

荭草抗肿瘤活性提取物质量标志物的初步研究

胡琪琪^{1,2}, 曾 锐^{2*}, 杨 晓², 马子豪², 马 悦¹, 秦旭华¹, 拉目加², 瞿 燕^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: **目的** 基于质量标志物(Q-marker)理论, 分析具有抗肿瘤活性的荭草醋酸乙酯提取物的成分, 研究其质量控制方法。**方法** 首先使用 UPLC-ESI-HRMS 对该提取物进行成分鉴定; 再使用 HPLC 进行成分的定量测定, 同时建立其定量测定方法, 并对鉴定出的化合物进行药理作用分析, 初步预测 Q-marker; 最后采用人非小细胞肺癌 A549 细胞模型, 研究荭草醋酸乙酯提取物及 6 种候选成分混合物对 A549 肿瘤细胞生长及迁移的影响。**结果** 通过 UPLC-ESI-HRMS 结果指出 12 个化合物, 其中, HPLC 未检出原儿茶酸、儿茶素、山柰素和芹菜素, 异牡荆素和木犀草素质量分数低于 0.01 mg/g, 不纳入 Q-marker 候选物之列。结合药理作用分析, 最终选择了 6 种成分没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷和槲皮苷作为其潜在 Q-marker。各样品中均能检测出这 6 个成分, 且 6 个成分总量超过 10%。荭草醋酸乙酯提取物及等剂量 6 成分混合物均能显著抑制 A549 细胞的增殖与迁移, 并诱导其凋亡, 且两组之间效果无显著性差异。**结论** 没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷和槲皮苷作为具有抗肿瘤活性的荭草醋酸乙酯提取物中的潜在 Q-marker 具有科学合理性; 建立的荭草醋酸乙酯提取物的 HPLC 定量测定方法准确、稳定。

关键词: 荭草; 质量标志物; 没食子酸; 异荭草苷; 荭草苷; 牡荆素; 木犀草苷; 槲皮苷; 抗肿瘤活性; 定量测定

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)10-2642-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.007

Preliminary study on Q-markers of anti-tumor activity extracts of *Polygonum orientale*

HU Qi-qi^{1,2}, ZENG Rui², YANG Xiao², MA Zi-hao², MA Yue¹, QIN Xu-hua¹, LA Mu-jia², QU Yan¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** Based on the concept of quality marker (Q-marker), the components and the quality of the ethyl acetate extract of *Polygonum orientale* (POEa) was analyzed and studied. **Methods** Firstly, the components of POEa were identified using the UPLC-ESI-HRMS method and standard compounds. Secondly, the main active compounds were determined by HPLC. Antitumor activities of these compounds were reviewed and its Q-marker was predicted. Finally, we evaluated the effects of POEa and the compound of gallic acid, isoquercetin, valerin, vitexin, luteolin, and quercetin on proliferation, apoptosis and migration of A549 cells. **Results** A new quality method for simultaneous determining these six compounds of POEa was established. The six chemical ingredients were detected in each sample and the total content was more than 10%. The number of apoptotic cells in A549 cells treated with POEa and six chemical mixtures were all substantial increased, and the migration amount were significantly decreased. Two groups showed no significant differences. **Conclusion** The six components are scientific and reasonable to be considered as potential Q-marker represented the anti-tumor activity of POEa. The HPLC method can be used as accurate and stable quality control strategy of POEa.

Key words: *Polygonum orientale* L.; Q-marker; gallic acid; isoquercetin; valerian; vitexin; luteolin; quercetin; anti-tumor activity; quantitative determination

收稿日期: 2020-01-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81603309); 国家重点研发计划(2017YFC1700705); 四川省留学人员科技活动项目择优资助经费计划(2018-68); 四川省重点研发计划(2019YFS0174); 西南民族大学中央高校基本科研业务经费青年项目(2019SQN58)

作者简介: 胡琪琪(1991—), 硕士研究生, 主要从事中药基础理论与应用研究。Tel: 18380456535 E-mail: qiqihu2016@126.com

***通信作者** 瞿 燕(1976—), 教授, 主要从事中药制剂新技术与新辅料的研究。Tel: (028)61800231 E-mail: quyan028@126.com
曾 锐(1976—), 教授, 主要从事民族药资源开发研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

荭草为蓼科植物红蓼 *Polygonum orientale* L. 的干燥果穗及带叶茎枝, 是一种重要的苗族药物, 为一年生草本植物, 广布于中国各地, 主要分布于西南及东南亚热带地区, 常生长于淡水湿洼地带。始载于《名医别录》^[1], 又名游龙、石龙、天蓼、大蓼等, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[2]及《中华本草·苗药卷》^[3]等, 具有祛风除湿、活血消肿的功效, 在治疗风湿痹痛、类风湿性关节炎等炎性病症方面具有悠久的历史, 临床上常用于治疗风湿痹痛、类风湿性关节炎, 痢疾、疝气、水肿、疮肿、冠心病及心胃气痛等症^[4]。现代药理学研究表明, 其在心血管系统如抗心肌缺血^[5]、血管舒张活性^[6]、抗氧化^[7]以及抗炎镇痛^[8]等方面具有一定的治疗作用。

近年有文献报道荭草具有治疗肺癌、肝癌等恶性肿瘤的作用^[9-10], 但其抗肿瘤活性物质基础和质量控制研究仍属空白。刘昌孝院士^[11]于 2016 年首次提出的质量标志物 (Q-marker) 是中药质量控制的新概念, 其中中药产品质量的研究设计目的是从植物次生代谢物中发现具有生物活性的物质, 通过现代分析和鉴定药物效应关系, 鉴定并确认为 Q-marker。

本研究首先使用 UPLC-ESI-HRMS 对荭草醋酸乙酯提取物进行成分鉴定, 指出 2 个酚酸类和 10 个黄酮类化合物; 然后使用 HPLC 对 12 个成分进行定量, 结果未检出原儿茶酸、儿茶素、山柰素和芹菜素, 且异牡荆素和木犀草素的量低于 0.01 mg/g; 再根据现代药理研究, 选择含量较高且稳定的没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷和槲皮苷作为其潜在 Q-marker。最后采用 A549 细胞模型, 研究荭草醋酸乙酯提取物及 6 种候选成分混合物对 A549 肿瘤细胞生长及迁移的影响, 结果荭草醋酸乙酯提取物及等剂量 6 种候选成分混合物均能显著抑制 A549 细胞的增殖与迁移, 并诱导其凋亡, 且两组之间效果无显著性差异。故没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷和槲皮苷可作为具有抗肿瘤活性的荭草醋酸乙酯提取物中的 Q-marker。

1 材料

1.1 仪器

UPLC-ESI-HRMS (美国 Thermo 公司); Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Waters 2695-996 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司);

Ultimate® C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 0.03 μm); Multiskan fc 酶标检测仪 (美国 Thermo 公司); NIKON ECLIPSE C1 正射荧光显微镜 (日本尼康公司); CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 药材与试剂

荭草药材来自于贵州益佰制药股份有限公司, 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为蓼科植物红蓼 *Polygonum orientale* L. 的干燥地上部分。对照品没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷、槲皮苷、山柰素、木犀草素和芹菜素 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110831-201605、110809-200604、110877-201604、111974-201401、111777-201302、111687-201603、111538-201606、111720-2-1609、110861-201611、111520201605 和 111901-201603), 异牡荆素 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 YM0506HA14); 各对照品质量分数均≥98%。甲醇 (色谱纯, 北京迈瑞达科技有限公司) 和乙腈 (色谱纯, 成都市科隆化学有限公司); RPMI 1640 培养基 (美国 HyCLone 公司, 批号 NXM0651); 胎牛血清 (杭州四季青生物公司, 批号 20170219); MTT (Sigma 公司, 批号 71156); Annexin V-FITC (中国康为世纪公司, 批号 17022016)。

1.3 细胞株

人非小细胞肺癌 A549 细胞株, 购买于美国 ATCC 公司, 货号 CCL-185。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取 600 g 切成小段的干燥荭草药材, 蒸馏水浸泡 30 min, 加 10 倍量蒸馏水煎煮 3 次, 每次 30 min。合并煎出液, 旋蒸浓缩至 200 mL。然后依次用石油醚、乙醚、醋酸乙酯萃取, 保留醋酸乙酯萃取液, 冷冻干燥得到荭草醋酸乙酯萃提物 (POEa), 得率为 0.208%。精密称取 0.2 g 萃提物, 用甲醇溶解, 并定容至 250 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品没食子酸 10.43 mg、异荭草苷 8.40 mg、荭草苷 21.47 mg、牡荆素 13.29 mg、木犀草苷 6.88 mg、槲皮苷 10.62 mg、原儿茶酸 5.89 mg、儿茶素 7.53 mg、异牡荆素 11.17 mg、山柰素 9.96 mg、木犀草素 10.15

mg 和芹菜素 10.34 mg, 加甲醇分别制成单一对照品储备液。分别精密吸取没食子酸、异荛草苷、荛草苷、牡荆素、木犀草苷、槲皮苷对照品储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶, 加入甲醇, 定容后, 摇匀, 即为混合对照品溶液 (没食子酸 10.43 $\mu\text{g/mL}$ 、异荛草苷 33.60 $\mu\text{g/mL}$ 、荛草苷 85.88 $\mu\text{g/mL}$ 、牡荆素 53.16 $\mu\text{g/mL}$ 、木犀草苷 6.88 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮苷 21.24 $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.3 细胞实验供试品药液的制备 取“2.1.1”项下萃提物, 加完全培养液制成 200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 按含量测定配比称取对照品没食子酸 0.50 mg、异荛草苷 0.22 mg、荛草苷 0.61 mg、牡荆素 0.62 mg、木犀草苷 0.04 mg 及槲皮苷 0.21 mg, 总质量为 2.21 mg, 加完全培养液制成质量浓度为 2.21 $\mu\text{g/mL}$ 的与 POEa 同等剂量的 6 成分混合物溶液, 作为细胞实验供试品药液。

2.2 荛草醋酸乙酯提取物成分 UPLC-ESI-HRMS 鉴定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity BEH C_{18} 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 13%~21% B; 30~35 min, 21%~13% B; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 350 nm; 进样量 2 μL 。

2.2.2 质谱条件 使用以负离子模式电离目标化合物的加热电喷雾电离源的 Q Exactive Orbitrap MS 进行质谱串联, 喷雾电压 2.00 kV; 鞘气压力 207 kPa; 辅助气压 1 000 kPa; 毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气加热器温度 350 $^{\circ}\text{C}$; 扫描模式, 全 MS (分辨率 70 000) 和 MS/MS (分辨率 17 500, 归一化碰撞能量 35 eV, 进一步归一化碰撞能量 30、40 eV), 扫描范围 m/z 80~1 200。

2.2.3 主要成分确认 通过检索数据库 Dictionary of Natural Products 中荛草的化学成分以及关于荛草化学成分研究的相关报道^[12-14], 再根据一级质谱所提供的精确相对分子质量、同位素丰度和同位素间距等信息与数据库中的化学成分进行匹配, 并进一步利用二级质谱数据, 根据所得的碎片信息来对各色谱峰进行鉴定。

2.3 含量测定

2.3.1 HPLC 色谱条件 Ultimate[®] C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 0.03 μm), 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~6 min, 3% A; 6~

7 min, 3%~17% A; 7~17 min, 17% A; 17~25 min, 17%~25% A; 25~30 min, 25%~70% A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL 。

2.3.2 线性关系考察 分别配制“2.1.2”项下的混合对照品溶液质量浓度 10%、50%、100%、200%、300%、400% 的混合对照品溶液, 按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归。

2.3.3 精密度试验 吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 10 μL , 按“2.3.1”项下色谱条件连续重复进样 6 次。

2.3.4 稳定性试验 取荛草药材 (批号 171001), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 室温下于 0、2、4、6、8、12 h 按“2.3.1”项下色谱条件下进样测定。

2.3.5 重复性试验 取同一荛草药材 (批号 171001), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件下进样测定。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的荛草药材 (批号 171001) 100 g, 精密加入“2.1.2”项下单一对照品储备液, 按“2.1.1”项下方法制备加样供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样。

2.3.7 样品含量测定 取 6 批荛草药材 (批号分别为 171001、171002、171003、171101、171102、171103), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算样品含量。

2.4 体外抗肿瘤实验

2.4.1 细胞培养 将 A549 细胞放入培养瓶中, 加入含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素) 的 RPMI 1640 培养基 (完全培养液), 将培养瓶放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 保持单层细胞培养。

2.4.2 MTT 实验 A549 细胞用完全培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。将处于对数生长期的细胞调整为 5×10^3 个/mL, 接种至 96 孔板, 每孔 200 μL , 24 h 后弃上清液, 加入 POEa 及 6 成分混合物使其终质量浓度分别为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.14、0.28、0.55、1.10、2.21 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照组, 每组 10 复孔, 分别培养 24、48、72 h, MTT 法测定细胞生长抑制率。

2.4.3 Hoechst 33258 染色实验 取对数生长期细

胞接种在 6 孔板中, 24 h 后弃上清液, 加入 POEa 及 6 成分混合物, 使其终质量浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.28、0.55、1.10 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照组, 每组 5 复孔, 培养 48 h 后将附着的细胞用 PBS 洗涤 2 次, 4% 甲醛固定 30 min 后除去甲醛, 用 Hoechst 3328 溶液染色 20 min, 340 nm 荧光显微镜下观察。从每个孔的上下左右中 5 个视野, 观察细胞核形态变化来评估 A549 细胞凋亡情况。

2.4.4 流式细胞术实验 取对数生长期 A549 细胞, 调整密度为 1×10^6 个/mL, 接种于 6 孔板, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后弃上清液, 加入 POEa 及 6 成分混合物, 使其终质量浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.28、0.55、1.10 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照组, 每组 5 复孔, 培养 48 h 后, 消化收集细胞, 按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书测定细胞凋亡率。

2.4.5 细胞划痕实验 取对数生长期 A549 细胞, 调整密度为 3×10^4 个/mL, 接种于 24 孔板, 每孔 1 mL 培养 24 h 以产生单层细胞, 延中线划出 1 mm 宽的划痕, 加入 POEa 及 6 成分混合物, 使其终质量浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.28、0.55、1.10 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照组, 每组 5 复孔, 分别在 0、48 h 在显微镜下对细胞进行成像, 使用 Image J 计算划痕面积。

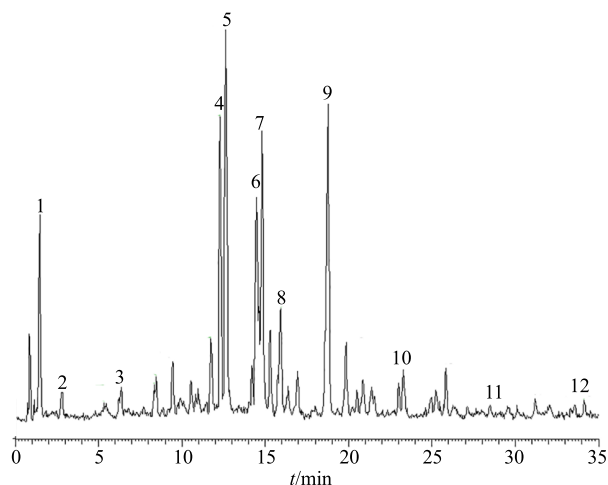
2.4.6 细胞迁移实验 取对数生长期 A549 细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养基制成细胞悬液, 调整浓度为 2×10^4 个/mL, 在 Transwell 上室中加入 200 mL 细胞悬液。在下室中加入完全培养液配制的 POEa 及 6 成分混合物, 使其终质量浓度分别为 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.28、0.55、1.10 $\mu\text{g/mL}$, 同时设置对照组, 每组 5 复孔。培养 48 h, 用 PBS 洗 2 遍, 将膜下侧迁移细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 擦拭过滤器上表面未迁移细胞后, 在高倍镜下计数迁移细胞数。

2.4.7 统计学方法 所有药理学实验均重复 3 次以上, 采用 SPSS V21.0 统计软件进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素两均数的比较采用 *t* 检验, 多均数的比较采用方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 荭草醋酸乙酯提取物主要成分分析结果

UPLC-ESI-HRMS 鉴定发现 POEa 中含有没食子酸、原儿茶酸、儿茶素、牡荆素、槲皮苷、山柰素、木犀草素、芹菜素、异荭草苷、荭草苷、异牡荆素、木犀草苷 12 种成分, 见图 1 和表 1。



负离子模式, 峰号与表 1 中所标化合物序号一致
negative ion mode, peak numbers were same as compound numbers in Table 1

图 1 POEa 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of QG

以荭草苷为例, 该化合物在供试品中的保留时间为 12.64 min, 一级质谱信息显示其在负离子模式下响应较正离子好, 并得到 m/z 447.093 0 的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 经 Xcalibur 软件拟合后推测其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$, 该化合物的二级离子碎片信息主要有 m/z 357.061 7、 m/z 327.051 1、分别对应 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4]^-$; 推测其裂解途径符合黄酮类化合物的裂解规律, 结合文献分析^[15], 最终确定该化合物为荭草苷。

3.2 含量测定结果

3.2.1 色谱条件考察结果 如图 2 所示, 在“2.3.1”项色谱条件下, 对照品与供试品溶液色谱峰基线平稳, 待测色谱分离度良好。

3.2.2 线性考察结果 如表 2 所示, 可知各成分在各自线性范围内线性关系良好。

3.2.3 精密度试验结果 没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.2%、0.6%、0.4%、0.9%、0.8%、0.6%, 表明仪器精密度良好。

3.2.4 稳定性试验结果 没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.1%、0.7%、0.9%、1.2%、1.0%、0.8%, 表明供试品溶液中在 12 h 内稳定性良好。

3.2.5 重复性试验结果 没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷质量分数 RSD 分别为 0.8%、1.3%、0.9%、1.0%、0.7%、0.8%, 表明该方法重复性良好。

表 1 UPLC-ESI-HRMS 对 POEa 中化学成分的鉴定分析

Table 1 Characterization of chemical constituents in POEa by UPLC-ESI-HRMS

峰号	t_R/min	分子式	$[M-H]^- (m/z)$	MS^2 碎片离子	化合物
1	1.48	$C_7H_6O_5$	169.013 1	125.023 1 $[M-H-CO_2]^-$	没食子酸
2	2.82	$C_7H_6O_4$	153.018 1	109.028 1 $[M-H-CO_2]^-$	原儿茶酸
3	6.36	$C_{15}H_{14}O_6$	289.071 7	245.081 6 $[M-H-CO_2]^-$, 203.070 6 $[M-H-CO_2-C_2H_2O]^-$, 125.023 1 $[M-H-C_6H_6O_2-C_2H_4O]^-$	儿茶素
4	12.28	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.092 0	357.061 7 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$, 327.051 1 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$	异荭草苷
5	12.64	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.093 2	357.061 7 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$, 327.051 1 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$	荭草苷
6	14.48	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.098 0	341.066 7 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$, 311.056 2 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$	牡荆素
7	14.81	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.097 8	341.066 7 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$, 311.056 2 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$	异牡荆素
8	15.95	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.093 2	285.040 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$	木犀草苷
9	18.76	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.093 2	301.027 6 $[M-H-C_6H_{10}O_4]^-$	槲皮苷
10	23.27	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.098 1	285.040 3 $[M-H-C_6H_{10}O_4]^-$	山柰素
11	28.01	$C_{15}H_{10}O_6$	285.040 4	285.040 4 $[M-H]^-$	木犀草素
12	34.13	$C_{15}H_{10}O_5$	269.045 5	269.045 5 $[M-H]^-$	芹菜素

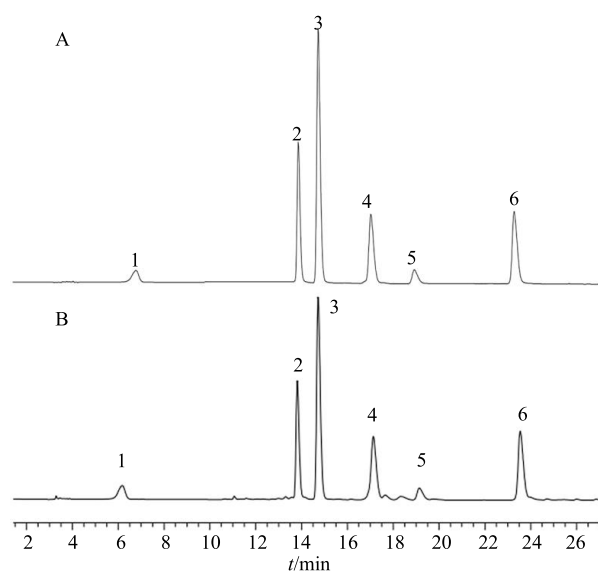
A-混合对照品 B-供试品 1-没食子酸 2-异荭草苷 3-荭草苷
4-牡荆素 5-木犀草苷 6-槲皮苷A-mixed standard B-test sample 1-gallic acid 2-isoquercetin
3-valerian 4-vitexin 5-luteolin 6-quercetin

图 2 荭草醋酸乙酯提取物 HPLC 色谱图

Fig. 2 Fingerprint of six index components of POEa

3.2.6 加样回收率试验结果 没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷的平均加样回收率分别为 98.39%、97.97%、97.14%、98.70%、98.35%、98.33%，RSD 分别为 1.4%、0.8%、1.0%、0.7%、0.7%、1.2%。

3.2.7 样品测定结果 荭草醋酸乙酯提取物中的 6 种成分稳定，结果见表 3。

3.2.8 基于化学成分含量和有效性相关的 Q-marker 预测分析 多项研究证实没食子酸在体内均表现出较强的抑制恶性肿瘤和炎症进程活性，其机制是通过阻断 NF- κ B 信号通路、COX、核糖核苷酸还原酶和谷胱甘肽活性，还能够激活 ATM 激酶信号通路抑制癌变进程^[16-17]；没食子酸亦被证实能够抑制脂多糖诱导 NF- κ B 信号转导，从而阻断 A549 细胞中的 RelA 乙酰化^[18]。多篇文献报道异荭草苷和荭草苷能够通过线粒体介导的途径、阻断 PI3K/Akt 信号通路和细胞内抗氧化防御机制等诱导肝癌细胞的凋亡^[19-21]。牡荆素亦被多项研究证实其通过激活 JNK 信号通路，抑制细胞自噬从而实现诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤生长的作用^[22-24]。槲

表 2 回归方程、线性范围和相关系数

Table 2 Regression equation, linear range, and correlation coefficient

成分	回归方程	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	r
没食子酸	$Y=1.897\times 10^4 X-9.635\times 10^3$	1.04~ 41.72	0.999 7
异荭草苷	$Y=1.780\times 10^5 X+8.321\times 10^4$	3.36~134.40	0.999 8
荭草苷	$Y=9.609\times 10^4 X+2.460\times 10^4$	8.58~343.52	1.000 0
牡荆素	$Y=2.338\times 10^4 X-1.085\times 10^4$	5.32~212.64	1.000 0
木犀草苷	$Y=3.683\times 10^4 X-8.453\times 10^3$	0.69~ 27.50	0.999 9
槲皮苷	$Y=1.932\times 10^4 X-2.925\times 10^4$	2.12~ 84.96	0.999 9

表 3 POEa 中 6 种成分的含量 ($n = 6$)
Table 3 Contents of six components in POEa ($n = 6$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	没食子酸	异荭草苷	荭草苷	牡荆素	木犀草苷	槲皮苷
20171001	2.498	1.128	3.062	3.078	0.225	1.072
20171002	2.463	1.135	3.055	3.091	0.218	1.063
20171003	2.515	1.116	3.051	3.052	0.224	1.048
20171101	2.487	1.158	3.093	3.071	0.251	1.085
20171102	2.479	1.111	3.042	3.105	0.215	1.076
20171103	2.451	1.093	3.039	3.054	0.209	1.054

皮苷和木犀草苷亦被证实通过逆转录酶抑制剂和抗氧化等途径抑制肿瘤和神经退行性病变等^[25-28]。通过荭草醋酸乙酯提取物的主要成分及与其抗肿瘤活性的相关性分析,通过预试验并综合考虑 Q-marker 的质量控制科学性、稳定性和成本可行性,本研究最终选择了没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷和槲皮苷 6 个成分建立 HPLC 多指标同时检测方法。

3.3 体外抗肿瘤实验结果

3.3.1 细胞生长抑制率结果 如表 4 所示,在药物作用 24、48、72 h 条件下,POEa 对 A549 细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 144.03、99.48、75.94 μg/mL;混合物对 A549 细胞的 IC₅₀ 值分别为 2.07、1.15、0.77 μg/mL。

3.3.2 细胞凋亡结果 如图 3、4 所示,对照组中,细胞核显示均匀的蓝色染色,外观光滑,经处理后

的 A549 细胞中可以看到细胞核碎裂为明亮的蓝色颗粒。POEa 和混合物浓度的增加导致凋亡细胞百分比显著增加,用 25、50、100 μg/mL 的 POEa 及 0.28、0.55、1.10 μg/mL 的混合物处理后,A549 细胞凋亡百分比分别为 (1.78±0.31)%、(27.83±0.77)%、(57.33±1.13)%及 (1.51±0.24)%、(27.69±0.62)%、(56.57±0.93)%。

3.3.3 细胞迁移实验结果 如表 5 和 6 所示,与对照组相比,经处理后的 A549 细胞,划痕愈合面积及细胞迁移数量均明显减少,且随着 POEa 和混合物的浓度增加,划痕愈合抑制率及细胞迁移抑制率均明显增加。

4 讨论

本研究应用刘昌孝院士^[11]提出的“质量标志物”(Q-marker)的理论,通过 UPLC-ESI-HRMS 结合对照品指认了 12 种成分;再通过化合物与抗肿

表 4 POEa 和成分混合物对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of POEa and mixture on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	A 值			抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照	—	0.86±0.02	1.12±0.02	1.49±0.03	—	—	—
POEa	12.50	0.89±0.03	1.16±0.03	1.51±0.02	-3.40±4.13	-3.69±3.10	-1.79±2.40
	25.00	0.82±0.02	1.00±0.03*	1.21±0.03*	4.53±4.66	10.89±3.18*	18.40±1.99*
	50.00	0.72±0.03*	0.79±0.02**	0.88±0.02**	16.82±4.46*	29.44±2.59**	40.49±2.12**
	100.00	0.53±0.02**	0.52±0.02**	0.58±0.01**	39.62±2.94**	52.89±1.72**	61.31±0.91**
	200.00	0.34±0.02**	0.34±0.01**	0.33±0.02**	60.67±2.49**	69.23±1.67**	77.84±1.41**
混合物	0.14	0.85±0.02	1.10±0.01	1.41±0.03	1.64±1.87	1.80±3.51	5.26±1.94
	0.28	0.82±0.01	1.02±0.03*	1.23±0.03*	5.17±1.20	8.50±3.36*	17.16±1.01*
	0.55	0.73±0.02*	0.80±0.03**	0.88±0.03**	15.27±0.59*	28.40±2.87**	40.86±4.47**
	1.10	0.56±0.03**	0.56±0.02**	0.53±0.02**	34.54±1.40**	49.97±0.26**	64.42±0.35**
	2.21	0.36±0.02**	0.35±0.04**	0.32±0.02**	57.70±0.69**	68.69±0.54**	77.05±1.50**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

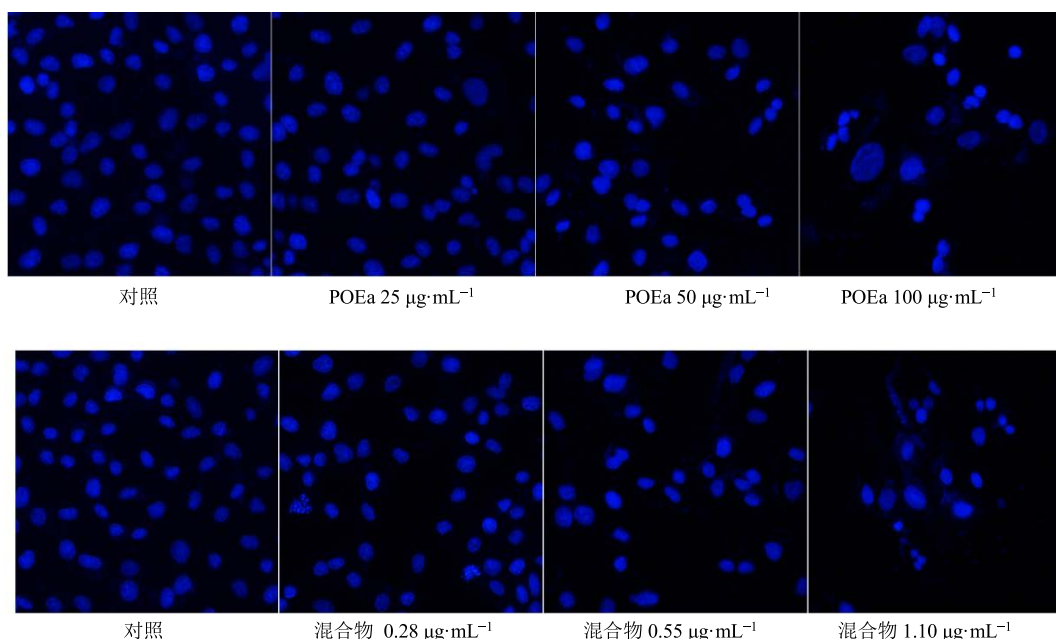
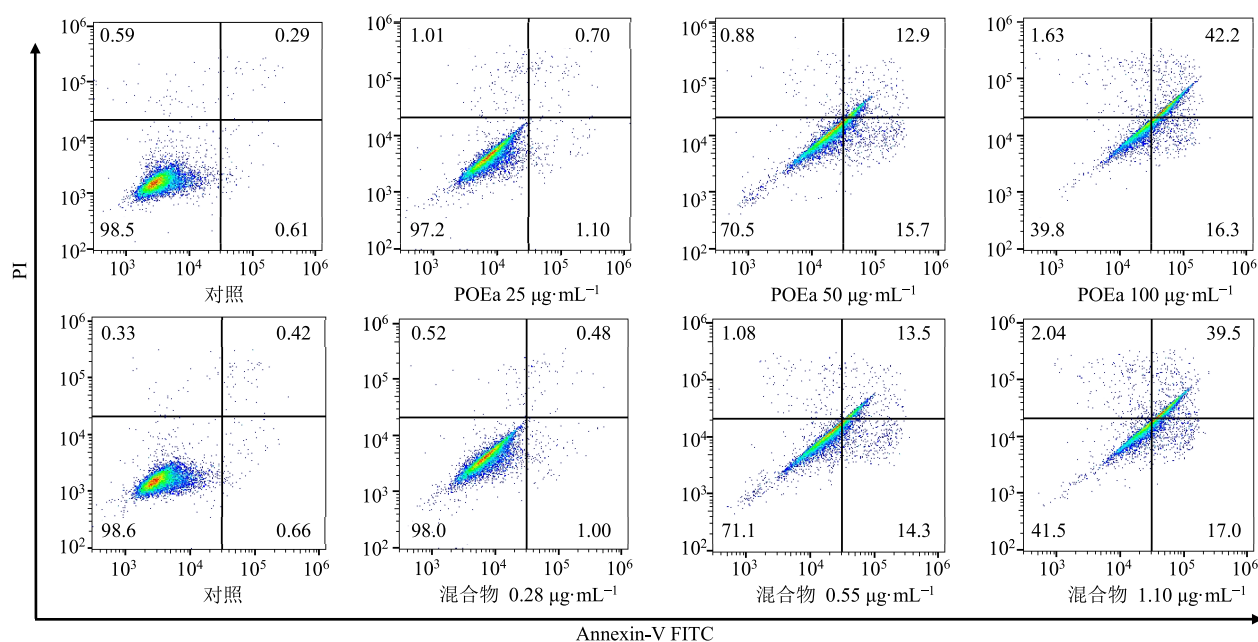


图 3 POEa 和混合物对 A549 细胞凋亡形态的影响

Fig. 3 Effect of POEa and mixture on apoptotic morphology of A549 cells

图 4 POEa 和混合物对 A549 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of POEa and compound on apoptosis rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

瘤活性文献分析,并结合成分含量及稳定性选择其中了 6 种成分作为 Q-marker 候选化合物;最后研究发现荭草醋酸乙酯提取物及 6 种成分混合物中、高剂量均能显著抑制 A549 细胞增殖活性,并促进其凋亡;同时建立了同时测定荭草醋酸乙酯提取物中没食子酸、异荭草苷、荭草苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷的 HPLC 法,该方法操作简便、高效、准

确,重复性好。

本实验测定的荭草醋酸乙酯提取物中的 6 种成分在 6 个批次均检出,且总质量分数占提取物的 10.900%~11.145%。6 种主要成分中含量最高的化合物为荭草苷和牡荆素,在 6 个批次中所测得的平均质量分数分别为 0.636%和 0.640%,这 2 种化合物分别占 6 种主要化合物质量分数总和的 27.721%

表 5 POEa 和混合物对 A549 细胞愈合的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 5 Effect of POEa and compound on healing of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g mL}^{-1}$)	划痕面积/ mm^2		48 h 划痕愈合抑制率/%
		0 h	48 h	
对照	—	0.65 ± 0.02	0.11 ± 0.01	—
POEa	25.00	0.77 ± 0.03	$0.31 \pm 0.01^*$	$13.47 \pm 2.51^*$
	50.00	0.68 ± 0.02	$0.44 \pm 0.01^{**}$	$40.43 \pm 1.93^{**}$
	100.00	0.60 ± 0.01	$0.42 \pm 0.01^{**}$	$66.52 \pm 1.66^{**}$
混合物	0.28	0.69 ± 0.02	$0.23 \pm 0.02^*$	$14.51 \pm 1.48^*$
	0.55	0.73 ± 0.02	$0.51 \pm 0.03^{**}$	$39.75 \pm 1.92^{**}$
	1.10	0.67 ± 0.04	$0.48 \pm 0.01^{**}$	$63.22 \pm 1.59^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as table below

表 6 POEa 和混合物对 A549 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 6 Effect of POEa and compound on migration of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{g mL}^{-1}$)	细胞迁移数	细胞迁移抑制率/%
对照	—	139.33 ± 9.22	—
POEa	25.00	$122.21 \pm 5.15^*$	$12.08 \pm 3.66^*$
	50.00	$92.63 \pm 4.37^{**}$	$33.52 \pm 2.19^{**}$
	100.00	$63.74 \pm 6.02^{**}$	$54.25 \pm 2.25^{**}$
混合物	0.28	$126.17 \pm 3.12^*$	$9.45 \pm 2.84^*$
	0.55	$89.75 \pm 2.98^{**}$	$35.58 \pm 4.19^{**}$
	1.10	$65.47 \pm 4.32^{**}$	$53.01 \pm 3.82^{**}$

和 27.886%。异荳蔻苷、荳蔻苷、牡荆素、木犀草苷及槲皮苷, 这 5 种黄酮类化合物占 6 种主要成分质量分数总和的 77.492%, 体现出黄酮类成分是其 主要抗肿瘤活性成分^[29], 但是黄酮类成分也是药用植物中广泛含有的成分, 如竹叶、檀香叶中即同时存在荳蔻苷、异荳蔻苷和异牡荆苷成分^[30-31]。本实验中荳蔻醋酸乙酯提取物若只测定单个或少数黄酮成分, 则难以控制全面质量。本研究通过 Q-marker 筛选的新理论和方法, 筛选和建立基于多指标成分的荳蔻醋酸乙酯提取物质量控制方法, 以期符合 Q-marker 中“质量的传递性 (Transitivity) 和追溯性 (Traceability)”原则。

后期将通过进一步扩大收集荳蔻不同产地、加工方法的多批次样品, 根据中药质量标志物的研究模式, 开展荳蔻醋酸乙酯抗肿瘤活性提取物 Q-marker 的系统研究, 以期为其全面质量控制奠定坚实的基础, 为民族药开发应用提供新方法。

参考文献

[1] 陶弘景撰. 名医别录 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013.

- [2] 贵州省中药材、民族药材质量标准 [S]. 2003.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1998.
- [4] 杨志云, 秦民坚, 钱士辉. 红蓼研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(1): 11-15.
- [5] 万思琦, 刘立亚, 刘梦思, 等. 荳蔻苷的药理作用机制研究 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(6): 183-186.
- [6] 罗成, 李艳, 龙建纲, 等. 异荳蔻素的药理作用 [J]. 航天医学与医学工程, 2016, 29(5): 381-384.
- [7] Wang K J, Yang C R, Zhang Y J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*) [J]. *Food Chem*, 2007, 101(1): 365-371.
- [8] 梁生林, 颜峰光, 严珂, 等. 荳蔻煎剂对小鼠抗炎镇痛作用初探 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(8): 1514-1515.
- [9] 翟延君, 程飞, 王添敏, 等. 花旗松素对人宫颈癌 Hela 细胞的体外抗肿瘤活性及其机理研究 [J]. 中成药, 2011, 33(12): 2052-2055.
- [10] 张玲艳, 高翔, 王晓玲. 荳蔻的体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(8): 33-34.
- [11] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [12] 黄勇, 郑林, 何峰, 等. UPLC-PDA-ESI/MS 分析荳蔻中化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 57-59.
- [13] Wang L, Zhang J, Zhao R, et al. Adsorption of basic dyes on activated carbon prepared from *PolYGONUM orientale* Linn: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies [J]. *Desalination*, 2010, 254(1/3): 68-74.
- [14] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
- [15] 潘智然, 王腾华, 朱首伦, 等. 基于超高压液相色谱-高分辨多级质谱联用技术的中药淡竹叶化学成分分析

- [J]. 广东药学院学报, 2016, 32(3): 300-306.
- [16] Verma S, Singh A, Mishra A, *et al.* Gallic acid: Molecular rival of cancer [J]. *Pharmacol Environ Toxicol*, 2013, 35(3): 473-485.
- [17] Faried A, Kurnia D, Faried L, *et al.* Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines [J]. *Inter J Oncol*, 2007, 30(3): 605-613.
- [18] Choi K C, Lee Y H, Jung M G, *et al.* Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(12): 2011-2021.
- [19] Lin X, Wei J B, Chen Y X, *et al.* Isoorientin from *Gypsophila elegans* induces apoptosis in liver cancer cells via mitochondrial-mediated pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 187: 187-194.
- [20] Yuan L, Wang J, Wu W Q, *et al.* Effect of isoorientin on intracellular antioxidant defence mechanisms in hepatoma and liver cell lines [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 356-362.
- [21] Yuan L, Wang J, Xiao H F, *et al.* Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells [J]. *Toxicol Pharmacol Appl*, 2012, 265(1): 83-92.
- [22] Bhardwaj M, Cho H J, Paul S, *et al.* Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(3): 3278-3291.
- [23] He J D, Wang Z, Li S P. Vitexin suppresses autophagy to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma via activation of the JNK signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 84520.
- [24] Zhou Y J, Liu Y E, Cao J G, *et al.* Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5161-5169.
- [25] Gibellini L, Pinti M, Nasi M, *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention [J]. *Evidence-Based ComplAlter Med*, 2011, 2011(3): 591356.
- [26] Jeong J H, An J Y, Kwon Y T, *et al.* Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(1): 73-82.
- [27] Lamson D W, Brignall M. Antioxidants and cancer, part 3: Quercetin [J]. *Alter Med Rev*, 2000, 5(3): 196-208.
- [28] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(2): 315-325.
- [29] 李 焱. 木犀草素、荭草苷和异荭草苷的 UGT 代谢机理及 BCRP 外排转运蛋白调控其代谢的机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [30] 李洪玉, 孙静芸, 章建民, 等. HPLC 测定不同来源竹叶中荭草苷、异荭草苷和异牡荆苷的含量 [J]. *中成药*, 2004, 26(3): 208-210.
- [31] 闫 冲, 林 励, 刘红菊, 等. 檀香叶黄酮类化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(22): 3130-3133.