

3 种商品规格羌活体内外抗炎作用差异与谱效关系研究

刘 洋, 郭慧清, 杨 乐, 程亚茹, 石秀佳, 杨 丽, 龚焱婷, 董 玲*

北京中医药大学, 北京 102488

摘要: 目的 探讨蚕羌、条羌、大头羌的体内外抗炎作用差异, 通过谱效关系研究明确羌活抗炎活性物质。方法 采用二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型及脂多糖 (LPS) 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 模型, 通过一氧化氮 (NO) 检测试剂盒与 ELISA 试剂盒测定炎症因子 NO、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的释放量, 研究不同商品规格羌活抗炎作用差异; 采用灰色关联度分析法对各样品的指纹图谱特征峰峰面积与抗炎活性进行关联度分析。结果 不同商品规格羌活对二甲苯所致小鼠的耳肿胀、炎症因子 NO、TNF- α 和 IL-6 的释放均有抑制作用, 总体呈现蚕羌 > 大头羌 > 条羌。羌活 40 个特征峰代表的化学成分与抗炎作用都有关联性, 其中 17 个特征峰与抗炎作用关联性较大, 有 3 个峰为已知成分, 分别为绿原酸、阿魏酸和异欧前胡素。结论 蚕羌的抗炎效果最显著, 与市场上蚕羌药效最好、价格最高的现状相符, 也与传统等级划分标准相一致。初步研究表明羌活抗炎活性物质为绿原酸、阿魏酸和异欧前胡素。

关键词: 羌活; RAW264.7 细胞; 抗炎活性; 耳肿胀急性炎症; 灰色关联度分析法; 谱效关系; 绿原酸; 阿魏酸; 异欧前胡素
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24-6052-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.020

Study on anti-inflammatory activities *in vitro* and *in vivo* and relation of fingerprint with pharmacodynamics of *Notopterygii Rhizoma* et *Radix* from three commercial specifications

LIU Yang, GUO Hui-qing, YANG Le, CHENG Ya-ru, SHI Xiu-jia, YANG Li, GONG Yi-ting, DONG Ling

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the difference of anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* between Canqiang, Tiaoqiang and Datouqiang, and to obtain the anti-inflammatory active substances by relation of fingerprint with pharmacodynamics. **Methods** Dimethylbenzene for the induction of a mouse ear edema *in vivo* and LPS-stimulated RAW 264.7 cells *in vitro* were used to investigate the anti-inflammatory activity, inflammatory factors such as nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were determined by NO kit and ELISA kit, and the gray correlation analysis method was used to analyze the correlation between the peak area and the anti-inflammatory activity of the fingerprint features of each sample. **Results** Different commercial specifications presented inhibition on acute inflammation of ear edema and inflammatory factors NO, TNF- α and IL-6, and anti-inflammatory effects were Canqiang > Datouqiang > Tiaoqiang. The chemical composition represented by 40 characteristic peaks was related to anti-inflammatory activity, and 17 characteristic peaks were highly correlated with this effect, among which three peaks were known components, namely chlorogenic acid, ferulic acid and isoimperatorin. **Conclusion** The anti-inflammatory effect of Canqiang was the most significant, which was consistent with Canqiang being the most expensive and effective in the market, also with traditional grading standards. This study initially obtained anti-inflammatory active substances were chlorogenic acid, ferulic acid and isoimperatorin.

Key words: *Notopterygii Rhizoma* et *Radix*; RAW 264.7 cells; anti-inflammatory activity; acute inflammation of ear edema; gray correlation analysis method; spectrum-effect relationship; chlorogenic acid; ferulic acid; isoimperatorin.

羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* 的干燥根茎及根^[1], 具有祛风止痛等功效, 临床多用于外感所致头身关节疼痛、风湿痹痛等^[2]。羌活

收稿日期: 2019-07-19

基金项目: 国家中药标准化项目: 大黄等 6 种中药饮片标准化建设 (ZYZH-Y-GS-10-B)

作者简介: 刘 洋, 女, 博士研究生, 从事中药生物药剂学研究。E-mail: xwpw299@163.com

*通信作者 董 玲, 女, 研究员, 博士生导师, 从事中药标准化、中药生物药剂学、中药制剂新技术等方面研究。

Tel: (010)64286752 E-mail: dongling@bucm.edu.cn

主产于四川阿坝、绵阳、甘孜等地；宽叶羌活主产于甘肃、青海等地^[3]。羌活按照形态划分为“蚕羌”和“竹节羌”，宽叶羌活分为“条羌”和“大头羌”，羌活的商品等级仅在原国家食品药品监督管理总局及卫生部 1984 年制定的《七十六种药材商品规格标准》上有规定，但是其未更新，已不能适应市场变化^[4]。许多学者从主要化学成分入手开展质量等级标准研究^[5-8]，由于商品规格的划分依据和定量指标的选取方式不同，实验结果也存在差异。现代药理学研究证明，羌活具有解热消炎镇痛、抗氧化、抗病毒、抗血小板聚集、抗血栓、促进脑血流等作用。其中，关于羌活抗炎活性的研究报道也较为广泛。很多研究通过小鼠醋酸扭体法、小鼠二甲苯致耳肿胀、大鼠蛋清性足肿胀等实验证明羌活水提液和挥发油对小鼠或大鼠炎症和疼痛模型具有保护作用^[9-10]，如 Blunder 等^[11]通过小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 证明羌活二氯甲烷提取物中的某些聚乙炔化合物具有消除炎症的作用，但对羌活发挥抗炎作用的具体物质基础及不同商品规格羌活的药效差异研究较少。药材的安全性和有效性是质量评价的核心指标，不同商品规格羌活药效上的不确定性势必会影响其在临床用药上的稳定性。本实验以不同商品规格羌活药材为研究对象，基于二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型与脂多糖（LPS）诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 研究蚕羌、条羌、大头羌的体内外抗炎作用差异，并通过灰色关联度分析法初步获得羌活抗炎的活性物质，为确定羌活抗炎物质基础、科学划分商品等级及合理控制药材质量等提供理论支持和数据基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CPA225D 电子天平（德国 Sartorius 公司）；KQ-400KDE 超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）；DFT-50A 粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；SHB-3A 循环水多用真空泵（郑州杜甫仪器厂）；SB-2000 旋转蒸发器（上海爱朗仪器有限公司）；ALPHA 2-4 LSC plus 真空冷冻干燥机（德国 Christ 公司）；5424R 冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；3-18N 台式高速离心机（湖南恒诺仪器设备有限公司）；-80℃冰箱（美国 Thermo Forma 公司）；DZKW-4 电热恒温水浴锅（北京中兴伟业仪器有限公司）；HERAccl cell v160i CO₂ 培养箱（美国 Thermo Scientific 公司）；CKX53 倒置光学显微镜（日本

Olympus 公司）；1300 SERIES A2 生物安全柜（美国 Thermo Scientific 公司）；Spectramax i3x 酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

1.2 药品与试剂

阿司匹林肠溶片（批号 20171202，沈阳奥吉娜药业有限公司）；生理盐水；乙醇（分析纯，北京化工厂）；甲醇（分析纯，北京化工厂）；二甲苯（分析纯，北京化工厂）；DMEM 培养基（美国 Corning 公司）；胎牛血清（FBS，美国 Corning 公司）；青霉素-链霉素（PS，美国 Invitrogen 公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，江苏凯基生物技术股份有限公司）；二甲基亚砜（DMSO，美国 VWR Life Science 公司）；CCK-8 试剂盒（上海东仁化学科技有限公司）；LPS（美国 Sigma 公司）；NO 检测试剂盒（碧云天生物技术有限公司）；小鼠肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）、白细胞介素-6（IL-6）ELISA 试剂盒（美国 Proteintech 公司）。

羌活药材来源于四川蚕羌、甘肃临洮县玉林镇条羌、甘肃漳县金钟镇大头羌。经北京中医药大学孙志蓉教授鉴定为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 或宽叶羌活 *N. forbesii* H. de Boiss. 的干燥根茎及根。

1.3 实验动物与细胞

SPF 级雄性昆明种小鼠，体质量（20±2）g，购于北京斯贝福生物技术有限公司，动物使用许可证号 SCXK（京）2016-002。RAW 264.7 细胞购自北京协和医学院细胞库。

2 方法

2.1 羌活供试液的制备

取羌活原药粉末 50 g，分别加入 8 倍量乙醇加热回流提取 3 次，每次 1 h，滤过，合并滤液，回收乙醇得到膏状物，蒸馏水溶解稀释为 1 g/mL 的浓溶液，置于冰箱 4℃ 储存备用，用于体内实验。主要成分绿原酸、紫花前胡苷、阿魏酸、羌活醇和异欧前胡素的测定方法及具体含量参考文献方法^[4]。

取羌活原药粉末，分别精确称取 5 g，加 10 倍量甲醇溶液加热回流提取 30 min，滤过，取续滤液浓缩并置于真空冷冻干燥机中进行真空冷冻干燥，得冻干粉。精密称量 100 mg 羌活冻干粉，加入适量 DMSO 溶液使其溶解完全，配制成 100 mg/mL 的母液，保存在 -20℃ 备用。加药前，再以 DMEM 无血清培养基（仅含 1% 青霉素-链霉素）稀释至不同浓度（DMSO 终质量分数为 0.1%），经 0.22 μ m

微孔滤膜过滤除菌,即得,用于体外实验。主要成分绿原酸、紫花前胡苷、阿魏酸、羌活醇和异欧前胡素的测定方法及具体含量参考文献方法^[4]。

2.2 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症实验

取昆明种小鼠 110 只,随机分 11 组,每组 10 只,即模型组(生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林 0.2 g/kg)和 3 种不同商品规格羌活提取液治疗组(每种商品规格 3 组,每组 10 只),ig 给药 10 mL/kg(折合生药量为 1 g/mL),每日 1 次,连续给药 7 d,末次给药 45 min 后,在小鼠右耳廓两面涂上二甲苯,每只 50 μ L,左耳涂上等量蒸馏水。25 min 后将小鼠颈部脱臼处死,沿耳廓剪下左、右 2 耳,以 8 mm 打孔器在两耳相同部位打下圆耳片,万分之一电子天平称定质量,计算小鼠耳部肿胀度、肿胀率和抑制率。

耳部肿胀度=右耳质量-左耳质量

肿胀率=(右耳质量-左耳质量)/左耳质量

抑制率=(模型组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/模型组平均肿胀度

2.3 CCK-8 法检测羌活对 RAW 264.7 细胞活力的影响

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,按 3×10^4 个/孔的密度均匀接种于 96 孔板(每孔 100 μ L),并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。待细胞贴壁后,吸出上清液,分组给药(空白组、对照组、给药组),每组设置 5 个复孔。其中,空白组不含细胞,加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基;对照组含细胞,加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基;给药组含细胞,且分别加入终质量浓度为 10、20、40、80 μ g/mL 的羌活供试品溶液(蚕羌、条羌、大头羌),再于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12、24 h 后,弃去上清液,每孔加入含 10% CCK-8 的无血清培养基 100 μ L(避光),于培养箱中孵育 2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 波长下的吸光度(A),并计算每组细胞活力。

细胞活力=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})

2.4 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量测定

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,按 1×10^5 个/孔细胞接种于 48 孔板(每孔 200 μ L),并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。待细胞贴壁后,弃去上清液,分组给药,每组设置 4 个复孔。实验分为对照组、模型组(LPS 刺激,0.1 μ g/mL)和药物处理组(3 种商品规格羌活的质量浓度依次为 20、

40、80 μ g/mL)。LPS 诱导 RAW 264.7 细胞模型采用直接干预的给药方式,使不同组药物与 LPS 混合作用。各组给药后(每孔 200 μ L),再于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中混合作用 24 h 后,收集上清液,按照 NO 检测试剂盒说明书操作,在 540 nm 处测定各组 A 值,并绘制标准曲线,计算各组 NO 水平。

2.5 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TNF- α 释放量测定

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,按 1.5×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔板(每孔 100 μ L),并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。待细胞贴壁后,弃去上清液,分组给药,每组设置 4 个复孔。实验分为对照组、LPS 模型组、药物处理组。其中,对照组加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基;模型组先加入等体积含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基,孵育 4 h 后,再加入 LPS(终质量浓度为 0.5 μ g/mL)刺激 2 h;药物处理组分别加入终质量浓度为 20、40、80 μ g/mL 的羌活供试品溶液(蚕羌、条羌、大头羌),药物保护 4 h 后,再加入 LPS(终质量浓度为 0.5 μ g/mL)刺激 2 h。收集细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,在 450 nm 处测定各组 A 值,并绘制标准曲线,计算各组 TNF- α 水平。

2.6 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 IL-6 释放量测定

取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,按 3×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔板(每孔 100 μ L),并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h。待细胞贴壁后,弃去上清液,分组给药,每组设置 4 个复孔。实验分为对照组、LPS 模型组、药物处理组。其中,对照组加入 100 μ L 含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基;模型组先加入等体积含 0.1% DMSO 的 DMEM 无血清培养基,孵育 4 h 后,再加入 LPS(终质量浓度为 1 μ g/mL)刺激 6 h;药物处理组分别加入终质量浓度为 20、40、80 μ g/mL 的羌活供试品溶液(蚕羌、条羌、大头羌),药物保护 4 h 后,再加入 LPS(终质量浓度为 1 μ g/mL)刺激 6 h。收集细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,在 450 nm 处测定各组 A 值,并绘制标准曲线,计算各组 IL-6 水平。

2.7 羌活抗炎作用的谱效灰色关联度分析

2.7.1 原始数据的处理 原始数据由于数列单位不同或量纲不同,不便于比较,在进行灰色关联度分析之前,要进行无量纲化的数据处理。以羌活 ig 给药的小鼠耳肿胀率为参考序列,以课题组前期研究中 3 种商品规格羌活指纹图谱 40 个特征峰峰面积^[12]为

比较序列,采用均值化变换方法,先分别求出各个序列数据的平均值,然后用序列中的各个原始数据除以对应平均值,所得到的商为新的数据列,即均值化数列。

2.7.2 关联系数的计算 对于参考数列 X_0 有若干个比较数列 $X_1, X_2, \dots, X_n$, 各比较数列与参考数列的关联系数 $\xi_i(k)$ 可由下列公式算出。

$$\xi_i(k)=[\Delta(\min)+\rho\Delta(\min)]/[\Delta_{0i}(k)+\rho\Delta(\min)]$$

ρ 为分辨系数,一般在 0~1,通常取 0.5; $\Delta_{0i}(k)$ 表示比较数列与参考序列的绝对差; $\Delta(\min)$ 和 $\Delta(\max)$ 分别表示所有比较序列绝对差中的最小值与最大值;本实验中 $\Delta(\min)$ 为 0.005, $\Delta(\max)$ 为 5.587

2.7.3 关联度的计算 比较序列 X_i 对参考序列 X_0 的灰关联度计算公式如下。

$$r_i=\sum_{k=1}^n \xi_i(k)/n$$

r_i 值越接近 1,说明关联性越好;如果 r_i 大于 0.6,则色谱峰代表的化学成分与药效指标有关联性;如果 r_i 大于 0.8,则色谱峰代表的化学成分与药效指标关联性较大;如果 r_i 大于 0.9,则色谱峰代表的化学成分与药效指标关联性非常大; n 为共有峰的数量

3 结果

3.1 3 种商品规格羌活的体内抗炎活性

二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症实验结果见表 1。由结果可知,与模型组比较,蚕羌和大头羌对小鼠耳肿胀有显著的抑制作用 ($P<0.05$), 且与阿司匹林组比较,差异不显著;条羌对小鼠耳肿胀无显著的抑制作用。

表 1 3 种商品规格羌活醇提物对二甲苯致小鼠耳肿胀影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of three commercial specifications of alcohol extract on acute inflammation of ear edema ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	肿胀率/%	抑制率/%
模型	—	26.90±3.04	1.88±0.38 [#]	—
阿司匹林	0.2	11.78±3.59	0.88±0.29 [*]	0.55±0.16
蚕羌 1	10.0	14.91±4.09	1.09±0.36 [*]	0.44±0.18
蚕羌 2	10.0	14.05±5.64	0.81±0.44 [*]	0.46±0.26
蚕羌 3	10.0	15.90±5.48	0.91±0.43 [*]	0.40±0.21
条羌 1	10.0	19.86±7.01	1.39±0.73	0.26±0.26
条羌 2	10.0	19.12±4.17	1.40±0.32 [#]	0.28±0.20
条羌 3	10.0	21.20±4.07	1.59±0.36 [#]	0.21±0.12
大头羌 1	10.0	17.32±6.02	1.17±0.39 [*]	0.35±0.21
大头羌 2	10.0	16.70±5.57	1.18±0.44 [*]	0.37±0.22
大头羌 3	10.0	17.62±6.49	1.21±0.41 [*]	0.34±0.25

与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与阿司匹林组比较: [#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs aspirin group

3.2 3 种商品规格羌活的体外抗炎活性

3.2.1 羌活对 RAW 264.7 细胞活力的影响 羌活对 RAW 264.7 细胞活力影响结果见图 1。由结果可知,蚕羌、大头羌、条羌醇提物在 10~80 $\mu\text{g/mL}$ 对 RAW 264.7 细胞活力无显著影响(细胞存活率>95%)。因此,在后续实验中,可将待测样品的质量浓度控制在 10~80 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2.2 羌活对 RAW 264.7 细胞 NO 释放量的影响 由结果(图 2)可知,3 种商品规格羌活醇提物在 20~80 $\mu\text{g/mL}$ 均会使 RAW 264.7 细胞炎症因子 NO 释放量显著下降,蚕羌、大头羌的抑制作用随着药物质量浓度的增大而增强,条羌的抑制作用随着药

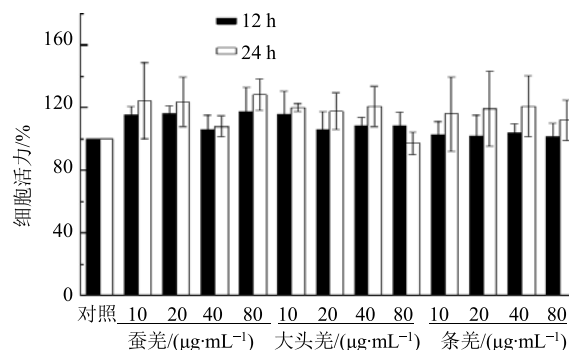
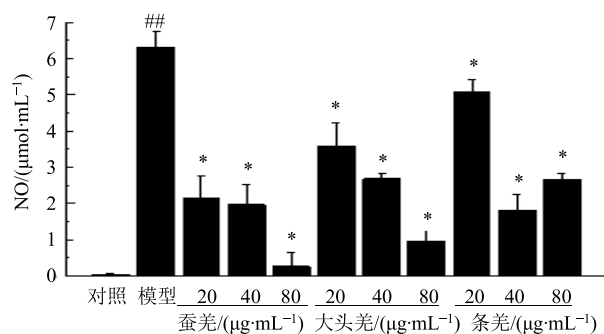


图 1 3 种商品规格羌活醇提物对 RAW 264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effects of three commercial specifications of alcohol extract on viability of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 下图同
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group; same as below

图 2 3 种商品规格羌活醇提取物对 RAW 264.7 细胞炎症因子 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of three commercial specifications of alcohol extract on inflammatory factor NO of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

物质质量浓度的增大先增强后减弱。3 种商品规格羌活醇提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量的抑制作用, 总体呈现蚕羌 > 大头羌 > 条羌。

3.2.3 羌活对 RAW 264.7 细胞 TNF- α 释放量的影响
由结果 (图 3) 可知, 羌活醇提取物在 20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均会使 RAW 264.7 细胞炎症因子 TNF- α 释放量显著下降, 且抑制作用随着药物质量浓度的增大而增强, 总体呈现蚕羌 > 大头羌 > 条羌。

3.2.4 羌活对 RAW264.7 细胞 IL-6 释放量的影响
由结果 (图 4) 可知, 羌活醇提取物 20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 使 RAW 264.7 细胞炎症因子 IL-6 释放量显著下降, 且抑制作用随着药物质量浓度的增大而增强, 呈现明显的质量浓度依赖性。3 种商品规格羌活醇提取物对

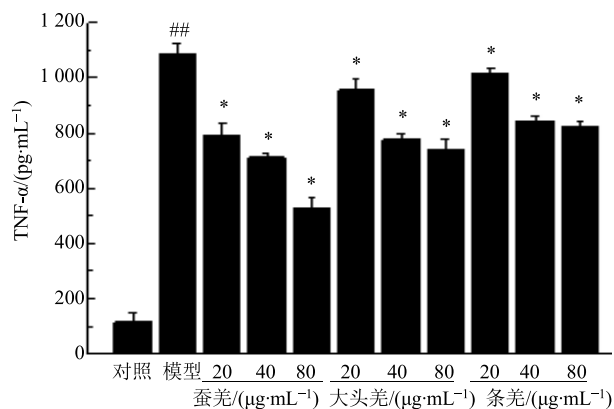


图 3 3 种商品规格羌活醇提取物对 RAW 264.7 细胞炎症因子 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of three commercial specifications of alcohol extract on inflammatory factor TNF- α of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

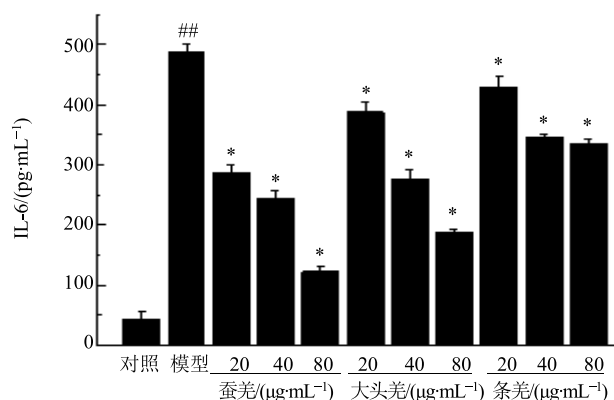


图 4 3 种商品规格羌活醇提取物对 RAW 264.7 细胞炎症因子 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of three commercial specifications of alcohol extract on inflammatory factor IL-6 of RAW 264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

RAW 264.7 细胞 IL-6 释放量的抑制作用总体呈现蚕羌 > 大头羌 > 条羌。

3.3 羌活化学成分与小鼠耳肿胀率间的关联度排序

将 n 个比较序列对同一参考序列的关联度按大小顺序排列, 可组成关联序, 以反映出各比较序列对于参考序列的亲密关系。3 种商品规格羌活指纹图谱中 40 个特征峰代表的化学成分^[12]与小鼠耳肿胀率间的关系结果见表 2。由结果可知, 40 个特征峰代表的化学成分与抗炎作用都有关联性, 其中有 17 个特征峰与抗炎作用关联性较大 ($r_i > 0.8$), 通过标准品比对, 3 个峰为已知成分, 分别为绿原酸、阿魏酸和异欧前胡素。

4 讨论

炎症是机体对于损伤性刺激做出的复杂自然性防御反应^[13], 且能够激发免疫系统, 引起血管舒张、血液流动性增加、炎症介质释放、细胞代谢增加等^[14]。二甲苯是常用的化学致炎剂, 可诱导组胺、激肽及纤维蛋白溶解酶等炎症介质释放, 进而引起局部毛细血管通透性的增加、炎症细胞的浸润、急性渗出性炎性水肿等^[15]。NO 是一种重要的炎症介质, 在炎症发生初期可以清除病原体为机体提供保护措施, 但过量的 NO 会与超氧阴离子 (O_2^-) 反应生成过氧化亚硝酸盐, 导致局部组织损伤, 促进炎症疾病的发生。TNF- α 是早期炎症的标志物, 能够介导炎症、免疫反应及组织损伤, 但过量的 TNF- α 会诱导其他炎症因子的产生, 从而加重炎症损伤。IL-6 主要由 T 细胞和巨噬细胞分泌, 作为一种多功能细胞因子可以调控细胞免疫反应、炎症和造血功

表 2 各特征峰与抗炎作用关联度

Table 2 Relevance results of characteristic peaks and anti-inflammatory activity

峰号	关联度	成分	峰号	关联度	成分
18	0.908	—	6	0.716	—
27	0.903	—	19	0.712	—
9	0.889	—	1	0.704	—
2	0.889	绿原酸	38	0.693	—
11	0.880	阿魏酸	20	0.693	—
14	0.873	—	17	0.689	—
4	0.867	—	24	0.689	—
13	0.859	—	25	0.688	—
34	0.852	—	39	0.688	—
5	0.850	—	12	0.688	—
7	0.843	—	33	0.688	—
16	0.831	—	26	0.688	—
28	0.828	—	23	0.688	—
15	0.820	—	30	0.688	—
3	0.816	—	32	0.686	羌活醇
36	0.804	异欧前胡素	8	0.683	—
22	0.804	—	40	0.682	—
21	0.760	—	35	0.678	—
10	0.754	紫花前胡苷	37	0.674	—
29	0.718	—	31	0.666	—

“—”表示成分未知

“—” indicates unknown composition

能，其过度释放则会诱发多种自身免疫疾病，包括类风湿性关节炎、全身性的幼年特发性关节炎以及骨髓瘤等多种恶性肿瘤。因此，抑制这些炎症介质的释放可以有效抑制炎症反应。

本研究发现，3 种商品规格羌活对二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型与 LPS 诱导小鼠 RAW 264.7 细胞炎症因子均有一定程度的抑制作用，且总体呈现蚕羌>大头羌>条羌，该结论与市场蚕羌药效最好、价格最高的现状相符，也与传统等级划分标准一致。课题组前期对不同商品规格羌活药材的 HPLC 指纹图谱研究中^[12]，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”（2004 版 A）进行共有峰确认及相似度评价。从蚕羌中标定了 22 个共有峰，条羌中标定了 23 个共有峰，大头羌中标定了 29 个共有峰。相似度评价结果显示，3 种商品规格羌活药材相似度极低，化学成分组成和含量差异十分显著；而相同商品规格羌活的相似度较高，化学成

分组成较为一致，只有小部分批次间存在含量差异。因此可推测，3 种商品规格羌活的化学成分组成与含量的差异是造成其抗炎作用强弱的主要原因。此外，课题组在不同商品规格羌活的质量评价研究中^[4]，基于市场调查、文献研究、基原结合药材形态与多成分定量分析研究 3 种商品规格羌活 5 种成分（绿原酸、阿魏酸、紫花前胡苷、羌活醇、异欧前胡素）与挥发油的含量差异，得出不同商品规格羌活中 5 种成分与挥发油的含量差异较大，其中大头羌的羌活醇和异欧前胡素含量之和及挥发油含量普遍达不到药典规定；聚类分析和主成分分析结果显示，蚕羌质量最好，条羌次之，大头羌最差。本研究在前期研究基础上，经过特征峰与体外抗炎作用的灰色关联度分析，初步获得羌活抗炎活性物质为绿原酸、阿魏酸和异欧前胡素，推测此 3 种成分因含量差异影响羌活质量的同时，也是羌活抗炎强弱的决定因素之一。其与《中国药典》2015 年版规定的质量关键指标羌活醇和异欧前胡素不完全一致，说明以药典标准确定羌活药效活性物质可能存在局限性。本研究得出 17 个特征峰与抗炎作用关联性较大，未来针对这些特征峰进行系统研究与成分解析，将有助于深入挖掘羌活抗炎物质基础。目前针对不同商品规格羌活的药效差异研究很少，羌活药材传统商品等级划分科学性的探讨尚处于化学层面，缺乏足够的药效学证据，有待于建立更加科学合理的商品规格等级标准规范羌活药材市场。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 时 博, 史晶晶. 羌活药性及功效应用考证 [J]. 中医学报, 2017, 32(7): 1239-1241.
- [3] 李石平, 沙 龙, 赵祎武, 等. 近 30 年来中药羌活化学成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 2952-2963.
- [4] 郭慧清, 王梓轩, 张泽坤, 等. 基于多成分定量分析的不同商品规格羌活的质量评价 [J]. 中药材, 2018, 41(7): 1651-1655.
- [5] 陈虹宇, 尹显梅, 陈 玲, 等. 不同商品等级羌活中羌活醇和异欧前胡素的含量测定 [J]. 成都中医药大学学报, 2016, 39(1): 18-21.
- [6] 刘卫根, 周国英, 徐文华, 等. 不同商品等级羌活挥发油的比较研究 [J]. 中药材, 2012, 35(7): 1042-1045.
- [7] 刘卫根, 王亮生, 徐文华, 等. 不同商品等级羌活中有机酸和香豆素类化合物的测定 [J]. 中成药, 2012,

- 34(11): 2181-2186.
- [8] 蒋舜媛, 孙洪兵, 孙 辉, 等. 羌活药材商品规格与质量等级的对应分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 793-801.
- [9] 王一涛, 杨 奎, 王家葵, 等. 羌活的药理学研究 [J]. 中药药理与临床, 1996(4): 13-16.
- [10] 陈智煌, 廖华军, 刘 晨, 等. 羌活挥发油的 GC-MS 分析及其抗炎镇痛的药理作用初探 [J]. 海峡药学, 2015, 27(8): 20-23.
- [11] Blunder M, Liu X, Kunert O, *et al.* Polyacetylenes from *Radix et Rhizoma Notopterygii Incisi* with an inhibitory effect on nitric oxide production *in vitro* [J]. *Plant Med*, 2014, 80(5): 415-418.
- [12] 郭慧清, 李娅琦, 王梓轩, 等. 不同商品规格羌活药材的 HPLC 指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 184-188.
- [13] Hotamisligil G S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders [J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 177-185.
- [14] Brezani V, Smejkal K, Hosek J, *et al.* Anti-inflammatory natural prenylated phenolic compounds-potential lead substances [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(10): 1094-1159.
- [15] 谷 捷, 李 鑫, 余黄合, 等. 二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(5): 32-35.