.3 $\pm$ 1.2  |
|        | 1.95                                   | 96.9 $\pm$ 1.2  |        | 1.95                                   | 100.4 $\pm$ 1.2 |
| 30%醇提物 | 0.98                                   | 94.0 $\pm$ 2.3  |        | 0.98                                   | 102.6 $\pm$ 1.6 |
|        | 1 000.00                               | 28.9 $\pm$ 1.2  | 95%醇提物 | 1 000.00                               | 26.0 $\pm$ 4.0  |
|        | 500.00                                 | 33.9 $\pm$ 3.9  |        | 500.00                                 | 29.9 $\pm$ 9.7  |
|        | 250.00                                 | 66.1 $\pm$ 1.9  |        | 250.00                                 | 59.3 $\pm$ 0.4  |
|        | 125.00                                 | 119.0 $\pm$ 1.8 |        | 125.00                                 | 90.5 $\pm$ 5.4  |
|        | 62.50                                  | 105.3 $\pm$ 1.6 |        | 62.50                                  | 104.0 $\pm$ 2.0 |
|        | 31.25                                  | 106.3 $\pm$ 0.2 |        | 31.25                                  | 115.6 $\pm$ 4.0 |
|        | 15.62                                  | 112.9 $\pm$ 2.2 |        | 15.62                                  | 110.6 $\pm$ 1.3 |
|        | 7.81                                   | 117.9 $\pm$ 1.6 |        | 7.81                                   | 111.3 $\pm$ 4.3 |
|        | 3.91                                   | 103.2 $\pm$ 3.2 |        | 3.91                                   | 113.7 $\pm$ 0.8 |
|        | 1.95                                   | 97.8 $\pm$ 3.8  |        | 1.95                                   | 98.6 $\pm$ 1.9  |
| 50%醇提物 | 0.98                                   | 94.9 $\pm$ 2.4  |        | 0.98                                   | 95.6 $\pm$ 2.1  |
|        | 1 000.00                               | 48.5 $\pm$ 2.9  | 模型     | —                                      | 96.7 $\pm$ 3.2  |
|        | 500.00                                 | 50.2 $\pm$ 11.6 | 地塞米松   | 20.00                                  | 100.2 $\pm$ 2.8 |
|        | 250.00                                 | 67.9 $\pm$ 7.3  |        |                                        |                 |
|        | 125.00                                 | 89.1 $\pm$ 8.1  |        |                                        |                 |
|        | 62.50                                  | 123.3 $\pm$ 5.8 |        |                                        |                 |
|        | 31.25                                  | 116.4 $\pm$ 1.6 |        |                                        |                 |
|        | 15.62                                  | 113.2 $\pm$ 1.3 |        |                                        |                 |
|        | 7.81                                   | 100.1 $\pm$ 2.0 |        |                                        |                 |
|        | 3.91                                   | 110.6 $\pm$ 0.1 |        |                                        |                 |
|        | 1.95                                   | 96.2 $\pm$ 3.2  |        |                                        |                 |
|        | 0.98                                   | 93.1 $\pm$ 0.7  |        |                                        |                 |

表 2 头花蓼醇提物和水提物对 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO、TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 2 Effects of ethanol extract and water extract from *P. capitatum* on NO and TNF- $\alpha$  of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别           | $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$        | TNF- $\alpha/(\text{pg} \cdot \text{L}^{-1})$       | 组别           | $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | NO/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$        | TNF- $\alpha/(\text{pg} \cdot \text{L}^{-1})$      |
|--------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 水提物          | 1.6                                    | 6.57 $\pm$ 0.17 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 302.22 $\pm$ 10.41 <sup>*<math>\Delta</math></sup>  | 70%乙醇<br>提取物 | 1.6                                    | 6.49 $\pm$ 0.09 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 194.73 $\pm$ 13.18 <sup>*#</sup>                   |
|              | 8.0                                    | 6.63 $\pm$ 0.16 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 349.61 $\pm$ 24.54 <sup>*<math>\Delta</math></sup>  |              | 8.0                                    | 5.85 $\pm$ 0.21 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 175.42 $\pm$ 13.32 <sup>*#</sup>                   |
|              | 40.0                                   | 7.52 $\pm$ 0.04 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 248.38 $\pm$ 1.58 <sup>*#<math>\Delta</math></sup>  |              | 40.0                                   | 5.24 $\pm$ 0.14 <sup>*#</sup>                    | 165.22 $\pm$ 7.37 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> |
|              | 200.0                                  | 7.15 $\pm$ 0.25 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 237.83 $\pm$ 5.13 <sup>*#<math>\Delta</math></sup>  |              | 200.0                                  | 4.82 $\pm$ 0.17 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 147.87 $\pm$ 17.93 <sup>#<math>\Delta</math></sup> |
| 30%乙醇<br>提取物 | 1.6                                    | 7.53 $\pm$ 0.08 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 297.74 $\pm$ 7.51 <sup>*#<math>\Delta</math></sup>  | 95%乙醇<br>提取物 | 1.6                                    | 5.77 $\pm$ 0.32 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 182.03 $\pm$ 7.82 <sup>*#</sup>                    |
|              | 8.0                                    | 7.22 $\pm$ 0.10 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 284.15 $\pm$ 10.57 <sup>*<math>\Delta</math></sup>  |              | 8.0                                    | 5.35 $\pm$ 0.08 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 178.63 $\pm$ 11.62 <sup>*#</sup>                   |
|              | 40.0                                   | 7.15 $\pm$ 0.15 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 234.61 $\pm$ 17.02 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> |              | 40.0                                   | 4.38 $\pm$ 0.02 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 131.78 $\pm$ 19.86 <sup>#<math>\Delta</math></sup> |
|              | 200.0                                  | 7.04 $\pm$ 0.04 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 220.84 $\pm$ 2.07 <sup>*#<math>\Delta</math></sup>  |              | 200.0                                  | 2.55 $\pm$ 0.04 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 117.47 $\pm$ 3.31 <sup>#<math>\Delta</math></sup>  |
| 50%乙醇<br>提取物 | 1.6                                    | 6.01 $\pm$ 0.03 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 241.77 $\pm$ 21.31 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 对照           | —                                      | 0.67 $\pm$ 0.09                                  | 119.62 $\pm$ 4.77                                  |
|              | 8.0                                    | 5.89 $\pm$ 0.07 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 226.56 $\pm$ 6.04 <sup>*#<math>\Delta</math></sup>  | 模型           | —                                      | 7.78 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>                     | 303.83 $\pm$ 1.72 <sup>*</sup>                     |
|              | 40.0                                   | 5.69 $\pm$ 0.14 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 192.58 $\pm$ 4.62 <sup>*#</sup>                     | 地塞米松         | —                                      | 5.18 $\pm$ 0.05 <sup>*#</sup>                    | 193.84 $\pm$ 5.21 <sup>*#</sup>                    |
|              | 200.0                                  | 6.01 $\pm$ 0.22 <sup>*#<math>\Delta</math></sup> | 194.73 $\pm$ 22.20 <sup>*#</sup>                    |              |                                        |                                                  |                                                    |

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与地塞米松组比较:  $\Delta P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group;  $\Delta P < 0.05$  vs Dexamethasone group

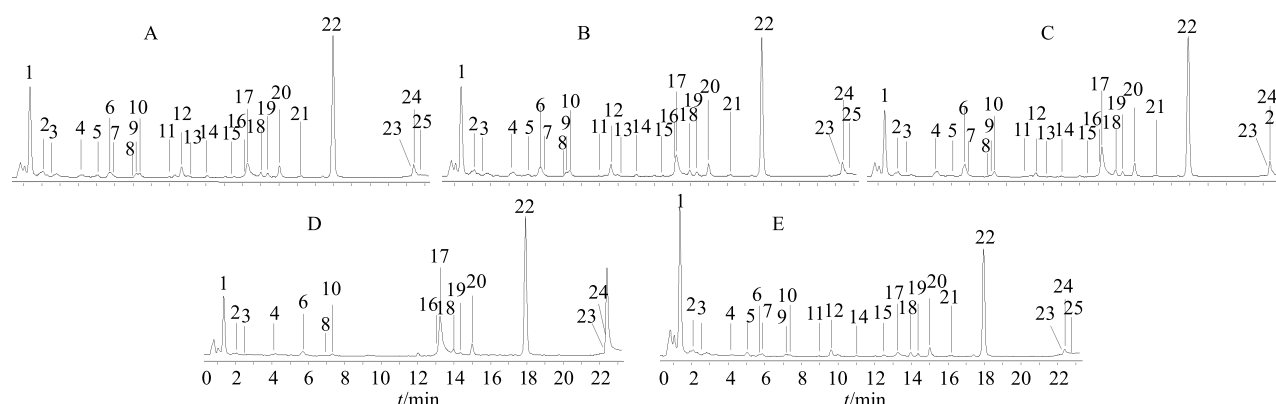


图 1 头花蓼 30% (A)、50% (B)、70% (C)、95% (D) 乙醇提取物与水提取物 (E) UPLC-QTOF-MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-QTOF-MS chromatogram of 30% (A), 50% (B), 70% (C), 95% (D) ethanol extract, and aqueous extract (E) from *P. capitatum*

表 3 头花蓼醇提取物与水提取物 UPLC-QTOF-MS 色谱图中色谱峰的指认

Table 3 Chromatographic peaks of UPLC-QTOF-MS of different concentrations of ethanol extracts and aqueous extracts from *P. capitatum*

| 峰号 | $t_R/\text{min}$ | 分子式                  | $m/z$ ( $[M-H]^-$ ) |           |                         | 化合物                                                                   |
|----|------------------|----------------------|---------------------|-----------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|    |                  |                      | 实测值                 | 理论值       | 误差 ( $\times 10^{-6}$ ) |                                                                       |
| 1  | 1.3              | $C_7H_6O_5$          | 169.014 4           | 169.014 2 | 1.2                     | 没食子酸*                                                                 |
| 2  | 2.1              | $C_{20}H_{20}O_{14}$ | 483.076 9           | 483.078 0 | -2.3                    | 3,6-二没食子酰葡萄糖                                                          |
| 3  | 2.5              | $C_7H_6O_4$          | 153.018 5           | 153.019 3 | -5.2                    | 原儿茶酸*                                                                 |
| 4  | 4.2              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.090 0           | 635.089 0 | 1.6                     | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 5  | 5.1              | $C_{20}H_{20}O_{14}$ | 483.078 6           | 483.078 0 | 1.2                     | 3,6-二没食子酰葡萄糖                                                          |
| 6  | 5.7              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.089 8           | 635.089 0 | 1.3                     | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 7  | 5.9              | $C_{20}H_{20}O_{14}$ | 483.077 3           | 483.078 0 | -1.4                    | 3,6-二没食子酰葡萄糖                                                          |
| 8  | 7.0              | $C_{34}H_{26}O_{22}$ | 785.085 3           | 785.084 3 | 1.3                     | 1,3-二- <i>O</i> -没食子酰基-4,6- <i>O</i> -( <i>S</i> )-六羟基二苯甲酰基-3-葡萄糖     |
| 9  | 7.1              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.088 5           | 635.089 0 | -0.8                    | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 10 | 7.3              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.087 4           | 635.089 0 | -2.5                    | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 11 | 8.9              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.089 6           | 635.089 0 | 0.9                     | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 12 | 9.6              | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.087 5           | 635.089 0 | -2.4                    | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 13 | 10.4             | $C_{34}H_{26}O_{22}$ | 785.086 3           | 785.084 3 | 2.5                     | 1,3-二- <i>O</i> -没食子酰基-4,6- <i>O</i> -( <i>S</i> )-六羟基二苯甲酰基-3-葡萄糖     |
| 14 | 11.0             | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.088 0           | 635.089 0 | -1.6                    | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 15 | 12.4             | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 635.088 8           | 635.089 0 | -0.3                    | 三没食子酰葡萄糖                                                              |
| 16 | 13.2             | $C_{41}H_{30}O_{26}$ | 937.095 2           | 937.095 3 | -0.1                    | $\beta$ -1,5-二甲醚六羟基联苯-2,3,4-三没食子酰葡萄糖 (daviidin, 为新化合物, 由澳门科技大学协作单位命名) |
| 17 | 13.2             | $C_{14}H_6O_8$       | 300.998 2           | 300.999 0 | -2.7                    | 鞣花酸*                                                                  |
| 18 | 13.9             | $C_{21}H_{20}O_{12}$ | 463.087 7           | 463.088 2 | -1.1                    | 槲皮素-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷                                     |
| 19 | 14.3             | $C_{21}H_{20}O_{12}$ | 463.087 3           | 463.088 2 | -1.9                    | 金丝桃苷*                                                                 |
| 20 | 15.0             | $C_{21}H_{20}O_{12}$ | 463.088 1           | 463.088 2 | -0.2                    | 槲皮素-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷                                     |
| 21 | 16.2             | $C_{28}H_{24}O_{16}$ | 615.098 0           | 615.099 2 | -2.0                    | 2- <i>O</i> -没食子酰基槲皮苷                                                 |
| 22 | 17.9             | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 447.092 0           | 447.093 3 | -2.9                    | 槲皮苷*                                                                  |
| 23 | 22.3             | $C_{28}H_{24}O_{15}$ | 599.102 8           | 599.104 2 | -2.3                    | 2''- <i>O</i> -没食子酰基槲皮苷                                               |
| 24 | 22.4             | $C_{23}H_{22}O_{12}$ | 489.103 0           | 489.103 8 | -1.6                    | 珠芽蓼 B (viviparum B)                                                   |
| 25 | 22.7             | $C_{34}H_{40}O_{18}$ | 735.213 6           | 735.214 2 | -0.8                    | 6-乙酰基-3',6'-二阿魏酰蔗糖                                                    |

\*利用对照品所鉴定的色谱峰

\*Chromatographic peak identified by reference substance

表 4 头花蓼醇提取物和水提物的 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱的各峰峰面积

Table 4 Peak areas of UPLC-QTOF-MS fingerprints of alcohol extracts and water extracts from *P. capitatum*

| 提取物   | 峰面积       |         |         |         |         |           |        |        |         |         |        |           |        |
|-------|-----------|---------|---------|---------|---------|-----------|--------|--------|---------|---------|--------|-----------|--------|
|       | 1         | 2       | 3       | 4       | 5       | 6         | 7      | 8      | 9       | 10      | 11     | 12        | 13     |
| 水     | 7 005 928 | 396 691 | 217 893 | 104 175 | 265 900 | 203 846   | 76 587 | 0      | 163 839 | 147 851 | 62 250 | 417 734   | 0      |
| 30%乙醇 | 7 426 605 | 814 548 | 138 985 | 435 337 | 231 504 | 823 287   | 72 056 | 15 645 | 413 956 | 495 658 | 94 027 | 1 156 190 | 17 729 |
| 50%乙醇 | 6 869 981 | 907 186 | 137 523 | 673 265 | 187 208 | 1 345 106 | 71 129 | 25 060 | 378 349 | 623 421 | 66 750 | 1 110 785 | 35 189 |
| 70%乙醇 | 5 575 725 | 773 081 | 118 918 | 890 210 | 72 783  | 1 833 608 | 25 083 | 61 672 | 134 858 | 581 820 | 19 694 | 469 106   | 62 575 |
| 95%乙醇 | 1 933 093 | 130 012 | 82 664  | 129 493 | 0       | 268 748   | 0      | 13 098 | 0       | 114 274 | 0      | 0         | 0      |

| 提取物   | 峰面积     |         |         |           |         |         |           |         |            |         |        |        |  |
|-------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|-----------|---------|------------|---------|--------|--------|--|
|       | 14      | 15      | 16      | 17        | 18      | 19      | 20        | 21      | 22         | 23      | 24     | 25     |  |
| 水     | 8 9274  | 103 072 | 0       | 446 150   | 173 194 | 156 065 | 427 482   | 64 483  | 5 033 369  | 156 679 | 32 332 | 39 780 |  |
| 30%乙醇 | 200 057 | 97 271  | 108 950 | 2 570 107 | 362 820 | 353 403 | 973 884   | 134 889 | 12 209 952 | 463 425 | 58 619 | 61 469 |  |
| 50%乙醇 | 180 082 | 95 265  | 291 998 | 2 905 321 | 378 403 | 326 070 | 947 698   | 167 845 | 10 711 379 | 550 800 | 52 309 | 50 600 |  |
| 70%乙醇 | 71 663  | 10 643  | 698 013 | 3 538 063 | 452 710 | 405 996 | 1 127 922 | 169 736 | 11 941 655 | 601 819 | 71 674 | 33 609 |  |
| 95%乙醇 | 0       | 0       | 330 046 | 1 941 615 | 142 200 | 84 947  | 393 170   | 15 474  | 4381 937   | 209 586 | 60 605 | 0      |  |

表 5 TNF- $\alpha$  药效指标与 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱色谱峰峰面积的关联度分析

Table 5 Correlation of TNF-alpha and chromatographic peak area of UPLC-MS fingerprints

| 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度   | 峰号 | 关联度   |
|----|--------|----|--------|----|--------|----|-------|----|-------|
| 1  | -0.250 | 6  | 0.463  | 11 | -0.078 | 16 | 0.497 | 21 | 0.337 |
| 2  | 0.331  | 7  | -0.394 | 12 | 0.246  | 17 | 0.792 | 22 | 0.618 |
| 3  | -0.784 | 8  | 0.516  | 13 | 0.424  | 18 | 0.530 | 23 | 0.597 |
| 4  | 0.477  | 9  | 0.196  | 14 | 0.163  | 19 | 0.500 | 24 | 0.889 |
| 5  | -0.454 | 10 | 0.487  | 15 | -0.417 | 20 | 0.593 | 25 | 0.041 |

表 6 NO 药效指标与 UPLC-QTOF-MS 指纹图谱色谱峰峰面积的关联度分析

Table 6 Correlation of NO and chromatographic peak area of UPLC-MS fingerprints

| 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    | 峰号 | 关联度    |
|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|
| 1  | -0.700 | 6  | -0.085 | 11 | -0.722 | 16 | 0.315  | 21 | -0.367 |
| 2  | -0.464 | 7  | -0.566 | 12 | -0.554 | 17 | -0.021 | 22 | -0.535 |
| 3  | -0.407 | 8  | 0.023  | 13 | -0.084 | 18 | -0.376 | 23 | 0.121  |
| 4  | -0.114 | 9  | -0.581 | 14 | -0.611 | 19 | -0.514 | 24 | 0.044  |
| 5  | -0.653 | 10 | -0.281 | 15 | -0.504 | 20 | -0.414 | 25 | -0.740 |

能够诱导 NO 的表达, NO 具有细胞毒性, 能够促进炎症部位损伤、水肿加重炎症反应<sup>[7-9]</sup>。

#### 4.2 LPS 诱导 RAW264.7 细胞的炎症模型

大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383、人组织细胞淋巴瘤细胞 U937 以及小鼠单核巨噬细胞 J774A.1、Ana-1、RAW264.7 等是体外研究炎症常用的细胞株系<sup>[10-17]</sup>。LPS 是革兰阴性菌的细胞壁成分, 可以用来模拟抗原活化巨噬细胞使之从 M2 型向 M1 型转变, 它能刺激巨噬细胞合成释放炎症因子, 进而产

生炎症反应<sup>[18]</sup>。

#### 4.3 NO 对于细胞炎症反应的影响

炎症是众多疾病的表征, 在发生炎症反应的同时伴随着众多炎症因子的释放, 如白细胞介素、前列腺素和 NO。NO 既是炎症反应与免疫调节的效应因子, 也是关键的调节因子, 在炎症级联反应中起着关键的调节作用<sup>[19]</sup>。由于 NO 在生物体内含量低, 半衰期短, 有 O<sub>2</sub> 的条件下极易被氧化。本实验 NO 的测定采用的是 Griess 试剂反应法, Griess 反应试

剂盒价格低廉,使用方便,可作为快速评价炎症模型是否成功的依据<sup>[20]</sup>。

#### 4.4 TNF- $\alpha$ 对细胞炎症反应的影响

众多的研究表明临床上许多疾病的转归都与TNF- $\alpha$  介导的炎症反应有着密切关系<sup>[21-23]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种具有多种生物活性的细胞效应因子,可由单核巨噬细胞、T细胞等免疫细胞产生。TNF- $\alpha$  在免疫和炎症反应中是重要的递质,可以调节血管内皮功能,诱生其他细胞因子,诱导细胞的抗病毒活性,刺激骨吸收、血管形成以及成纤维细胞有丝分裂发生等。在正常情况下其对机体有利,具有抗肿瘤、抗感染和促进组织修复等作用<sup>[24]</sup>。但在过量释放的时候可加剧机体应激反应,造成机体发热、休克、恶病质和组织损伤<sup>[25]</sup>。药物可以通过下调TNF- $\alpha$  的表达释放,来抑制炎症反应的发生。

#### 4.5 头花蓼不同提取物的谱效关系

研究过程中色谱峰的指认,是在前期研究鉴定并建立的头花蓼醇提物与水提物的53个化合物数据库的基础上,通过与对照品比对出峰时间和精确相对分子质量来确认部分色谱峰;并经色谱峰面积计算,得到相对含量(峰面积/峰面积总和),以评价不同体积分数乙醇对头花蓼各提取物中化学成分的影响<sup>[3]</sup>。应用偏最小二乘法对药效和色谱峰进行关联度比较发现,各提取物指纹图谱色谱峰峰面积与TNF- $\alpha$  释放量之间的相关性较好,与NO释放量之间的相关性多呈负相关,对于谱效关系的分析贡献度不大,分析其原因可能与NO一步法试剂盒的灵敏度和稳定性有关,并且NO在生物体内含量低、半衰期短,有O<sub>2</sub>条件下极易被氧化,稳定性差。其作为药效指标可以快速评价模型药物是否对细胞产生了炎症反应,给药后药物是否起效<sup>[20]</sup>。通过各提取物组TNF- $\alpha$  释放量与色谱峰关联得到,峰24、17、22、23、20对于药效(TNF- $\alpha$ )的贡献较大,经对这5个峰分析发现,除17号峰为鞣花酸外,其余4个峰均为黄酮类化合物,并且以70%醇提物所得的峰面积最大,可见,头花蓼中的黄酮类化合物具有显著的抗炎活性。经对峰11、1、7、15、5、3分析发现,均为有机酸类化合物,通过药效和色谱峰进行关联度分析发现,该类成分对头花蓼抗炎药效呈现负相关。

综上,本研究在初步阐明头花蓼抗炎活性谱效关系的同时,为充分发挥头花蓼的抗炎活性,开发有效部位的中药新药提供了一定的研究基础。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第25卷) [M]. 北京: 科技出版社, 1998.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 周雯, 张丽艳, 谢立敏, 等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用分析苗药头花蓼醇提物及水提物化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3557-3563.
- [4] 阮洪生, 牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导RAW264.7细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 159-163.
- [5] 刘晶, 潘晓华, 宋珍, 等. 牛蒡低聚果糖对脂多糖诱导下RAW264.7细胞炎症模型的抗炎作用 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2012, 50(12): 41-46.
- [6] Kljmar R, Clermont G, Vodovotz Y, et al. The namics of acute inflammation [J]. *J Theor Biol*, 2004, 230(2): 145-155.
- [7] Pilon G, Charbonneau A, White P J, et al. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO (-) induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15912.
- [8] Tsuzuki T, Shinozaki S, Nakamoto H, et al. Voluntary exercise CanAmeliorate insulin resistance by reducing iNOS-mediated S nitrosylation of Akt in the liver in obese rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132029.
- [9] Kapur S, Marcotte B, Marette A. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia [J]. *Amer J Physiol-Endocrinol Metabol*, 1999, 276(4): E635-E641.
- [10] Babe S Z, Ghazanfari T, Siadat Z, et al. Anti-inflammatory effect of garlic 14-kD protein on LPS-stimulated-J774A. 1 macrophages [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 37(2): 158-164.
- [11] Zhang X, Feng J, Zhu P, et al. Ketamine inhibits calcium elevation and hydroxyl radical and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated NR8383 alveolar macrophages [J]. *Inflammation*, 2013, 36(5): 1094-1100.
- [12] Biragyn A, Nedospasov S A. Lipopolysaccharide-induced expression of TNF-alpha gene in the macrophage cell line ANA-1 is regulated at the level of transcription processivity [J]. *J Immunol*, 1995, 155(2): 674-683.
- [13] Shen Y, Yang S, Shi Z, et al. SeMet mediates anti-inflammation in LPS-induced U937 cells targeting NF kappaB signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2015, 38(2): 736-744.
- [14] Meng Y, Zou Q W, Bai J Y, et al. Effect of artificial musk aqueous extract on the expressions of inflammatory

- mediators released from lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells [J]. *Acta Acad Med Sin*, 2014, 36(6): 583-586.
- [15] Ji G Q, Chen R Q, Wang L. Anti-inflammatory activity of atractylenolide III through inhibition of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways in mouse macrophages [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 38(2): 1-5.
- [16] Ichikawa N, Yamashita K, Funakoshi T, *et al.* Novel anti-inflammatory agent 3-[(dodecylthiocarbonyl)-methyl]-glutarimide ameliorates murine models of inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(3): 245-260.
- [17] 王海强, 刘一宁, 陆晓燕, 等. 甘草中抑制脂多糖诱导小鼠 RAW 264.7 产生 NO 的活性成分研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4155-4159.
- [18] Zheng X F, Hong Y X, Feng G J, *et al.* Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by *Gandida albicans* mediated up-regulation of EBI3 expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63967.
- [19] 范精华, 刘 康, 刘保林. NO 在炎症及免疫应答中的调节作用 [J]. *中外医疗*, 2009, 28(25): 163.
- [20] 李文建, 邹全明. 国产标准化一氧化氮 (NO) 检测试剂盒问世 [J]. *免疫学杂志*, 1997, 13(1): 40.
- [21] McCaulley M E, Grush K A. Alzheimer's disease: Exploring the role of inflammation and implications for treatment [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2015, 2015: 515248.
- [22] Wang Y, Chen J, Luo X, *et al.* Ginsenoside metabolite compound K exerts joint-protective effect by interfering with synoviocyte function mediated by TNF-alpha and Tumor necrosis factor receptor type 2 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 771(1): 48-55.
- [23] Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, *et al.* Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2015, 67(2): 280-309.
- [24] Nabika T, Trashima M, Momose I, *et al.* Synergistic effect of ubiquitin on lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in murine macrophage cell line RAW264.7 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1450(1): 25-34.
- [25] Crisafulli C, Galuppo M, Cuzzocrea S. Effects of genetic and pharmacological inhibition of TNF-alpha in the regulation of inflammation in macrophages [J]. *Pharmacol Res*, 2009, 60(4): 332-340.