

# 维药神香草提取物体外抗炎作用的谱效关系研究<sup>Δ</sup>

毛艳<sup>1\*</sup>, 贺金华<sup>1#</sup>, 蔡晓翠<sup>1</sup>, 铁 偲<sup>2</sup>, 王新堂<sup>1</sup>(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.中国医学科学院北京协和医学院药物研究所/天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1364-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.18

**摘要** 目的:为阐明维药神香草抗炎作用的药效物质基础提供参考。方法:采用高效液相色谱法建立神香草8个不同极性提取物的指纹图谱;以巨噬细胞RAW264.7为研究对象,考察神香草不同极性提取物对细胞培养上清液中炎症因子一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素6(IL-6)的抑制作用,比较其体外抗炎活性的差异性;采用灰色关联分析法分析指纹图谱共有峰的峰面积与抗炎活性的谱-效关系。结果:神香草8个不同极性提取物的指纹图谱具有明显的差异。体外抗炎结果提示,神香草30%乙醇提取物对体外炎症因子的抑制作用最强。对其建立的HPLC指纹图谱有共有峰14个,与体外炎症因子的抑制作用关系密切的5个共有峰分别为8、6、5、10、13号,其中8号峰为迷迭香酸。结论:所建立的指纹图谱及其与体外抗炎活性的谱效关系可为该药材的药效物质基础研究提供一定参考。

**关键词** 神香草;不同极性提取物;抗炎活性;指纹图谱;谱效关系;炎症因子

## Study on the Spectrum-effect Relationship of Anti-inflammation Effect *in vitro* of Extracts from Uygur Medicine *Hyssopus cuspidatus*

MAO Yan<sup>1</sup>, HE Jinhua<sup>1</sup>, CAI Xiaocui<sup>1</sup>, TIE Cai<sup>2</sup>, WANG Xintang<sup>1</sup>(1.Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College / State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for clarifying the pharmacodynamic material basis of anti-inflammation effect of Uygur medicine *Hyssopus cuspidatus*. METHODS: HPLC was conducted to establish the fingerprint of 8 extracts with different polarities. Using macrophage RAW264.7 as object, the inhibitory effect of extracts with different polarities on inflammatory factor nitric oxide (NO), TNF- $\alpha$  and IL-6 in supernatant of cell culture medium was detected, the differences of anti-inflammatory activity *in vitro* were compared. Grey correlation analysis method was used to analyze the spectrum-effect relationship of peak area of common peaks and anti-inflammation activity. RESULTS: The fingerprint of 8 extracts with different polarities showed obvious differences. Anti-inflammation *in vitro* results suggested that 30% ethanol extract had the strongest inhibitory effect on inflammatory cytokines *in vitro*. There were 14 common peaks in the established HPLC fingerprints, the 5 common peaks that was closely related to the in-

2009(2):39-40.

- [7] 黄宇,王毓杰,杨文娟,等. HPLC法测定多血康胶囊中6个成分[J]. 中成药, 2015, 37(11):2418-2422.
- [8] 刘新国. DF喷雾剂的药剂学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2007:1-101.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:202.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560644);新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No.KY2014062);新疆维吾尔自治区中医民族医药科技人才培养项目(No.2016-03-03)

\* 副研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:maoyan7529@163.com

# 通信作者:研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com

版.北京:中国医药科技出版社, 2015:154-155, 179.

- [11] 袁海龙,谭锐,李仙逸,等.均匀设计法优选五味子的提取工艺[J].中国中药杂志, 2002, 27(5):355-357.
- [12] 段晓颖,高卫芳,吴彩丽,等.均匀设计法优选胡黄连中胡黄连苷的提取工艺[J].中国药房, 2011, 22(39):3675-3676.
- [13] 易延途,蔡光先,申传璞.复方红景天颗粒提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):54-56.
- [14] 方开泰.均匀设计与均匀设计表[M].北京:科学出版社, 1994:98-98.
- [15] 王洛临,吴小斌,周蓉,等.复方苘麻胶囊的提取工艺研究[J].中国药房, 2016, 27(22):3128-3131.
- [16] 徐维佳,周海虹,陈少东.均匀设计在中药复方研究中的应用分析[J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):236-239.

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-11-03)

(编辑:刘 萍)

hibitory effect of inflammatory factors *in vitro* were peak 8,6,5,10,13, respectively; peak 8 was rosmarinic acid. CONCLUSIONS: The established fingerprint and its spectrum-effect relationship with anti-inflammation activity *in vitro* can provide certain reference for its pharmacodynamic material basis study.

**KEYWORDS** *Hyssopus cuspidatus*; Extracts with different polarities; Anti-inflammation activity; Fingerprint; Spectrum-effect relationship; Inflammatory factor

神香草为唇形科植物硬尖神香草(*Hyssopus cuspidatus* Boriss.)的干燥地上部分,是维吾尔族民间习用药材,其性质干热,有很浓的香味,具有镇咳、祛痰、平喘等作用<sup>[1]</sup>,在维吾尔医学和民间用于治疗气管炎已有几百年的历史,疗效确切。支气管哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、气道上皮细胞等)和细胞组分参与的慢性气道炎症性疾病。本研究拟采用体外细胞培养技术检测神香草不同极性提取物的体外抗炎活性,初步将高效液相色谱(HPLC)指纹图谱和体外药效实验结果相结合,采用灰色关联分析法对谱效关系进行研究,考察神香草不同极性提取物HPLC指纹图谱特征峰与其对体外炎症因子抑制作用的相关性,从而阐明神香草抗炎作用的药效物质基础,并进一步得到神香草抗哮喘有效部位,为后期深度开发和利用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UltiMate 3000 系列HPLC仪,包括二极管阵列检测器、四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱和4~40℃恒温箱(美国Thermo Scientific Technologies公司);TDZ5-WS多管架自动平衡离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);SpectraMax M2多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);BP211D电子天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 对照品、试剂盒与试剂

迷迭香酸对照品(批号:111871-201203,纯度:98.6%)、咖啡酸对照品(供含量测定用,批号:110885-200102)、木犀草素对照品(供含量测定用,批号:111520-200504)均购自中国食品药品检定研究院;三裂鼠尾草素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-15052611,纯度:99.17%);总一氧化氮(NO)、细胞活力检测试剂盒(美国Promega公司,批号:0000131725、0000125533);小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国eBioscience公司,批号:E09479-1647、E09362-1655);甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

野生神香草药材于2014年8月采自新疆阿尔泰地区,由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为唇形科植物硬尖神香草(*Hyssopus cuspidatus* Boriss.)的干燥地上部分。

### 1.4 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7细胞)购

自美国菌种保藏中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 2% A; 5~10 min, 2% A→5% A; 10~35 min, 5% A→10% A; 35~40 min, 10% A; 40~80 min, 10% A→25% A; 80~110 min, 25% A→95% A; 110~120 min, 95% A);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:280 nm;进样量:10  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取咖啡酸、迷迭香酸、木犀草素和三裂鼠尾草素对照品适量,加甲醇溶解,制成每1 mL含咖啡酸0.165 mg、迷迭香酸0.263 mg、木犀草素0.112 mg、三裂鼠尾草素0.157 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 分别称取神香草药材200 g,粉碎,分别加入12倍量体积的水、30%乙醇、50%乙醇和75%乙醇加热回流提取2次,每次2 h,滤过,合并滤液,滤液减压浓缩至干浸膏,备用,样品编号为S<sub>1</sub>~S<sub>4</sub>。称取样品S<sub>1</sub>适量,以水混合溶解后上大孔树脂柱,收集50%乙醇洗脱部位,减压浓缩至干浸膏,备用,样品编号为S<sub>5</sub>。称取样品S<sub>3</sub>适量,以水混合溶解后上聚酰胺树脂柱,分别以水和30%、60%、80%乙醇溶液洗脱,收集30%、60%、80%乙醇洗脱部位,减压浓缩至干浸膏,备用,样品编号为S<sub>6</sub>~S<sub>8</sub>。取上述8种提取物样品各0.1 g,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)15 min,放冷,摇匀,0.45  $\mu$ m滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度 取供试品溶液(S<sub>3</sub>),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<0.05%(n=6),相对峰面积的RSD<2.41%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性 取供试品(S<sub>3</sub>)6份,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各共有峰相对保留时间的RSD<0.11%(n=6),相对峰面积的RSD<4.19%(n=6),表明重复性良好,符合指纹图谱研究技术的要求(RSD $\leq$ 5%)。

2.3.3 稳定性考察 取供试品溶液(S<sub>3</sub>),按“2.1”项下色谱条件,分别在室温下放置0、4、8、12、24、36 h进样测

定,记录色谱图。结果,在24 h内各共有峰相对保留时间的RSD<0.17% (n=6),相对峰面积的RSD<3.33% (n=6),表明供试品溶液室温下在24 h内稳定。

## 2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰和特征峰的标定 将神香草8个不同极性提取物按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图及各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,建立神香草8个不同极性提取物的HPLC指纹图谱。以混合对照品(咖啡酸、迷迭香酸、木犀草素和三裂鼠尾草素)溶液进行定位,采用相对保留时间标定共有峰,得共有峰14个。其中8号色谱峰(迷迭香酸)稳定、重复性好、含量相对较高、特征性较强,因此以其为指纹图谱的参照峰,结果见图1。

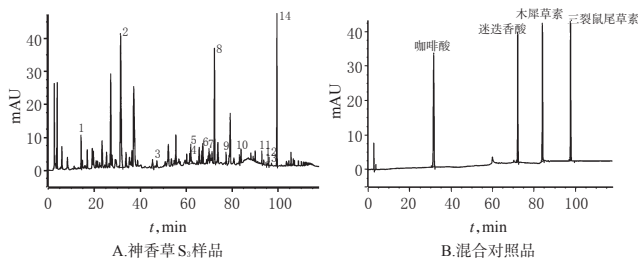


图1 混合对照品和神香草S<sub>3</sub>样品的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference and S<sub>3</sub> sample of *H. cuspidatus*

2.4.2 指纹图谱的生成及相似度评价 将经过积分处理的样品色谱图“AIA文件”导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A版软件中,以样品S<sub>3</sub>的图谱为参照图谱,设定时间窗为0.3 min。采用中位数法,按Mark峰进行自动匹配,生成对照指纹图谱,并进行相似度分析。指纹图谱见图2,相似度评价结果见表1。

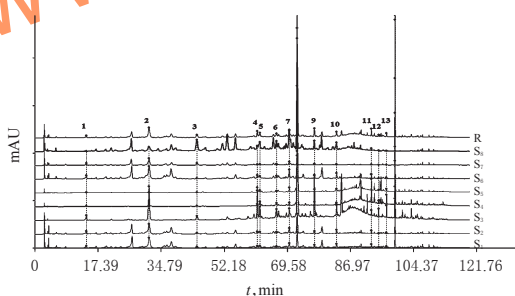


图2 神香草不同极性提取物的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint of extracts with different polarities from *H. cuspidatus*

表1结果显示,8个样品相似度较低,提示各部位成分差异较大,可以为神香草抗炎谱效关系的研究提供数据支持。

## 2.5 神香草不同极性提取物体外抗炎活性考察

2.5.1 细胞处理 参考文献[2-5]方法,将RAW264.7细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度环境下培养于含10%胎

表1 神香草不同极性提取物指纹图谱的相似度评价结果

Tab 2 Results of similarity evaluation of the fingerprint of extracts with different polarities from *H. cuspidatus*

样品	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	对照图谱(R)
S <sub>1</sub>	1.000	0.991	0.709	0.750	0.603	0.990	0.834	0.542	0.817
S <sub>2</sub>	0.991	1.000	0.787	0.769	0.683	0.999	0.868	0.638	0.873
S <sub>3</sub>	0.709	0.787	1.000	0.795	0.959	0.780	0.689	0.849	0.964
S <sub>4</sub>	0.750	0.769	0.795	1.000	0.855	0.757	0.414	0.561	0.906
S <sub>5</sub>	0.603	0.683	0.959	0.855	1.000	0.672	0.514	0.796	0.950
S <sub>6</sub>	0.990	0.999	0.78	0.757	0.672	1.000	0.869	0.629	0.865
S <sub>7</sub>	0.834	0.868	0.689	0.414	0.514	0.869	1.000	0.694	0.688
S <sub>8</sub>	0.542	0.638	0.849	0.561	0.796	0.629	0.694	1.000	0.800
对照图谱(R)	0.817	0.873	0.964	0.906	0.950	0.865	0.688	0.800	1.000

牛血清的1640培养基中,当细胞处于对数生长期时,取细胞悬液,以180 μL/孔(含细胞3×10<sup>4</sup>个/孔)接种于96孔培养板内,孵育18~24 h后进行后续试验。

2.5.2 细胞分组与加药 将RAW264.7细胞随机分5组,即空白对照组:以含10%胎牛血清的1640培养基继续培养,终体积为200 μL;脂多糖(LPS)对照组:加入10 μL LPS,用培养基补体积至200 μL;样品组:每孔分别加入样品S<sub>1</sub>~S<sub>8</sub>溶液10 μL、LPS 10 μL,用培养基补体积至200 μL,设提取物质量浓度梯度为50、10、2、0.4 μg/mL,与细胞共同孵育24 h。

2.5.3 指标检测 孵育24 h后,分别检测细胞活力和细胞培养上清液中NO、TNF-α和IL-6水平,具体操作按照相应试剂盒说明书进行(考虑到试验成本,试验中先采用细胞存活率和NO水平为指标优选样品,然后以TNF-α、IL-6水平为指标继续筛选神香草有效部位),测定结果见表2。

表2 神香草不同极性提取物体外抗炎活性测定结果

Tab 2 Determination results of anti-inflammation activity *in vitro* of extracts with different polarities from *H. cuspidatus*

组别	细胞存活率, %	NO, μg/mL	TNF-α, μg/mL	IL-6, μg/mL
S <sub>1</sub> 样品组	100.00	5.20	-	-
S <sub>2</sub> 样品组	97.59	3.61	-	-
S <sub>3</sub> 样品组	78.50	2.29	-	-
S <sub>4</sub> 样品组	99.31	2.61	-	-
S <sub>5</sub> 样品组	100.00	4.20	-	-
S <sub>6</sub> 样品组	100.00	3.67	193.49	102.92
S <sub>7</sub> 样品组	100.00	3.07	452.76	116.39
S <sub>8</sub> 样品组	100.00	4.28	-	-
空白对照组	100.00	1.13	112.78	108.77
LPS对照组	100.00	6.49	1 900.27	600.35

注:“-”表示未进行检测

Note:“-” indicated it was not detected

表2结果显示,样品S<sub>2</sub>~S<sub>4</sub>均体现出一定的细胞毒性,样品S<sub>2</sub>~S<sub>7</sub>均可不同程度地抑制LPS诱导的细胞NO的释放。其中,样品S<sub>6</sub>和S<sub>7</sub>的抑制效果最为明显,又因其无细胞毒性,因此筛选样品S<sub>6</sub>和S<sub>7</sub>进行后续试验研

究。结果表明,样品 S<sub>6</sub>和 S<sub>7</sub>均能抑制 LPS 诱导的细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放,对炎症疾病具有潜在的治疗作用。

## 2.6 神香草不同极性提取物指纹图谱特征与其抗炎作用的灰色关联分析

采用灰色关联分析法<sup>[6]</sup>对神香草不同极性提取物的指纹特征峰与体外抗炎活性的相关性进行分析,根据关联度的大小,确定各成分对体外抗炎活性贡献的大小顺序,结果见表 3。

表 3 神香草不同极性提取物指纹特征峰与体外抗炎活性的关联度测定结果

Tab 3 Determination results of correlation of characteristic chromatographic peaks of extracts with different polarities from *H. cuspidatus* and anti-inflammation activity in vitro

峰号	NO		TNF- $\alpha$		IL-6	
	关联度	关联序	关联度	关联序	关联度	关联序
1	0.554	14	0.948	9	0.986	5
2	0.560	13	0.926	12	0.964	6
3	0.630	9	0.953	8	0.992	11
4	0.646	7	0.940	11	0.979	13
5	0.702	5	1.000	1	0.969	4
6	0.739	2	0.978	4	0.994	7
7	0.657	6	0.972	5	1.000	9
8(s)	0.904	1	0.964	6	0.936	2
9	0.727	3	0.943	10	0.981	8
10	0.617	10	0.999	2	0.974	10
11	0.604	11	0.886	13	0.864	12
12	0.714	4	0.991	3	0.981	3
13	0.633	8	0.962	7	0.934	1
14	0.564	12	0.558	14	0.562	14

表 3 结果显示,14 个共有峰所代表的化学成分与体外抗炎活性的关联度均大于 0.55,提示这 14 个峰均与药效有关。根据关联度的大小,确定各共有特征峰对体外炎症因子 NO 抑制作用贡献大小顺序为:8>6>9>12>5>7>4>13>3>10>11>14>2>1;对 TNF- $\alpha$ 抑制作用贡献大小顺序为:5>10>12>6>7>8>13>3>1>9>4>2>11>14;对 IL-6 抑制作用贡献大小顺序为:13>8>12>5>1>2>6>9>7>10>3>11>4>14。

可见,神香草提取物是通过其内部“有效物质群”的协同作用达到体外抗炎作用的。

## 3 讨论

灰色关联分析来自灰色系统理论,其基本思想是一种相对性的排序分析,根据序列曲线几何形状的相似程度来判断其联系是否紧密。如果一组几何曲线形状越相似则关联度越大,反之则越小<sup>[7-8]</sup>。由此从所考察的复杂系统中找出主次因素,为系统综合决策及提高综合效益提供信息。

本研究通过寻找“有效物质群”的指纹特征与体外抗炎作用之间的联系开展研究,在神香草不同极性提取物指纹图谱和药效研究的基础上,获得了神香草不同溶剂提取物指纹图谱 14 个特征峰峰面积和体外炎症因子 NO、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的量化数据。采用灰色关联分析

技术,确定了指纹图谱特征峰所代表的化学成分对药效贡献的大小,继而根据神香草不同溶剂提取物指纹图谱各特征峰对体外炎症因子 NO、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的抑制作用贡献的大小程度来推测其体外抗炎作用。结果表明,指纹图谱中 14 个共有峰所代表的化学成分与体外抗炎活性的关联度均大于 0.55,提示这 14 个峰均与药效有关,证明了神香草的体外抗炎作用是多成分共同起效的结果。从整体结果来看,指纹图谱共有峰中除了 14 号峰与对 TNF- $\alpha$ 的抑制作用关联度较小外,其余各共有峰的关联度均大于 0.9。虽然样品 S<sub>7</sub>作用后细胞存活率较高、抑制体外炎症因子的作用较好,但是其指纹图谱中除 14 号峰外其余各峰峰面积均小。因此,本课题组将会选用样品 S<sub>6</sub>进行后续的药效学研究。

综上所述,本研究初步探索了神香草 8 个不同提取物的指纹图谱与体外抗炎活性的关系,为研究神香草药效物质基础提供了依据。后期本课题组将在此基础上研究关联度较大成分与体外抗炎活性药效的具体关系,确定药效较强组分的结构,为制定科学的质量评价标准提供参考。

## 参考文献

- [1] 刘勇民.维吾尔药志:上册[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1999:423-429.
- [2] Sittisart P, Chitsomboon B, Kaminski NE. Pseuderanthemum palatiferum leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in LPS-activated macrophages[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, doi:10.1016/j.fct.2016.08.021.
- [3] Rana S, Shahzad M, Shabbir A. Pistacia integerrima ameliorates airway inflammation by attenuation of TNF- $\alpha$ , IL-4, and IL-5 expression levels, and pulmonary edema by elevation of AQP1 and AQP5 expression levels in mouse model of ovalbumin-induced allergic asthma[J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(7):838-845.
- [4] Lee HS, Park HW, Song WJ. TNF- $\alpha$  enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL-23 during sensitization in asthma model[J]. *Cytokine*, 2016, doi:10.1016/j.cyt.2015.12.001.
- [5] Samarghandia S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Crocin attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta[J]. *Cytokine*, 2016, doi:10.1016/j.cyto.2016.08.002.
- [6] 秦子茹,贺金华,顾政一,等.一枝蒿不同极性提取物抗病毒作用的谱效关系研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(7):889-893.
- [7] 梁建娣,赵良功,刘小花,等.少毛北前胡化痰作用的谱效关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(19):2894-2897.
- [8] 胡晓燕,刘明华,孙琴,等.板蓝根抑菌活性部位的谱效关系研究[J]. *中草药*, 2013, 44(12):1615-1620.

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-11-24)

(编辑:林 静)