

## 含羞草根水提物对干酵母致大鼠高热的解热作用及其药效物质基础

李彪<sup>1</sup>, 邹润<sup>1</sup>, 苏发智<sup>1</sup>, 张文森<sup>1</sup>, 刘萌<sup>1</sup>, 范灏奎<sup>1</sup>, 贾宸宸<sup>1</sup>, 孙延平<sup>1</sup>, 曾元宁<sup>2</sup>, 王秋红<sup>2</sup>, 匡海学<sup>1\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** **目的** 探究含羞草 *Mimosa pudica* 根水提物对干酵母致发热模型大鼠的解热作用及其药效物质基础。**方法** 采用 HPLC 法指认含羞草根水提物的化学成分。通过背部 sc 20%干酵母混悬液建立大鼠发热模型, ELISA 法测定大鼠血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6 及下丘脑中 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平, 采用超分辨率液质联用技术对大鼠血清和下丘脑进行非靶向代谢组学分析, 以阐明含羞草根水提物的解热作用机制。采用柱色谱和半制备液相并结合 NMR、MS 等现代波谱技术对含羞草根化学成分进行分离与鉴定, 采用分子对接评价含羞草根化学成分与解热关键靶点 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的亲合力, 并通过考察含羞草根化学成分对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞一氧化氮 (nitric oxide, NO) 释放量的影响评价其抗炎活性。**结果** 4 种黄酮类成分 (槲皮素、芦丁、杨梅素、木犀草素) 在含羞草根水提物中被指认。药效学实验表明在造模 5 h 后大鼠体温明显升高 ( $P < 0.01$ ), 含羞草根水提物组大鼠体温在各个时段均显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ), 含羞草根显著降低发热大鼠下丘脑中 cAMP、5-HT、PGE<sub>2</sub> 和血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平 ( $P < 0.001$ )。代谢组学结果显示干酵母致大鼠发热后下丘脑及血清的代谢轮廓发生了显著的变化, 分别鉴定出 34、16 个潜在的生物标志物; 经含羞草根干预后, 以上生物标志物含量显著回调, 主要影响氨基酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环、维生素 B<sub>6</sub> 代谢、初级胆汁酸生物合成、类固醇激素生物合成等途径。从含羞草根中分离出 8 个有机酸类成分, 分别鉴定为二十六烷 (1)、十七烷酸 (2)、(2S)-1-O-三十七烷酰基甘油 (3)、二氢咖啡酸甲酯 (4)、3,4-二羟基苯酚甲酯 (5)、原儿茶酸 (6)、咖啡酸 (7)、没食子酸乙酯 (8)。其中, 除化合物 7 外, 其余化合物均为含羞草属植物首次发现。分子对接结果显示除化合物 1 和 3 外, 其余化合物和黄酮类成分与 TLR4 有一定的亲和性。化合物 1~8 均具有较强的体外抗炎作用, 可能为含羞草根发挥解热作用的物质基础。**结论** 含羞草水提物对干酵母致热大鼠有显著的解热作用, 其作用机制可能与抑制致热内源性因子的释放和调节氨基酸代谢、嘌呤代谢、能量代谢等途径有关, 其发挥解热的药效物质基础可能为有机酸类成分和黄酮类成分。

**关键词:** 含羞草根; 干酵母; 高热; 解热作用; 5-羟色胺; 代谢组学; 氨基酸代谢; TLR4; 槲皮素; 芦丁; 杨梅素; 木犀草素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)11-3920-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.013

## Antipyretic effect and pharmacological substance basis of water extract of root of *Mimosa pudica* in dry yeast-induced hyperthermia in rats

LI Biao<sup>1</sup>, ZOU Run<sup>1</sup>, SU Fazhi<sup>1</sup>, ZHANG Wensen<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, FAN Haokui<sup>1</sup>, JIA Chenchen<sup>1</sup>, SUN Yanping<sup>1</sup>, ZENG Yuaning<sup>2</sup>, WANG Qiuhong<sup>2</sup>, KUANG Haixue<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Basic and Application Research of Beiyao, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

收稿日期: 2025-01-16

**基金项目:** 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程-岐黄工程首席科学家支持项目 (国中医药人教函[2021]7号); 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2022]75号); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函[2022]76号); 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (黑龙江省头雁行动领导小组文件[2019]5号); 全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2024]255号); 广东省基础与应用基础研究基金 (2023A1515110740)

**作者简介:** 李彪 (1996—), 男, 博士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: 18826108664@163.com

**\*通信作者:** 匡海学 (1955—), 男, 博士生导师, 教授, 主要从事中药及复方药效物质基础及中药药性理论研究。E-mail: hxkuang@hljucm.edu.cn

**Abstract: Objective** To investigate the antipyretic effects and pharmacological substance basis of water extract of root of *Mimosa pudica* on a fever model rat induced by dry yeast. **Methods** The chemical constituents of water extract of root of *M. pudica* were identified using HPLC. A rat fever model was established by subcutaneous injection of 20% dry yeast suspension. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 in serum, as well as 5-hydroxytryptamine (5-HT), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in hypothalamus were measured using ELISA. Non-targeted metabolomics analysis of serum and hypothalamus in rats was performed using UPLC-Orbitrap Fusion MS to elucidate the antipyretic mechanism of water extract of root of *M. pudica*. Column chromatography and semi-preparative liquid chromatography, combined with modern spectroscopic techniques such as NMR and MS, were employed to isolate and identify the chemical constituents of root of *M. pudica*. Molecular docking was used to evaluate the affinity of the identified chemical constituents for the key antipyretic target Toll-like receptor 4 (TLR4). And its anti-inflammatory activity was evaluated by examining the effect of chemical components in root of *M. pudica* on lipopolysaccharide induced nitric oxide (NO) release in RAW264.7 cells. **Results** A total of four flavonoid components (quercetin, rutin, myricetin, luteolin) were identified in water extract of root of *M. pudica*. Pharmacological experiments showed that the body temperature of rats significantly increased 5 h after modeling ( $P < 0.01$ ), water extract of root of *M. pudica* group exhibited significantly lower body temperatures at all time points compared to model group ( $P < 0.01$ ), the root of *M. pudica* significantly reduced the levels of cAMP, 5-HT, PGE<sub>2</sub> in hypothalamus and TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in serum of feverish rats ( $P < 0.001$ ). Metabolomics results revealed significant changes in metabolic profiles of hypothalamus and serum after dry yeast-induced fever, identifying 34 and 16 potential biomarkers, respectively. After intervention with root of *M. pudica*, the levels of these biomarkers were significantly regulated, primarily affecting pathways such as amino acid metabolism, purine metabolism, pyrimidine metabolism, citric acid cycle, vitamin B<sub>6</sub> metabolism, primary bile acid biosynthesis and steroid hormone biosynthesis. A total of eight organic acid components were isolated from root of *M. pudica* and identified as hexacosane (1), heptadecanoic acid (2), (2S)-1-O-heptatriacontanoylglycerol (3), methyl dihydrocaffeate (4), 3,4-dihydroxybenzyl alcohol (5), protocatechuic acid (6), caffeic acid (7) and ethyl gallate (8). Among these, compounds 1—8, except for compound 7, were discovered for the first time in *Mimosa* genus. Molecular docking results showed that except for compounds 1 and 3, the remaining compounds and flavonoids exhibited affinity for TLR4. Compounds 1—8 demonstrated strong anti-inflammatory effects *in vitro*, suggesting their potential as the material basis for the antipyretic effects of root of *M. pudica*. **Conclusion** The water extract of root of *M. pudica* exhibits significant antipyretic effects on dry yeast-induced fever in rats. Its mechanism may be related to the inhibition of endogenous pyrogenic factor release and the regulation of metabolic pathways such as amino acid metabolism, purine metabolism, and energy metabolism. The pharmacological substance basis responsible for its antipyretic effects are likely organic acids and flavonoids.

**Key words:** root of *Mimosa pudica* L.; dry yeast; hyperthermia; antipyretic effect; 5-hydroxytryptamine; metabolomics; amino acid metabolism; TLR4; quercetin; rutin; myricetin; luteolin

含羞草为豆科植物含羞草 *Mimosa pudica* L. 的干燥全草<sup>[1]</sup>, 收载在《岭南采药录》《全国中草药汇编》(第3版, 卷二)、《广东省中药材标准》、《中药大辞典(上册)》及广州部队后勤部卫生部编写的《常用中草药手册》等中药专著中<sup>[2]</sup>。其中,《广东省中药材标准第三册》中记载,含羞草甘、涩,微寒,有小毒,归心、肝、胃、大肠经,具有清热利尿、化痰止咳、安神止痛的功效,用于治疗感冒、小儿高热、急性结膜炎、支气管炎、胃炎、腹泻、泌尿系统结石<sup>[3]</sup>。含羞草根在临床中多用于胃肠道疾病<sup>[4]</sup>、白血病等治疗。课题组前期研究证实了含羞草根提取物对白血病有一定的治疗作用<sup>[5]</sup>。发热为白血病的典型症状<sup>[6]</sup>,其中,感染发热是白血病发热最常见的原因<sup>[7]</sup>,且含羞草对小儿高热有一定的解热作用。干酵母致热是经典的发热模型<sup>[8]</sup>,酵

母作为一种细菌类微生物,使机体产生炎症大爆发,进而使体温持续稳定的发热<sup>[9]</sup>。因此,本研究选择干酵母致热模型,探究含羞草根水提物对幼年大鼠的解热作用,并采用非靶向血清代谢与下丘脑代谢方法探究其内在代谢作用机制,旨在阐明含羞草根解热的作用机制,为含羞草的资源开发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物和细胞

SPF级雄性SD大鼠50只,4周龄,体质量100~110g,购自广东省医学实验动物中心,许可证号SCXK(粤)2022-0002。动物饲养于广东省药科大学实验动物中心SPF级动物实验室,温度23℃,相对湿度60%,自由进食饮水,12h光照/黑暗循环,适应性饲养1周后开展动物实验。动物

实验经广东药科大学伦理委员会批准（批准号 2024042207）。

RAW264.7 细胞由中国科学院上海细胞库提供。

## 1.2 药材

含羞草根购自四川瑞芝堂生物科技有限公司，产地为海南，经广东药科大学刘基柱副教授鉴定为豆科植物含羞草 *M. pudica* L. 的根。

## 1.3 药品与试剂

分析乙醇购自上海银犁科技有限公司；水为实验室自制超纯水；色谱乙腈、色谱甲醇、色谱甲酸购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；干酵母粉（批号 20230222）购自安琪酵母股份有限公司；大鼠环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate, cAMP）试剂盒（批号 MM-0549R1）、大鼠 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）试剂盒（批号 MM-0442R1）、大鼠前列腺素 E<sub>2</sub>（prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>）试剂盒（批号 MM-0068R1）、大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）试剂盒（批号 MM-0180R1）、大鼠白细胞介素-1 $\beta$ （interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ）试剂盒（批号 MM-0047R1）、大鼠 IL-6 试剂盒（批号 MM-0190R1）购自江苏酶免实业有限公司；复方对乙酰氨基酚片（批号 H20056948）购自山东新华制药股份有限公司；薄层色谱硅胶购自青岛海洋化工厂；其他试剂均为分析纯，由天津市大茂化学试剂厂提供；对照品槲皮素、芦丁、杨梅素、木犀草素（批号分别为 MUST-24030213、23120104、24041223、24040221）均购自成都曼斯特生物科技有限公司，质量分数 > 98.5%；脂多糖（lipopolysaccharide, LPS, 批号 L8880）购自北京索莱宝科技有限公司；一氧化氮（nitric oxide, NO）检测试剂盒（批号 S0021M）购自碧云天生物技术公司。

## 1.4 仪器

ODS-A-HG 反相色谱柱（日本 YMC 公司）；COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II 半制备型色谱柱（250 mm × 10 mm, 5  $\mu$ m）；SCIENTZ-48L 型冷冻型高通量组织研磨器、SB-5200TD 型数控超声波清洗器（宁波新芝生物科技有限公司）；H1750R 型台式高速冷冻离心机（湖南湘仪公司）；Thermo Hypersil GOLD 制备型色谱柱（250 mm × 21.2 mm, 5  $\mu$ m）、Thermo Orbitrap Fusion 高分辨质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Dionex Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪（美国 Dionex 公司）；MX-F 型涡旋器（美

国 Scilogex 公司）；Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统（德国 Millipore 公司）；Epoch2 型全波长酶标仪（美国 BioTek 公司）；e2695-2998-2424 型分析 HPLC、2535-2489-2414 型制备 HPLC（美国 Waters 公司）；Bruker-400 型超导核磁共振光谱仪（德国 Bruker 公司）。

## 2 方法

### 2.1 含羞草根水提物的制备

取含羞草根 10 kg，加 8 倍量的纯化水加热回流提取 3 次，第 1 次提取 3 h，第 2 次提取 2.5 h，第 3 次提取 2 h。合并提取液，滤过，回收溶剂，得到含羞草根水提物，冷藏备用。

### 2.2 含羞草根水提物的成分指认

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取槲皮素、芦丁、杨梅素、木犀草素对照品适量，加甲醇溶解，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密称取含羞草根水提物浸膏 5.012 mg，加 70% 甲醇适量，超声提取 30 min，冷却至室温，离心取上清，补足溶液至 10 mL。

**2.2.3 色谱条件** SunFire C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）- 甲醇（B），梯度洗脱：0~20 min, 35%~42% B；20~35 min, 42% B；35~37 min, 42%~50% B；37~50 min, 50%~55% B；50~50.1 min, 55%~35% B；50.1~53 min, 35% B。柱温 35  $^{\circ}$ C；体积流量 1 mL/min；进样量 10  $\mu$ L。二极管阵列（photo-diode array, PDA）检测器，检测波长 254 nm。

### 2.3 动物分组、造模与给药

SD 大鼠适应性饲养 1 周后，连续 3 d 于固定时间点进行直肠温度测定，在体温计探头沾取少许液体石蜡并用棉球擦拭，将体温计插入肛门，深度为 3 cm，每次间隔 1 h。第 3 天剔除单次温度高于 38  $^{\circ}$ C 且 2 次测温温差大于 0.5  $^{\circ}$ C 的大鼠，并将体温合格大鼠按体温随机分为对照组、模型组、对乙酰氨基酚（150 mg/kg）组和含羞草根水提物低、高剂量（100、400 mg/kg）组。第 4 天连续测定 2 次体温，以末次体温为初始基础体温，各给药组 ig 相应药物，对照组和模型组 ig 等体积生理盐水。除对照组外，其余大鼠于背部 sc 以生理盐水溶解的 20% 干酵母溶液（10 mL/kg），注射酵母 3.5 h 后，再次给予相应药物。于注射酵母 4、5、6、7 h 连续记录大鼠肛温，选择温度升高值  $\geq$  0.8  $^{\circ}$ C 的大鼠纳入后续研究。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 体温测定** 记录基础肛温以及造模后4、5、6、7h肛温,并绘制相应体温变化曲线以评价其解热效果<sup>[10]</sup>。

**2.4.2 血清中炎症因子水平的测定** 末次测温后,大鼠ip 10%戊巴比妥(3 mL/kg)麻醉,腹主动脉取血,静置2h,4℃、3 500 r/min离心10 min,分离血清,置于-80℃保存备用。按照ELISA试剂盒说明书测定大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平。

**2.4.3 下丘脑中体温调节相关指标水平的测定** 大鼠麻醉取血后,快速取脑,将下丘脑组织置于-80℃保存备用。按照ELISA试剂盒说明书测定大鼠下丘脑组织中PGE<sub>2</sub>、cAMP和5-HT水平。

## 2.5 代谢组学分析

**2.5.1 下丘脑代谢样本的制备** 将脑组织样本从-80℃冰箱取出,室温解冻,精密称取100 mg下丘脑组织于2 mL无菌无酶离心管中,加入预冷的甲醇-水(4:1)500  $\mu$ L,将离心管置于预冷的组织研磨仪中进行高速匀浆以制备脑组织匀浆液。

4℃、15 000 r/min离心10 min,取150  $\mu$ L上清液置于带有内插管的进样瓶中,进行超高效液相-质谱联用(UPLC-Orbitrap-MS)分析。此外,每个样本取10  $\mu$ L进行混匀,作为质量控制(quality control, QC)样本。平均每8个样本进行QC样本分析,以考察仪器稳定性。

**2.5.2 血清代谢样本的制备** 将血清样本从-80℃冰箱取出,室温解冻,精密吸取200  $\mu$ L血清于2 mL无菌无酶离心管中,加入预冷的甲醇-水(4:1)600  $\mu$ L,将离心管涡旋1 min以制备血清提取液。后续步骤同“2.5.1”。

**2.5.3 色谱条件** Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。下丘脑代谢样本梯度洗脱条件:0~1.00 min, 2% B; 1.00~3.00 min, 2%~18% B; 3.00~5.00 min, 18%~70% B; 5.00~12.00 min, 70%~100% B; 12.00~14.00 min, 100% B; 14.10~16.00 min, 100%~2% B。血清代谢样本梯度洗脱条件:0~1.00 min, 2% B; 1.00~3.00 min, 2%~35% B; 3.00~5.00 min, 35%~70% B; 5.00~12.00 min, 70%~100% B; 12.00~14.00 min, 100% B; 14.00~14.10 min, 100%~2% B; 14.10~16.00 min, 2% B。进样体积3  $\mu$ L;柱温40℃。

**2.5.4 质谱条件** 离子喷雾电压为+3.0 kV

(ESI<sup>+</sup>)和-2.8 kV (ESI<sup>-</sup>);鞘气体积流量20 L/h;辅助气体积流量6 L/h;扫气体积流量0 L/h;离子传输管温度300℃;汽化器温度320℃;检测器类型为Orbitrap, Orbitrap分辨率60 000;扫描范围 $m/z$  100~1 000;隔离窗 $m/z$  1.6;激活类型为高能碰撞解离(high energy collision dissociation, HCD);碰撞能量模式为梯度, HCD碰撞能为15%、25%、35%。

**2.5.5 数据处理与统计分析** 采用Compound Discover 3.2软件对各组样本数据的各个峰进行数据提取、基线校正及归一化等分析处理,分别得到正、负离子模式下包含保留时间、化合物名称、质荷比( $m/z$ )及各峰值区域的归一化峰面积的数据表,将其导入SIMCA 14.1软件中进行多元统计分析,构建主成分分析(principal components analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型及200次置换检验模型评价模型。根据多元统计分析结果,选择变量重要性投影(variable importance projection, VIP)>1且 $P<0.05$ 的变量作为潜在的差异代谢物。采用HMDB数据库(<http://hmdb.ca/>)鉴定筛选的代谢物,并通过Metabo Analyst 5.0网站(<http://www.metaboanalyst.ca/>)进一步筛选内源性差异代谢物,富集分析得到代谢通路。通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库进行代谢通路分析。

## 2.6 含羞草根中主要成分的分离鉴定

取含羞草根44 kg,加入8倍量的70%乙醇加热回流提取2次,第1次提取时间3 h,第2次提取时间2.5 h,滤过,回收试剂,得醇提物。适量水混悬,依次用石油醚、醋酸乙酯、水饱和正丁醇溶液萃取3次,回收溶剂,得石油醚组分48.93 g、醋酸乙酯组分222.01 g。

取石油醚组分浸膏42 g,用80~100目硅胶45 g拌样,进行硅胶柱色谱分离(200~300目),以石油醚-醋酸乙酯(100:0~0:100)梯度洗脱,通过TLC合并相似成分得到14个流分(Fr. A~Fr. N)。Fr. E进一步经硅胶柱色谱分离得到6个子流分(Fr. E.1~Fr. E.6), Fr. E.4经LH-20凝胶柱进一步纯化得到4个子组分(Fr. E.4.1~Fr. E.4.4), Fr. E.4.2经TLC检测,斑点较为单一,静置析出针状结晶,进一步重结晶得到化合物1。使用相同方法在Fr. H和Fr. K中得到化合物2和3。

取醋酸乙酯组分浸膏190 g,用80~100目硅

胶 200 g 拌样,进行硅胶柱色谱分离(200~300 目),以二氯甲烷-甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱,通过 TLC 合并相似成分得到 10 个流分(Fr. 1~Fr. 10)。Fr. 5 (17.26 g)经 ODS 柱色谱进一步分离得到 13 个亚组分(Fr. 5.1~Fr. 5.13),Fr. 5.3 经半制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水=69:31)得化合物 4 ( $t_R=25.10$  min, 12.72 mg)、化合物 5 ( $t_R=32.57$  min, 3.7 mg)。Fr. 5.5 经半制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水=75:25)得化合物 6 ( $t_R=17.03$  min, 6.7 mg)。Fr. 6 (13.45 g)经 ODS 柱色谱进一步分离得到 9 个亚组分(Fr. 6.1~Fr. 6.9),Fr. 6.4 经半制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水=55:45)得化合物 7 ( $t_R=20.10$  min, 7.54 mg),Fr. 6.6 经制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水=62:38)得化合物 8 ( $t_R=18.23$  min, 8.19 mg),Fr. 6.7 经制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水=69:31)得化合物 9 ( $t_R=16.54$  min, 13.64 mg)。

## 2.7 体外抗炎活性评价

### 2.7.1 细胞培养及细胞毒性评价

采用 CCK-8 法考察化合物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响。RAW264.7 细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L。设置对照组、模型组和不同浓度(6.25、12.5、25、50、100  $\mu$ mol/mL)给药组,每组 6 个复孔。待细胞贴壁后,对照组和模型组加入不含药物的培养基,给药组加入相应药物,孵育 1 h 后,模型组和给药组加入 LPS (400 ng/mL),继续孵育 24 h。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,37 °C 培养 3 h 后,在 450 nm 处测定吸光度(A)值。

### 2.7.2 NO 含量的测定

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L。设置对照组、模型组和给药组,每组 6 个复孔。待细胞贴壁后,对照组和模型组加入不含药物的培养基,给药组加入相应药物(10  $\mu$ mol/mL),孵育 1 h 后,模型组和给药组加入 LPS (400 ng/mL),继续孵育 24 h,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书检测 NO 含量。

## 2.8 分子对接

选取解热抗炎关键靶点 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4),从 UniProt 中获取 TLR4 的氨基酸序列(代码: O00206, PDB ID: 2Z65),并利用 Alpha-Fold 和 MOE 建立了指认成分与分离所得化合物与 TLR4 的 3D 分子对接模型。在能量最小化后,使用 MOE 中的 SiteFinder 模块预测 TLR4 上小

分子的潜在结合位点,并使用 MOE 中的 DOCK 模块进行分子对接计算。在分子对接计算后,选择最有利的对接结果,进一步分析化合物与 TLR4 的结合模式。

## 2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 含羞草根水提物的成分指认

通过 HPLC 法将对照品与供试品进一步比对,HPLC 图谱见图 1。

### 3.2 含羞草根水提物对干酵母致热大鼠体温的影响

如图 2 所示,模型组在造模 5 h 后体温显著升高( $P < 0.01$ ),表明本研究成功复制干酵母致大鼠发热模型;与模型组比较,含羞草根水提物高剂量组直肠温度显著降低( $P < 0.01$ 、0.001),并且能在各个时段延缓大鼠体温升高,表明含羞草根水提物可在一定程度上抑制大鼠发热。

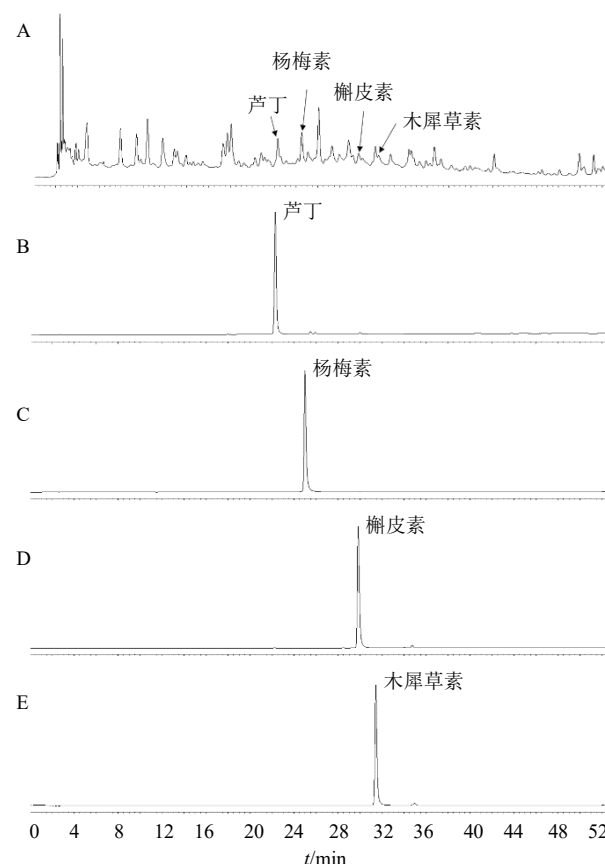
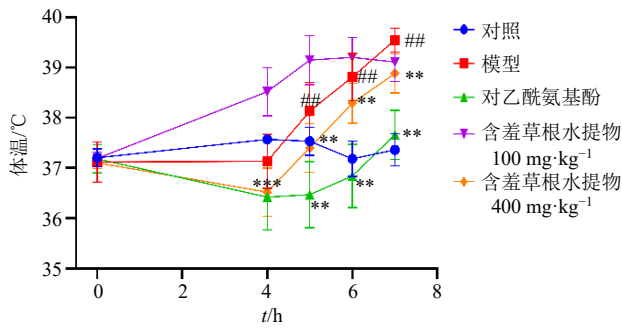


图 1 含羞草根水提物 (A) 及对照品 (B~E) HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC chromatogram of water extract of root of *M. pudica* (A) and standard compounds (B~E)



与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01, 图3、10同。  
##*P*<0.01 vs control group; \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 vs model group, same as Figs. 3, 10.

图2 各组大鼠体温变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Changes in body temperature of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.3 含羞草根水提物对干酵母致热大鼠血清中炎症因子和下丘脑 PGE<sub>2</sub>、cAMP、5-HT 水平的影响

如图3所示,在注射干酵母混悬液后,大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和下丘脑 PGE<sub>2</sub>、cAMP、5-HT 水平显著升高 (*P*<0.01);与模型组比较,各给药组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和下丘脑 PGE<sub>2</sub>、cAMP、5-HT 水平均显著降低 (*P*<0.01)。

### 3.4 代谢组学分析

对对照组、模型组和含羞草根水提物低、高剂量组大鼠血清、下丘脑样本进行正、负离子全扫描,得到各组总离子流图(图4、5)。对照组、模型组、含羞草根水提物低、高剂量组大鼠代谢的多元统计分析见图6、7,由PCA可知,模型组大鼠与对照组大鼠代谢谱完全分离,表明造模成功。在PCA得分图中,QC样本离散程度较低,正、负离子模式下

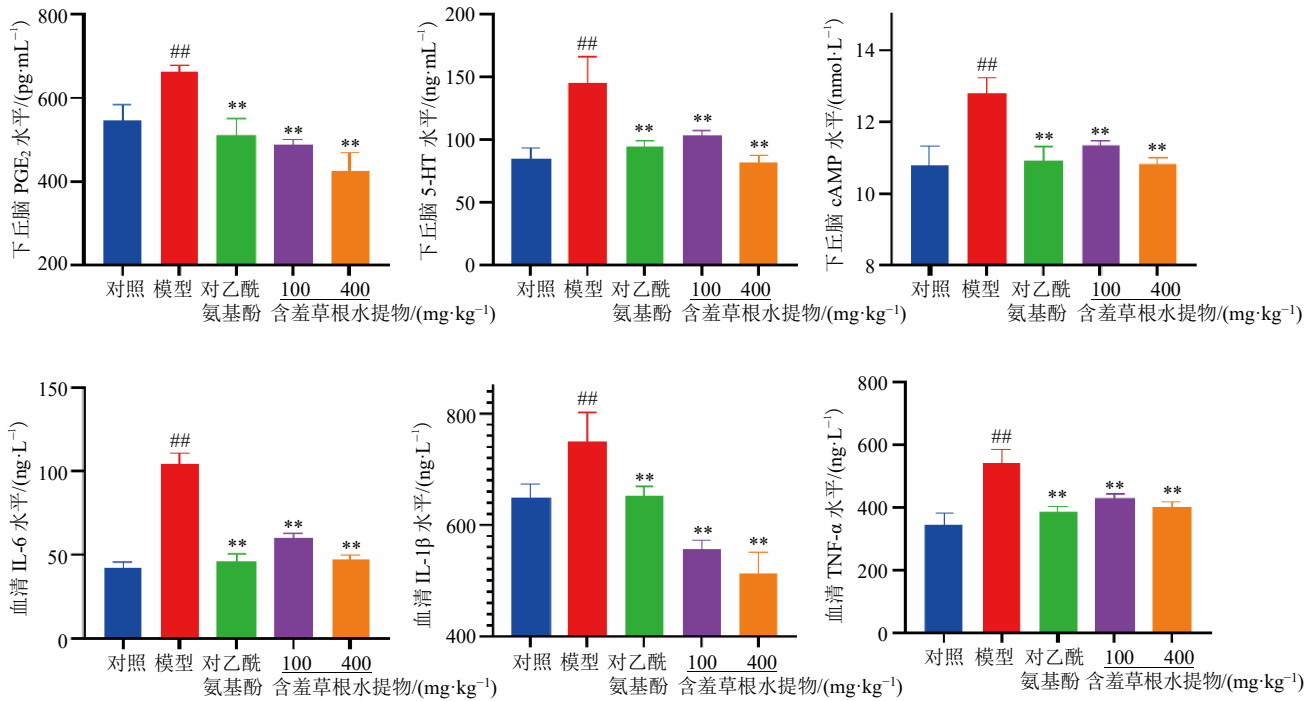


图3 各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和下丘脑 PGE<sub>2</sub>、cAMP、5-HT 的水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in serum and PGE<sub>2</sub>, cAMP, 5-HT in hypothalamus of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

均聚集在一起,表明仪器稳定性良好,数据可信。含羞草根水提物给药组与模型组完全分离,表明经给药后,含羞草根水提物给药组大鼠代谢发生显著变化。与含羞草根水提物低剂量组相比,含羞草根水提物高剂量组与模型组的离散程度较高,表明含羞草根水提物高剂量组的代谢谱发生了显著变化,初步证明了含羞草根可以调节发热大鼠的下丘脑及血清代谢异常。进一步对正、负离子模式下下丘

脑及血清代谢谱进行有监督的 OPLS-DA,得到相应的 OPLS-DA 得分图,如图6-B、7-B所示,正、负离子模式下各组 *R*<sup>2</sup>、*Q*<sup>2</sup> 值如表1所示,结果表明对照组与模型组、模型组与含羞草根水提物高剂量组样本间区分显著,呈现出良好的分类效果。OPLS-DA 模型的置换检验结果如图6-C、7-C所示,经200次置换检验后,*Q*<sup>2</sup> 值均小于0,表明构建的 OPLS-DA 模型未过拟合,是有效模型。

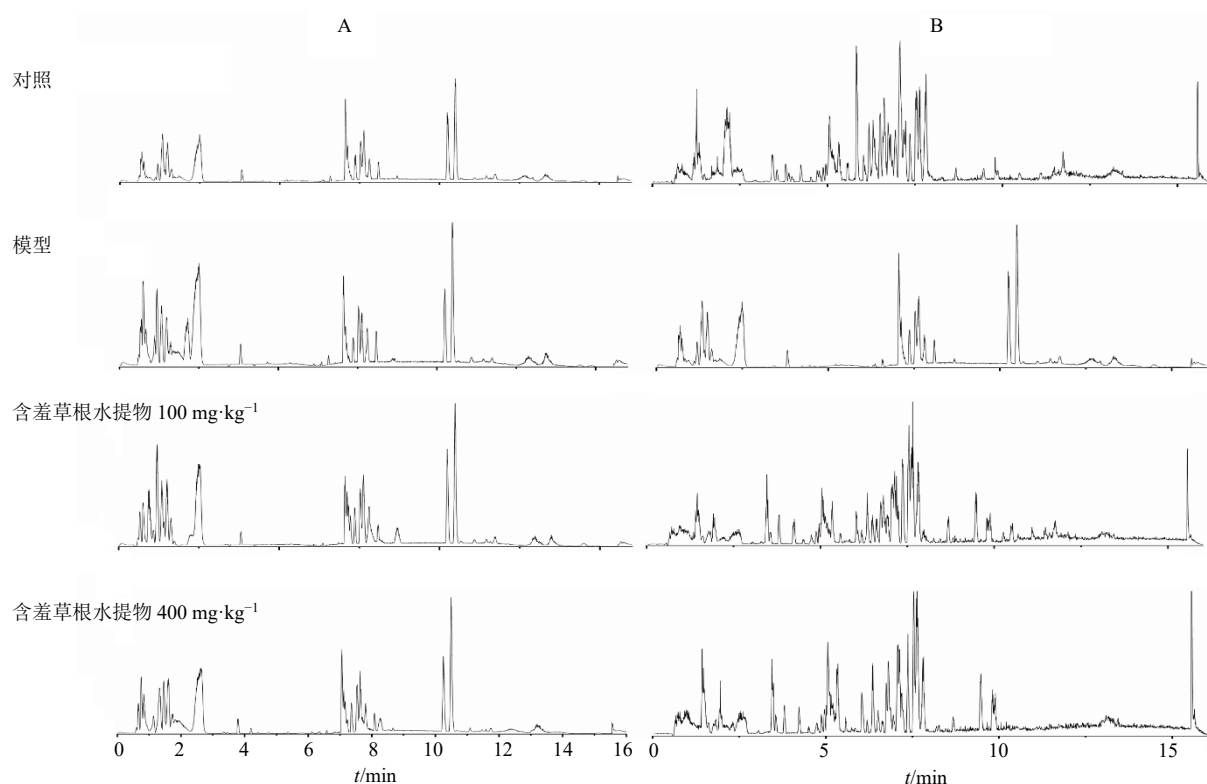


图 4 正 (A)、负离子 (B) 模式下各组下丘脑样本总离子流图

Fig. 4 Total ion flow chromatograms of hypothalamic samples in each group in positive (A) and negative (B) ion modes

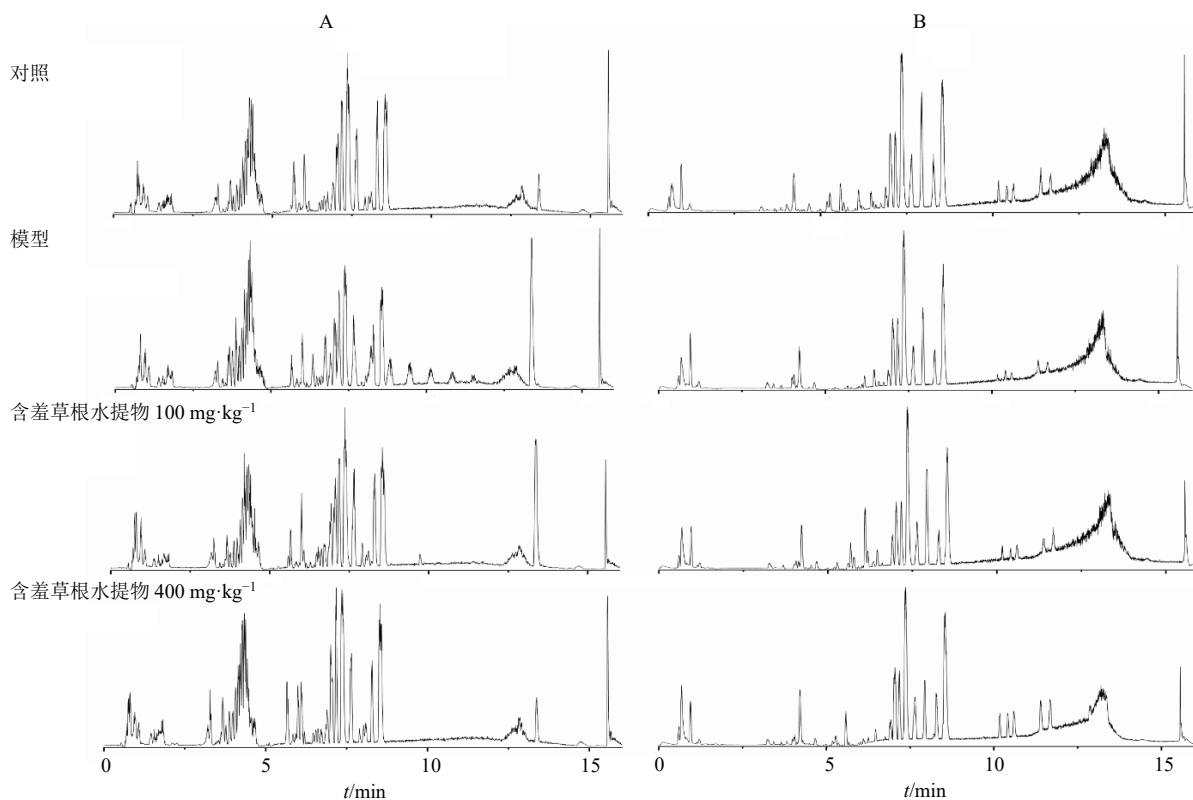
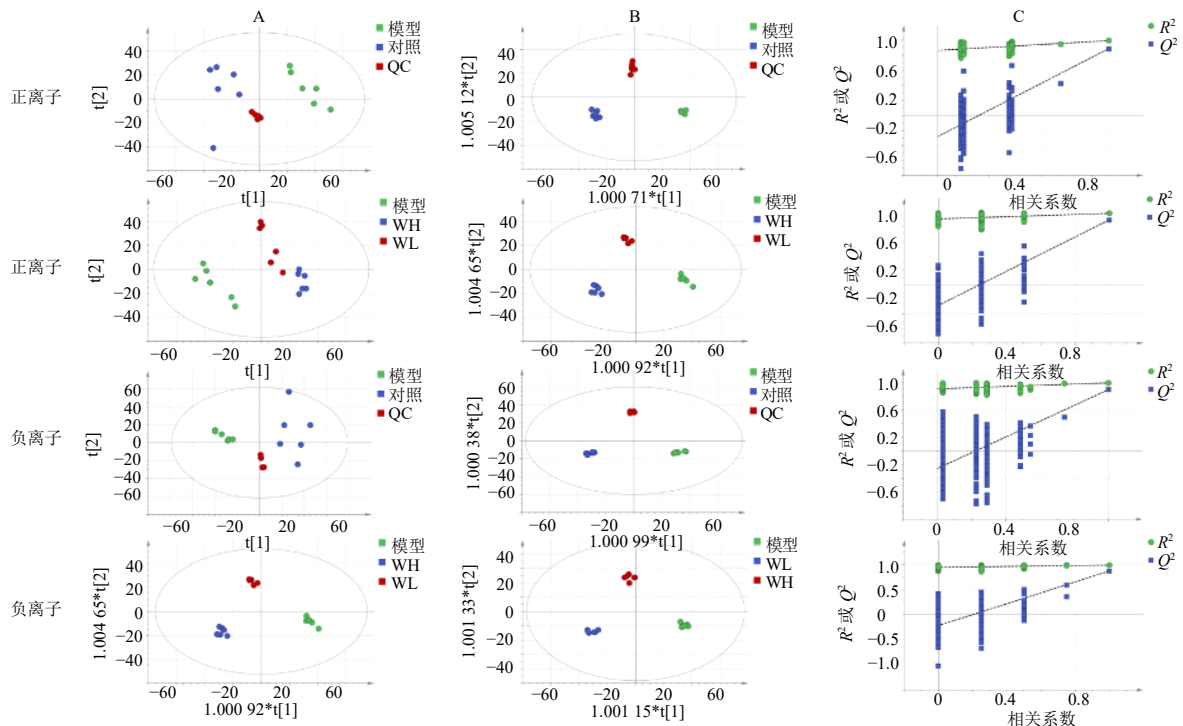


图 5 正 (A)、负离子 (B) 模式下各组血清样本总离子流图

Fig. 5 Total ion flow chromatograms of serum samples in each group in positive (A) and negative (B) ion modes



A-正、负离子模式下PCA得分图; B-正、负离子模式下的OPLS-DA得分图; C-正、负离子模式下的OPLS-DA模型置换检验图, WH-含葶草根水提物高剂量组, WL-含葶草根水提物低剂量组, 图7同。

A-PCA score chart in positive and negative ion modes; B-OPLS-DA score chart in positive and negative ion modes; C-displacement test diagram of OPLS-DA model in positive and negative ion modes, WH-water extract of root of *M. pudica* high-dose group, WL-water extract of root of *M. pudica* low-dose group, same as Fig. 7.

图6 各组下丘脑样本代谢分析

Fig. 6 Metabolic analysis of hypothalamic samples in each group

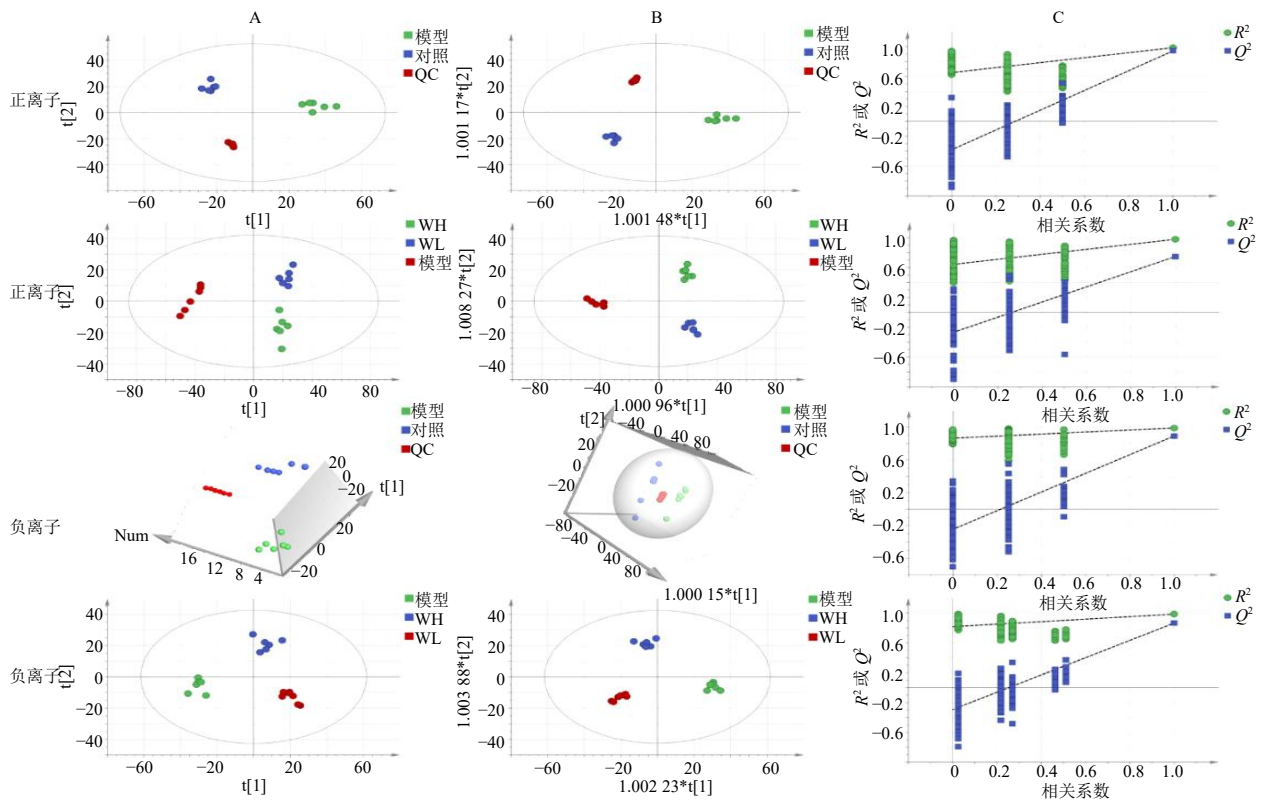


图7 各组血清样本代谢分析

Fig. 7 Metabolic analysis of serum samples in each group



表1 OPLS-DA模型的拟合数据  
Table 1 Fitting parameters of OPLS-DA model

| 模式  | 组别                 | 下丘脑     |         |       | 血清      |         |       |
|-----|--------------------|---------|---------|-------|---------|---------|-------|
|     |                    | $R^2_X$ | $R^2_Y$ | $Q^2$ | $R^2_X$ | $R^2_Y$ | $Q^2$ |
| 正离子 | 对照组 vs 模型组         | 0.389   | 0.988   | 0.802 | 0.411   | 0.989   | 0.929 |
|     | 模型组 vs 含羞草根水提物高剂量组 | 0.412   | 0.985   | 0.810 | 0.406   | 0.978   | 0.823 |
| 负离子 | 对照组 vs 模型组         | 0.404   | 0.952   | 0.704 | 0.457   | 0.994   | 0.917 |
|     | 模型组 vs 含羞草根水提物高剂量组 | 0.489   | 0.992   | 0.798 | 0.271   | 0.983   | 0.768 |

3.5 差异代谢物鉴定及筛选

根据多元统计结果,分别筛选下丘脑及血清样本中  $P < 0.05$  且  $VIP > 1$  的变量作为潜在的生物标志物,进一步结合 HMDB 数据库比对血清及下丘脑代谢物的质荷比、二级碎片离子及保留时间,进而鉴定对照组 vs 模型组、模型组 vs 给药组之间变

化显著的内源性代谢差异物,结果见表 2、3。从大鼠血清及下丘脑中分别鉴定出 16、34 个潜在的生物标志物,经含羞草根水提物干预后,发热大鼠血清及下丘脑生物标志物均被显著逆转,提示这些潜在的生物标志物对阐明含羞草根水煎液的解热作用机制具有重要的生物功能。

表2 含羞草根水提物高剂量组大鼠下丘脑中的内源性潜在生物标志物

Table 2 Endogenous potential biomarkers in hypothalamus of rats in water extract of root of *M. pudica* high-dose group

| 序号 | 代谢物                  | 分子式   | $t_R/min$ | $m/z$      | 离子模式 | 对照组 vs 模型组 | 模型组 vs 含羞草根水提物高剂量组 |
|----|----------------------|---|-----------|------------|------|------------|--------------------|
| 1  | 黄嘌呤                  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>   | 3.410     | 284.075 86 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 2  | 色胺                   | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>                  | 4.577     | 160.100 14 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 3  | 吡哆醇                  | C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                  | 3.865     | 169.073 88 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 4  | 嘌呤                   | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>                    | 1.608     | 120.043 65 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 5  | 棕榈酰乙醇酰胺              | C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>                 | 9.483     | 299.282 46 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 6  | N-乙酰-L-蛋氨酸           | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S                | 4.471     | 191.061 61 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 7  | N <sub>4</sub> -乙酰胞苷 | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>   | 3.677     | 285.096 06 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 8  | L-焦谷氨酸               | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                   | 0.673     | 129.042 46 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 9  | L-苯丙氨酸               | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                  | 3.446     | 165.078 91 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 10 | 次黄嘌呤                 | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O                  | 0.954     | 136.038 35 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 11 | 组胺                   | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>                    | 0.567     | 111.079 47 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 12 | 盐酸非索非那定              | C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>4</sub>                 | 7.215     | 501.285 41 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 13 | DL-色氨酸               | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | 4.247     | 204.089 97 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 14 | 胞嘧啶                  | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O                  | 0.768     | 111.043 20 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 15 | 肌酸酐                  | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O                  | 10.271    | 113.058 82 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 16 | 皮质甾酮                 | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                  | 6.132     | 346.214 43 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 17 | 胆碱                   | C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO                               | 0.807     | 103.099 56 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 18 | 乙醯左旋肉碱               | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>                  | 1.207     | 203.115 69 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 19 | 5-氨基-4-咪唑羧酸          | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>     | 1.505     | 127.038 30 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 20 | 4-羟基苯甲醛              | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>                    | 1.686     | 122.036 77 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 21 | 3-氨基-3-(4-羟基苯基)丙酸    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                  | 2.946     | 181.073 82 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 22 | 1-甲基腺嘌呤              | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub>                    | 3.577     | 149.070 16 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 23 | 尿嘧啶                  | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | 0.892     | 112.026 10 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 24 | DL-β-亮氨酸             | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                  | 2.011     | 131.093 18 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 25 | 2'-脱氧次黄苷             | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>   | 3.160     | 252.084 29 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 26 | 2'-脱氧鸟苷-5'-单磷酸       | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | 0.826     | 347.061 41 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 27 | 熊去氧胆酸                | C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>                  | 6.485     | 408.284 99 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 28 | 尿苷                   | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>    | 1.785     | 244.068 02 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 29 | 组氨酸                  | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>     | 0.702     | 155.067 79 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 30 | 左旋多巴                 | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>                  | 1.834     | 197.067 24 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 31 | 反丁烯二酸                | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>                    | 0.824     | 116.009 26 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 32 | 3-吡啶硫酸盐              | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> S                 | 4.808     | 213.007 90 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 33 | 2-甲基戊二酸              | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>                   | 2.688     | 146.056 43 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 34 | 2-巯基苯并噻唑             | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NS <sub>2</sub>                   | 6.096     | 166.984 65 | 负离子  | ↑          | ↓                  |

↑表示上调, ↓表示下调, 表3同。

↑ indicates up-regulated, ↓ indicates down-regulated, same as table 3.

表3 含羞草根水提物高剂量组大鼠血清中的内源性潜在生物标志物

Table 3 Endogenous potential biomarkers in serum of rats in water extract of root of *M. pudica* high-dose group

| 序号 | 代谢物                   | 分子式   | $t_R$ /min | $m/z$      | 离子模式 | 对照组 vs 模型组 | 模型组 vs 含羞草根水提物高剂量组 |
|----|-----------------------|---|------------|------------|------|------------|--------------------|
| 1  | $\beta$ -鼠胆酸          | C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>                | 6.099      | 454.290 04 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 2  | 二十四烷酸                 | C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>                | 15.277     | 368.363 42 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 3  | 甘胆酸                   | C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>6</sub>               | 5.575      | 465.306 12 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 4  | 十二烷基硫酸                | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S              | 10.036     | 266.153 56 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 5  | D-(+)-苹果酸             | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                  | 0.780      | 134.019 97 | 负离子  | ↓          | ↑                  |
| 6  | D-(-)-谷氨酰胺            | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | 0.659      | 146.067 52 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 7  | 皮质甾酮                  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                | 5.669      | 392.217 29 | 负离子  | ↑          | ↓                  |
| 8  | 尿酸                    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | 0.967      | 168.028 31 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 9  | 茄碱                    | C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>              | 4.542      | 867.504 12 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 10 | PPG n9                | C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O <sub>10</sub>               | 6.311      | 557.414 32 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 11 | PPG n7                | C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>                | 5.674      | 441.330 40 | 正离子  | ↑          | ↓                  |
| 12 | L-苯丙氨酸                | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | 3.293      | 165.079 06 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 13 | 水解伏马菌素 B <sub>1</sub> | C <sub>22</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>5</sub>               | 5.732      | 405.345 70 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 14 | 马尿酸                   | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>                 | 4.151      | 179.058 32 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 15 | 盐酸非索非那定               | C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>4</sub>               | 7.024      | 501.285 99 | 正离子  | ↓          | ↑                  |
| 16 | D-(+)-色氨酸             | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 4.281      | 204.088 15 | 负离子  | ↑          | ↓                  |

### 3.6 代谢通路富集分析

将鉴定得到的大鼠下丘脑及血清中潜在的生物标志物导入 MetaboAnalyst 6.0 进行代谢通路富集分析, 结果如图 8 所示。分别从下丘脑及血清中富集得到 9、5 条代谢通路, 主要涉及氨基酸代谢和嘌呤

代谢。此外, 下丘脑代谢还涉及嘧啶代谢、柠檬酸循环、维生素 B<sub>6</sub> 代谢等途径, 血清代谢涉及初级胆汁酸生物合成、类固醇激素生物合成等途径。表明含羞草根水提物可以通过回调上述通路发挥解热作用。

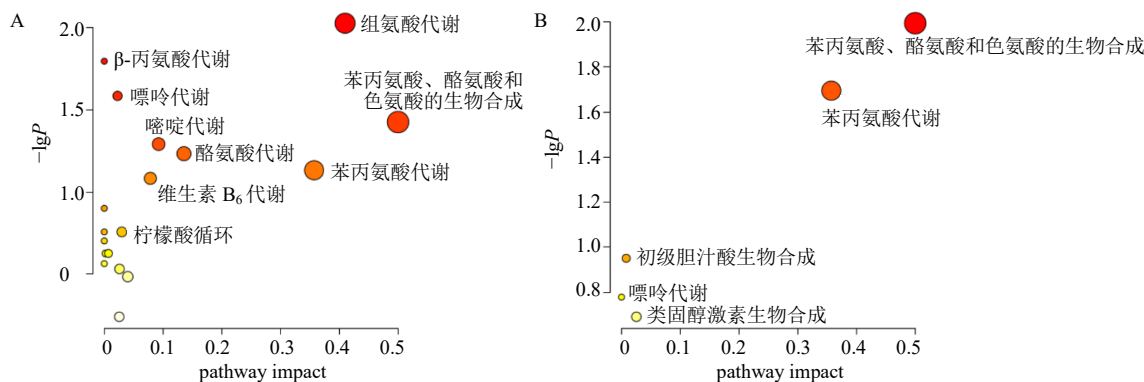


图8 含羞草根水提物对发热大鼠模型下丘脑 (A) 和血清 (B) 的差异代谢通路分析

Fig. 8 Differential metabolic pathway analysis of water extract of root of *M. pudica* on hypothalamus (A) and serum (B) in fever rat model

### 3.7 化合物结构鉴定

化合物 1: 白色结晶 (二氯甲烷), 易溶于氯仿、二氯甲烷, 难溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 365.312 3 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>54</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.81 (6H, t,  $J$  = 6.55 Hz, H-1, 26), 1.18 (54H, m, H-2~25)。<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 13.1 (C-1, 26), 21.7 (C-2, 25), 30.9 (C-3), 28.6 (C-4, 23), 28.7 (C-5~21)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[11]</sup>, 故鉴定化合物 1 为二十六烷。

化合物 2: 白色结晶 (二氯甲烷), 易溶于氯仿、二氯甲烷, 难溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 269.147 6 [M-H]<sup>-</sup>, 分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 0.81 (3H, t,  $J$  = 6.55 Hz, H-17), 1.18 (26H, m, H-4~16), 1.56 (2H, m, H-3), 2.27 (2H, t,  $J$  = 7.66 Hz, H-2)。<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 179.6 (C-1), 33.1 (C-2), 30.9 (C-3), 28-29 (C-4~16), 13.1 (C-17)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[12]</sup>, 故鉴定化合物 2 为十七烷酸。

化合物 **3**: 白色无定型粉末, 易溶于氯仿、二氯甲烷, 难溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 469.321 6  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{29}H_{58}O_4$ 。 $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3-d_6$ )  $\delta$ : 3.81 (1H, m, H-1a), 4.14 (1H, m, H-1b), 4.06 (1H, m, H-2), 3.54 (2H, dd,  $J = 3.44, 5.23$  Hz, H-3), 1.18 (2H, m, H-2'), 1.28 (46H, m, H-3'~26'), 0.89 (3H, t,  $J = 6.40$  Hz, H-27')。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CDCl_3-d_6$ )  $\delta$ : 69.8 (C-1), 65.1 (C-2), 62.7 (C-3), 174.1 (C-1'), 33.6 (C-2'), 24.6 (C-3'), 28.8~29.4 (C-4'~24'), 22.3 (C-25'), 31.7 (C-26'), 13.0 (C-27')。以上数据与文献报道基本一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物 **3** 为(2*S*)-1-*O*-三十七烷酰基甘油。

化合物 **4**: 淡黄色无定型粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 195.051 7  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_{10}H_{12}O_4$ 。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 6.62 (1H, d,  $J = 1.89$  Hz, H-2), 6.65 (1H, d,  $J = 8.00$  Hz, H-5), 6.50 (1H, dd,  $J = 1.82, 8.03$  Hz, H-6), 2.55 (2H, t,  $J = 7.55$  Hz, H-7), 2.75 (2H, t,  $J = 7.55$  Hz, H-8), 3.63 (1H, brs)。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 132.1 (C-1), 115.0 (C-2), 143.3 (C-3), 144.8 (C-4), 115.0 (C-5), 119.1 (C-6), 35.6 (C-7), 30.0 (C-8), 174.0 (C-9), 56.0 (C-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为二氢咖啡酸甲酯。

化合物 **5**: 白色粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 167.031 7  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_8H_8O_4$ 。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 7.39 (1H, d,  $J = 1.72$  Hz, H-2), 6.83 (1H, d,  $J = 8.16$  Hz, H-5), 7.37 (1H, dd,  $J = 1.72, 8.16$  Hz, H-6), 4.79 (2H, overlap, H-8)。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 122.6 (C-1), 114.4 (C-2), 144.6 (C-3), 150.1 (C-4), 116.4 (C-5), 121.7 (C-6), 197.2 (C-7), 64.4 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为3,4-二羟基苯酰甲醇。

化合物 **6**: 白色粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 153.026 9  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_7H_6O_4$ 。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 7.47 (1H, d,  $J = 1.72$  Hz, H-2), 6.82 (1H, d,  $J = 8.16$  Hz, H-5), 7.45 (1H, dd,  $J = 1.72, 8.16$  Hz, H-6)。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 122.6 (C-1), 114.4 (C-2), 144.6 (C-3), 150.1 (C-4), 116.4 (C-5), 121.7 (C-6), 168.9 (C-7)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为原儿茶酸。

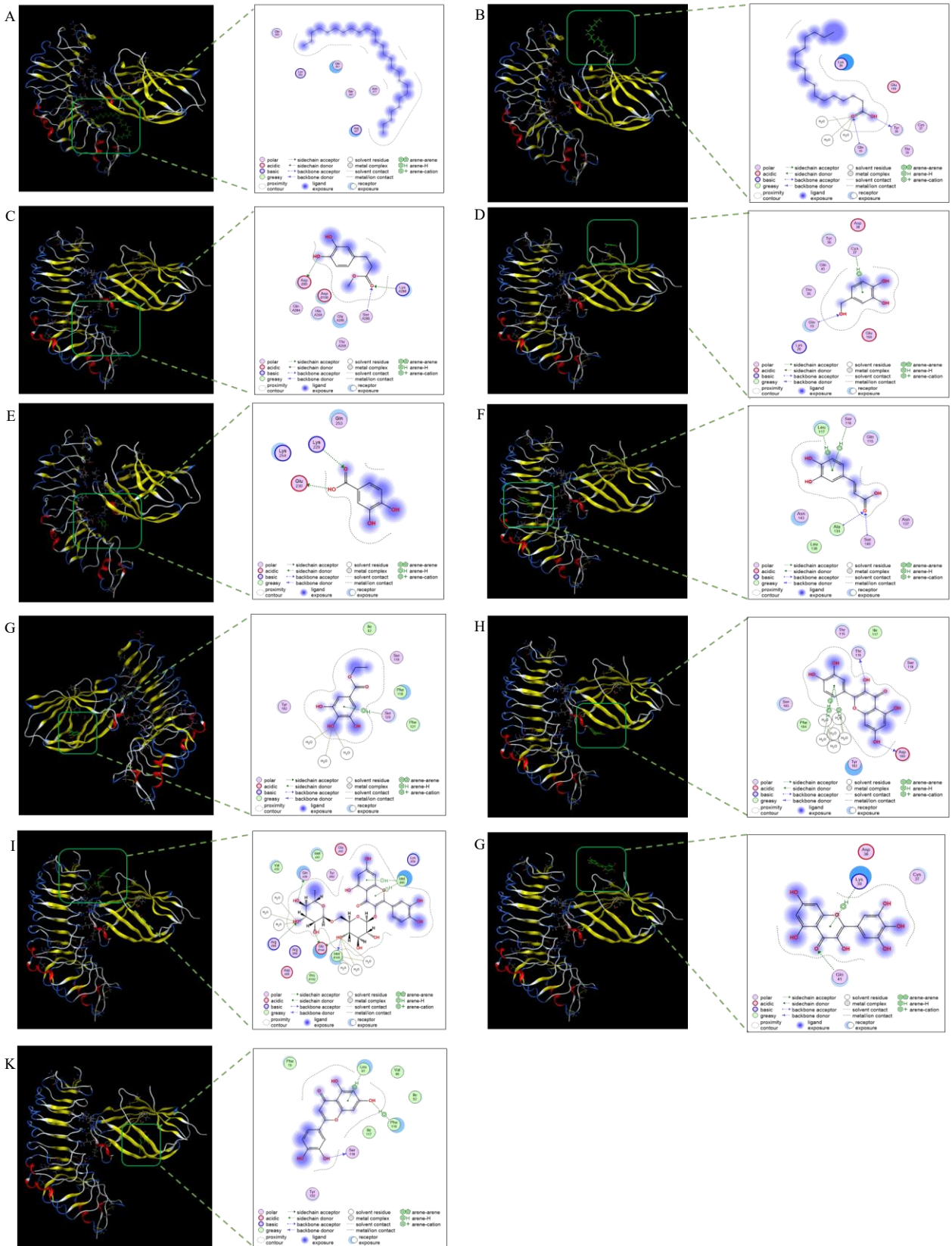
化合物 **7**: 黄色无定型粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 179.032 6  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_9H_8O_4$ 。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 7.04 (1H, d,  $J = 1.57$  Hz, H-2), 6.79 (1H, d,  $J = 8.00$  Hz, H-5), 6.94 (1H, dd,

$J = 1.56, 8.00$  Hz, H-6), 7.54 (1H, d,  $J = 15.88$  Hz, H-7), 6.23 (1H, d,  $J = 15.82$  Hz, H-8)。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 126.5 (C-1), 114.2 (C-2), 145.4 (C-3), 148.0 (C-4), 115.1 (C-5), 121.5 (C-6), 145.7 (C-7), 115.1 (C-8), 169.6 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **7** 为咖啡酸。

化合物 **8**: 白色无定型粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS  $m/z$ : 179.032 6  $[M-H]^-$ , 分子式为  $C_9H_8O_4$ 。  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 7.04 (1H, d,  $J = 1.57$  Hz, H-2), 6.79 (1H, d,  $J = 8.00$  Hz, H-5), 6.94 (1H, dd,  $J = 1.56, 8.00$  Hz, H-6), 7.54 (1H, d,  $J = 15.88$  Hz, H-7), 6.23 (1H, d,  $J = 15.82$  Hz, H-8)。  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CD_3OD-d_6$ )  $\delta$ : 126.5 (C-1), 114.2 (C-2), 145.4 (C-3), 148.0 (C-4), 115.1 (C-5), 121.5 (C-6), 145.7 (C-7), 115.1 (C-8), 169.6 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化合物 **8** 为没食子酸乙酯。

### 3.8 分子对接结果

如图9所示, 化合物 **1** 与 TLR4 无法进一步结合, 因其结构缺乏苯环、羟基等易结合的基团。化合物 **2** 与 TLR4 的 36 位酪氨酸和 19 位的谷氨酰胺上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。化合物 **4** 与 TLR4 的 B99 位天冬氨酸、A286 位的丝氨酸和 A288 位的赖氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。化合物 **5** 与 TLR4 的 37 位半胱氨酸和 19 位的谷氨酰胺上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。化合物 **6** 与 TLR4 的 229 位赖氨酸和 230 位的谷氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。化合物 **7** 与 TLR4 的 117 位亮氨酸、140 位和 116 位的丝氨酸、139 位的丙氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。化合物 **8** 与 TLR4 的 116 位的丝氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。槲皮素与 TLR4 的 116 位苏氨酸、100 位和天冬氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用, 且其 B 环上的氢原子与 TLR4 存在 3 处非共价相互作用。芦丁 A、C 环上的氢原子与 TLR4 的 B40 位的甲硫氨酸存在 2 处非共价相互作用, 其糖分子与 TLR4 的 B145 位的甲硫氨酸、B144 位的 Glu、B69 位的精氨酸和 A39 位的谷氨酰胺上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。杨梅素 C 环上的氢原子与 TLR4 的 39 位的赖氨酸存在 1 处非共价相互作用, 与 41 位谷氨酰胺上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。木犀草素与 TLR4 的 61 位亮氨酸、119 位苯丙氨酸和 118 位丝氨酸上的氨基酸残基存在潜在的相互作用。



A~K 分别为化合物 1、2、4~8, 槲皮素、芦丁、杨梅素、木犀草素。

A~K are compounds 1, 2, 4~8, quercetin, rutin, myricetin and luteolin, respectively.

图 9 含羞草根部分化学成分与解热关键靶点 TLR4 分子对接的结果

Fig. 9 Molecular docking results of chemical constituents from root of *M. pudica* with key antipyretic target TLR4

### 3.9 化合物体外抗炎活性

采用 CCK-8 法测定化合物 1~8 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞存活率的影响,发现 8 个化合物浓度在 40  $\mu\text{mol/mL}$  以下时,细胞存活率均高于 90%。如图 10 所示,在终浓度为 10  $\mu\text{mol/mL}$  时,化合物 1~8 均可显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 的释放 ( $P < 0.01$ ),提示这些有机酸类化合物具有一定的抗炎活性。

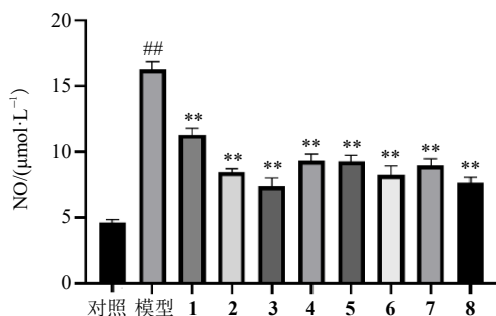


图 10 化合物 1~8 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Effect of compounds 1—8 on NO release in LPS-induced RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 4 讨论

含羞草属植物在世界分布广泛<sup>[4]</sup>,共有 400 余种。在我国品种主要为含羞草 *M. pudica* L.,广泛分布于我国华南地区,尤其是海南。含羞草化学成分主要包括黄酮类、甾体类、糖苷类、萜类、生物碱类、有机酸类、苯丙素类、氨基酸类、挥发油类、含金属化合物等,文献报道有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗蛇毒、抗氧化、镇痛、保护生殖系统、降血糖、利尿、抗惊厥、抗疟等多种药理作用。在《广东省中药材标准第三册》中记载,含羞草可以治疗感冒、小儿高热。为了进一步探究其作用机制以及扩大药用资源,本研究选择含羞草根水提物为研究对象,探索其解热作用及作用机制。

发烧是最常见的临床表现之一,通常既是主要症状,也是各种疾病的并发症,包括白血病和肺炎等<sup>[19-20]</sup>。发热经常出现在与许多疾病相关的感染或炎症反应中<sup>[21]</sup>。暴露于致病性刺激后,宿主生物释放大量内源性热原,这些热原作用于下丘脑-大脑的体温调节中心,从而提高身体的设定点温度并诱发发烧<sup>[22]</sup>。LPS 和干酵母诱导的大鼠发热模型由于模拟了由致病菌引起的人类感染,在动物发热模型中被广泛使用<sup>[23]</sup>。另一种常用的模型是 2,4-二硝基苯

酚诱导的大鼠发热模型,在抑制磷酸化的同时触发细胞氧化过程<sup>[17]</sup>,氧化产生的能量转化为三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 或磷酸肌酸,导致其储存为热量,从而引起发烧<sup>[24]</sup>。在发热模型中,机体通常会释放炎症介质和体温调节分子,包括 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub>、cAMP 和环氧化酶 2<sup>[25-26]</sup>。这些介质是评价药物解热疗效的关键生物标志物。

为进一步探究其作用机制,本研究通过 UPLC-Orbitrap-MS 技术对血清和下丘脑代谢组学进行研究。血清和下丘脑样本的 PCA 得分图显示对照组、模型组、含羞草根水提物低剂量组和含羞草根水提物高剂量组之间显著分离,为含羞草根解热作用提供了进一步的证据。代谢物鉴定结果显示,给予含羞草根水提物干预后,代谢谱呈现出显著的回调趋势,进一步支持了含羞草根水提物的解热疗效。在本研究中,氨基酸代谢被确定为水提物发挥解热作用最关键的代谢途径,主要的代谢物包括色胺、吡哆醇、L-吡咯氨酸和 L-苯丙氨酸。色胺可通过酶促反应转化为 5-HT,5-HT 是一种参与体温调节的神经递质<sup>[27-28]</sup>。在发热过程中,5-HT 水平升高。本研究发现,含羞草根水提物显著降低了下丘脑中 5-HT 水平,从而调节了 5-HT 的合成。吡哆醇是活性辅酶磷酸吡哆醛的前体,在氨基酸代谢中发挥关键作用,并且对包括 5-HT 在内的神经递质的合成和调节至关重要<sup>[29-30]</sup>。此外,氨基酸代谢与抗炎和免疫功能密切相关,如 D-(+)-色氨酸通过犬尿氨酸途径调节免疫耐受性,增强调节性 T 细胞的功能,并缓解过度的炎症反应<sup>[31]</sup>。这些结果与 ELISA 检测结果一致。表明含羞草根水提物可以通过调控氨基酸代谢,从而发挥解热和免疫调节作用。

cAMP 由腺苷酸环化酶催化 ATP 合成。已有证据表明,cAMP 作为一种重要的次级信使,在免疫调节中发挥重要作用。研究显示,免疫细胞(如巨噬细胞和 T 细胞)中 cAMP 水平的升高可抑制包括 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在内的促炎性细胞因子的生成。此外,cAMP 水平的下降能够抑制下丘脑中 PGE<sub>2</sub> 的合成,从而缓解发热反应<sup>[32-33]</sup>。作为细胞能量代谢的核心通路,柠檬酸循环对于 ATP 的生成和代谢产物的合成至关重要,这两者在解热过程中不可或缺。在发热状态下,免疫细胞的代谢需求增加,柠檬酸循环通过提供能量和关键中间代谢物,支持免疫细胞的增殖和活性<sup>[34-35]</sup>。这些发现突出了能量代谢在发热调控中的关键作用,并表明其作为治疗靶

点的潜力。

现有研究表明有机酸类化合物一直是解热的潜在分子,如水杨酸、阿司匹林等临床经典解热有机酸类分子<sup>[36]</sup>。本研究通过经典化学分离方法,从石油醚组分和醋酸乙酯组分得到了8个有机酸类成分,化合物1~8均具有显著的抗炎活性,分子对接结果显示有机酸类化学成分与解热抗炎关键靶点TLR4有一定的亲和力,表明这些化合物可能是含羞草根发挥解热作用的药效物质。此外,分子对接结果显示黄酮类成分与TLR4有着高度的亲和性,且相互作用的形式较多,如分子间作用力、氢键等,表明这些化合物可能通过TLR4信号通路发挥解热作用。

综上,本研究发现含羞草根水提物对于酵母导致的发热大鼠具有显著的解热效果,基于代谢组学研究发现含羞草根水提物主要通过调节氨基酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、柠檬酸循环、维生素B<sub>6</sub>代谢、初级胆汁酸生物合成、类固醇激素生物合成等途径,发挥解热作用,表明含羞草根解热具有多靶点、多通路协同发挥作用的特点。通过柱色谱分离与鉴定结合体外实验、分子对接,表明有机酸类化合物和黄酮类化合物可能是含羞草根解热的物质基础之一。本研究首次探索了含羞草根的解热作用机制及药效物质,为发掘、利用其解热作用提供了重要的实验依据,同时为扩大药用资源及合理化应用提供一定的指导意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] 李彪,孙延平,史丛晶,等.含羞草属植物研究进展[J].中药材,2023,46(12):3153-3162.

[2] 吴洋博,巩江,倪士峰,等.含羞草药理学研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(15):7874-7875.

[3] 广东省药品监督管理局.广东省中药材标准.第三册[M].广州:广东科技出版社,2018:278.

[4] Rizwan K, Majeed I, Bilal M, et al. Phytochemistry and diverse pharmacology of genus *Mimosa*: A review [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1): 83.

[5] 邓婉柔,李慧敏,曾元宁,等.含羞草根乙酸乙酯部位对急性髓系白血病小鼠的影响[J].中国药房,2024,35(11):1315-1319.

[6] 吴运宝,方燕婷,廖红珠,等.黄芪建中汤治疗急性白血病化疗后骨髓抑制伴发热的经验分享[J].基层中医药,2024,3(8):15-19.

[7] 谢枫云,胡文婷,周芬,等.急性白血病患者化疗后中

性粒细胞缺乏伴发热的现状及影响因素分析[J].军事护理,2024,41(6):31-34.

[8] 苏发智,白晨曦,张文森,等.牛胆汁的解热作用及作用机制研究[J].中草药,2024,55(10):3363-3374.

[9] 吴迪,王清,张殿文,等.黄芩苷对干酵母致热大鼠的解热作用及血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、PGE<sub>2</sub>、cAMP和脑组织NF- $\kappa$ B表达的影响[J].中国中医药科技,2024,31(1):37-41.

[10] 立新,奥·乌力吉,那仁满都拉.基于血浆代谢组学的蒙药三臣小儿退热贴膏解热作用机制研究[J].中草药,2021,52(18):5581-5588.

[11] 叶凤梅,谢阳国,朱燕,等.贡山八角枝叶化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(4):604-608.

[12] 陈俊崑.毛叶猪腰豆的化学成分研究[D].长沙:中南林业科技大学,2022.

[13] 冯芝瑛,马英雄,王红,等.波棱瓜茎藤化学成分研究[J].中国中药杂志,2020,45(11):2571-2577.

[14] Silva F A, Borges F, Guimarães C, et al. Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(6): 2122-2126.

[15] 赵爱华,赵勤实,李蓉涛,等.肾茶的化学成分[J].云南植物研究,2004,26(5):563-568.

[16] Zhang H, Fang W T, Li Y, et al. Chemical constituents from the aerial parts of *Rubia cordifolia* L. with their NO inhibitory activity [J]. *Nat Prod Res*, 2024, 38(5): 711-718.

[17] 张梦垚,邹吉斌,德吉,等.小花水柏枝的抗补体活性成分[J].中草药,2025,56(1):26-38.

[18] 陆彩侠,孔垂皓,唐旭,等.牡丹皮正丁醇部位化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2024,36(10):1714-1720.

[19] Zhang X, Wang Y, Li S J, et al. The potential antipyretic mechanism of *Gardeniae Fructus* and its heat-processed products with plasma metabolomics using rats with yeast-induced fever [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 491.

[20] 韩丽.建立体温调节模型过程中几个问题的分析[J].生物学教学,2022,47(11):92-93.

[21] Roth J, Blatteis C M. Mechanisms of fever production and Lysis: Lessons from experimental LPS fever [J]. *Compr Physiol*, 2014, 4(4): 1563-1604.

[22] Akindele A J, Ibe I F, Adeyemi O O. Analgesic and antipyretic activities of *Drymaria cordata* (Linn.) Willd (Caryophyllaceae) extract [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2011, 9(1): 25-35.

[23] Liu S M, Wang N, Chen P P, et al. Effect of Huanglianjiedu Tang on fever in rats induced by 2,4-dinitrophenol [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(4): 492-499.

- [24] Du L, Wang H L, Liu F, *et al.* NSP2 is important for highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus to trigger high fever-related COX-2-PGE2 pathway in pigs [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 657071.
- [25] Zakaria Z A, Ghani Z D F A, Nor R N, *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(2): 179-187.
- [26] Negri S, Commisso M, Avesani L, *et al.* The case of tryptamine and serotonin in plants: A mysterious precursor for an illustrious metabolite [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(15): 5336-5355.
- [27] Jauhar S, Cowen P J, Browning M. Fifty years on: Serotonin and depression [J]. *J Psychopharmacol*, 2023, 37(3): 237-241.
- [28] Baldo B A, Rose M A. The anaesthetist, opioid analgesic drugs, and serotonin toxicity: A mechanistic and clinical review [J]. *Br J Anaesth*, 2020, 124(1): 44-62.
- [29] Gray R, Moore Iii A, Berry F, *et al.* Serotonin syndrome after PACU administration of tramadol and meperidine [J]. *Turk J Anaesthesiol Reanim*, 2022, 50(4): 309-311.
- [30] Ding X Y, Bin P, Wu W W, *et al.* Tryptophan metabolism, regulatory T cells, and inflammatory bowel disease: A mini review [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 9706140.
- [31] Van N T, Zhang K R, Wigmore R M, *et al.* Dietary L-tryptophan consumption determines the number of colonic regulatory T cells and susceptibility to colitis via GPR15 [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 7363.
- [32] Wu M, Song G P, Li J N, *et al.* Innervation of nociceptor neurons in the spleen promotes germinal center responses and humoral immunity [J]. *Cell*, 2024, 187(12): 2935-2951.e19.
- [33] Tang G Y, Li S, Zhang C, *et al.* Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(9): 2749-2767.
- [34] Mao P T, Mai B, Mai X, *et al.* Antipyretic mechanism exploration of Huanglianshangqing Pill based on metabolomics and network pharmacology [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2022, 25(12): 2112-2125.
- [35] Xue Q, Liu H S, Zhu Z X, *et al.* African swine fever virus regulates host energy and amino acid metabolism to promote viral replication [J]. *J Virol*, 2022, 96(4): e0191921.
- [36] 彭育旋, 林乌甜. 解热镇痛药的合理应用和不良反应分析 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2020, 30(24): 193-194.

[责任编辑 李亚楠]