

维药神香草聚酰胺树脂柱40%乙醇洗脱物的成分分析及其对哮喘小鼠炎症的改善作用^Δ

毛艳^{1*}, 贺金华^{1#}, 铁 僇², 王新堂¹, 袁凤娟¹, 孙玉华¹, 蔡晓翠¹ (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 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3532-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.21

摘要 目的:对神香草40%乙醇洗脱物进行成分分析,并考察其对哮喘小鼠炎症的改善作用。方法:收集聚酰胺树脂柱40%乙醇洗脱物,采用高效液相色谱-高分辨率质谱技术对神香草40%乙醇洗脱物成分进行分析。将72只小鼠随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、地塞米松组(阳性对照,1.6 mg/kg)和神香草40%乙醇洗脱物高、中、低剂量组(200、100、50 mg/kg),每组12只。除正常组外,其余各组小鼠均于实验第0、14天ip 0.2 mL 卵白蛋白(OVA)致敏;于实验第25~31天ig给药,每天1次;给药结束后,用2 mg/mL OVA连续滴鼻激发7 d。末次滴鼻激发24 h后,检测各组小鼠肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素4(IL-4)和干扰素(IFN- γ)水平;观察肺组织病理变化。结果:共鉴定出11种化合物,相对百分含量为40.89%,主要成分有迷迭香酸、木犀草素7-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷、金丝桃苷等。与空白组比较,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-4水平升高,IFN- γ 水平降低,IL-4/IFN- γ 比值增大($P < 0.01$);肺组织破坏严重,血管周围有炎症细胞浸润。与模型组比较,地塞米松组和神香草40%乙醇洗脱物高、中剂量组小鼠BALF中TNF- α 、IL-4水平降低,IFN- γ 水平升高,IL-4/IFN- γ 比值减小($P < 0.01$);肺组织病理变化改善。结论:本研究建立的分析方法能够有效地分析神香草40%乙醇洗脱物中的化学成分;神香草40%乙醇洗脱物可调节哮喘小鼠肺组织炎症因子的释放,减轻哮喘小鼠肺组织的炎症病变。

关键词 维药;神香草;40%乙醇洗脱物;支气管哮喘;成分分析;炎症因子;小鼠

Component Analysis of 40% Ethanol Eluate of Polyamide Resin Column of Wei Medicine *Hyssopus officinalis* and Its Improvement Effect on Inflammation in Asthmatic Mice

MAO Yan¹, HE Jinhua¹, TIE Cai², WANG Xintang¹, YUAN Fengjuan¹, SUN Yuhua¹, CAI Xiaocui¹ (1.Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.Chinese Academy of Medical Sciences/Institute of Materia Medica, and Peking Union Medical College/State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct component analysis for the 40% ethanol eluate of *Hyssopus officinalis*, and investigate its improvement effect on inflammation in asthmatic mice. METHODS: The 40% ethanol eluate of polyamide resin column was collected, and HPLC-high resolution mass spectrometry was used for the component analysis of 40% ethanol eluate of *H. officinalis*. Totally 72 mice were randomly divided into blank group (normal saline), model group (normal saline), dexamethasone group (positive control, 1.6 mg/kg) and 40% ethanol eluate of *H. officinalis* high-dose, medium-dose, low-dose groups (200, 100, 50 mg/kg), 12 in each group. Except for normal group, mice in other groups were intraperitoneally injected 0.2 mL ovalbumin (OVA) for sensitization in 0, 14 d and intragastrically administrated in 25-31 d, once a day. After administration, 2 mg/mL OVA was dropped in nose for 7 d. After 24 h of last dropping in nose, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected; pathological changes in lung tissue were observed. RESULTS: Totally 11 compounds were identified, the relative percentage content of 40.89%. The main components were rosmarinic acid, luteolin 7-O- β -D-rhamnosyl (1 \rightarrow 6)- α -D-pyran glucoside, hyperoside, etc. Compared with blank group, TNF- α , IL-4 levels in BALF in model group were increased, IFN- γ level was declined, and IL-4/IFN- γ ratio was enlarged ($P < 0.01$); lung tissue was seriously damaged, there was infiltration of inflammatory cells around the blood vessels. Compared with model group, TNF- α , IL-4 levels in BALF in dexamethasone group, 40% ethanol eluate of *H. officinalis* high-dose, medium-dose groups were

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560644);新疆维吾尔自治区中医学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:维吾尔药新药研发与成分分析。电话:0991-2326572。E-mail:maoyan7529@163.com

通信作者:研究员。研究方向:维吾尔药新药研发与成分分析。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com

declined, IFN- γ level was increased, and IL-4/IFN- γ ratio was reduced ($P < 0.01$); pathological changes in lung tissue were improved. CONCLUSIONS: The established analysis method can effectively analysis the chemical components of 40% ethanol eluate of *H. officinalis*, which has certain regulatory effect on releasing inflammatory factors and reducing inflammatory

lesions in lung tissue of mice with bronchial asthma.

KEYWORDS Wei medicine; *Hyssopus officinalis*; 40% ethanol eluate; Bronchial asthma; Component analysis; Inflammatory factors; Mice

神香草为唇形科植物硬尖神香草(*Hyssopus cuspidatus* Boriss.)的干燥地上部分,维吾尔名为“祖发奇尼”,是维吾尔族民间习用药材^[1]。神香草药用全草,有很强的香味,主要含黄酮类、挥发油类、有机酸及其酯类等化学成分^[2],具有镇咳祛痰、清热利湿、杀菌的作用,在维吾尔医学中有广泛的应用^[3]。

支气管哮喘(Bronchial asthma,简称哮喘)是气道的一种慢性炎症性疾病^[4]。其发病机制与炎症介质的释放、辅助T淋巴细胞1(Th1)/辅助T淋巴细胞2(Th2)免疫调节的失衡有关^[5]。炎症的应答由Th2、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、中性粒细胞和促炎细胞因子所促成^[6],而Th1细胞可以抑制炎症介质的释放,是治疗哮喘的有效途径。因此,抑制炎症介质的产生,维持Th1/Th2免疫调节的平衡,对哮喘具有一定的防治作用。

本课题组前期对神香草聚酰胺树脂柱不同极性洗脱物进行了体外抗炎作用的谱效关系研究,优选出了体外抗炎效果最佳的洗脱物(40%乙醇洗脱物),随后又对该洗脱物进行了系统的聚酰胺树脂纯化工艺研究^[7]。本研究在此基础上,采用高效液相色谱-高分辨率质谱(HPLC-HR-MS/MS)技术对神香草聚酰胺树脂柱40%乙醇洗脱物的主要成分进行定性分析,采用峰面积归一化法计算各组分相对百分含量,并进一步观察其对哮喘小鼠肺泡灌洗液(BALF)中炎症因子以及肺组织病理变化的影响,为优选神香草抗哮喘活性成分及阐明其抗哮喘作用机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000系列高效液相色谱仪(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、4~40℃恒温箱)和Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统[配有加热电喷雾离子源(HESI)和Xcalibur 2.2 sp1.48数据处理系统]均购自美国Thermo Scientific Technologies公司;RT-6100酶标仪(深圳雷杜生命科学仪器有限公司);Hemvate动物血液分析仪(英国Drew公司);3K30低温高速离心机(德国Sigma公司,离心半径:290 mm)。

1.2 药材与试剂

神香草药材(采自新疆阿尔泰地区,野生),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神香草[*Hyssopus cuspidatus* Boriss.]的干燥地上部位;地塞米松片(广东三才石岐制药有限公司,批号:160653,规格:0.75 mg/片);小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素4(IL-4)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国eBioscience公司,批号:E09479-1647、E09342-1642);小鼠干扰素(IFN- γ)ELISA试剂盒(联科生物技

术有限公司,批号:EK2802);乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯(美国Merck公司);水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

BALB/C小鼠72只,♀,6~8周龄,体质量18~22 g,由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供,动物合格证号:SCXK(新)2011-0001。

2 方法

2.1 神香草40%乙醇洗脱物的制备

取干燥、粉碎的神香草20 kg,用12倍量的50%乙醇溶液提取2次,1.5 h/次;滤液经减压浓缩、真空干燥,得神香草提取物。神香草提取物经聚酰胺树脂分离纯化后,分别用水和20%、40%乙醇洗脱,收集40%乙醇洗脱液,经减压浓缩、真空干燥,得到洗脱物粉末。

2.2 供试品溶液的制备

称取神香草40%乙醇洗脱物适量,加40%乙醇制成质量浓度为1.5 mg/mL的溶液,摇匀,滤过(0.22 μ m滤膜),取滤液作为供试品溶液。

2.3 HPLC-HR-MS/MS分析神香草40%乙醇洗脱物中成分

2.3.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈(250 mm \times 4 mm, 6.5 μ m);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~12 min, 90% A; 12~14 min, 50%~33% A; 14~15 min, 33%~40% A; 15~17 min, 40%~29% A; 17~30 min, 29% A; 30~35 min, 29%~90% A; 35~40 min, 90% A);流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;检测波长:280 nm;进样量:10 μ L。

2.3.2 质谱条件 采用正、负离子全扫描模式,扫描范围:100~1 500质荷比(m/z);HESI雾化温度:300℃;毛细管电压:3 500 V/-3 300 V;离子传输管温度:220℃;鞘气压力:40 arb;辅助气压力:11 arb;分辨率:35 000。

2.3.3 成分分析 取“2.2”项下供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件和“2.3.2”项下质谱条件进样分析。

2.4 神香草40%乙醇洗脱物对哮喘小鼠炎症的作用

2.4.1 分组、造模与给药 将72只小鼠随机分为6组,每组12只,分别为空白组、模型组、地塞米松组(阳性对照,1.6 mg/kg,根据人临床用量换算而得)和神香草40%乙醇洗脱物高、中、低剂量组(200、100、50 mg/kg,分别根据人临床用量的2、1、0.5倍剂量换算而得)。除正常组外,其余各组小鼠均采用卵白蛋白(OVA)致敏复制哮喘模型。在实验第0、14天,造模小鼠均ip 0.2 mL OVA致敏液(1.5 mg OVA+15 mL 10%氢氧化铝胶生理盐水稀释液);空白组小鼠ip等体积生理盐水。实验第25~31天,给药组小鼠ig相应药物,空白组和模型组小鼠ig等体积蒸馏水,每天1次。末次给药1 h后,造模组小鼠滴鼻2 mg/mL的OVA激发液激发哮喘,空白组小鼠滴鼻

50 μ L生理盐水,连续7 d。期间发现小鼠出现躁动不安、抓耳、挠鼻、打喷嚏、呼吸急促等现象表明造模成功。

2.4.2 BALF中TNF- α 、IL-4、IFN- γ 水平测定 末次滴鼻24 h后,眼眶采血,然后处死小鼠,消毒分离出气管,剪开气管,把1 mL注射器针头插入气管内并固定。每次注入生理盐水0.5 mL回抽,共3次(回抽率达80%~90%),将抽取的BALF在4 $^{\circ}$ C下以2 000 r/min离心10 min,离心2次,上清液保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。采用ELISA法测定BALF上清液中TNF- α 、IL-4、IFN- γ 水平,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。

2.4.3 肺组织的病理形态学观察 选用未做肺泡灌洗的肺组织进行病理切片,行苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织的病理形态改变。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 HPLC-HR-MS/MS成分分析结果

正、负离子扫描模式下HPLC-MS总离子流图见图1,高效液相色谱图见图2。

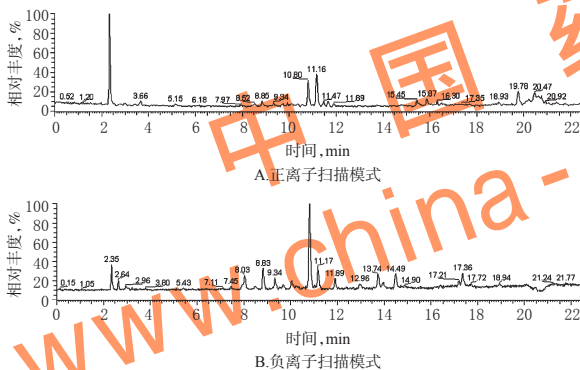


图1 HPLC-MS总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of HPLC-MS

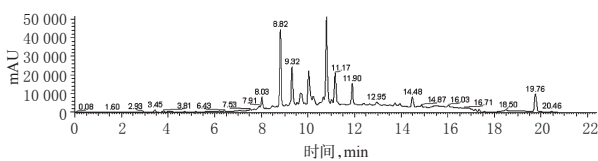


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

根据酚酸类和黄酮类化合物的质谱裂解规律为指导,参照神香草中已报道成分的质谱数据^[9],分析推断了神香草中可能所含的11个成分,相对百分含量为40.96%;其中黄酮类成分占13.44%,酚酸类成分占16.38%,结果见表1。

3.2 神香草40%乙醇洗脱物对哮喘小鼠炎症的作用结果

3.2.1 BALF中TNF- α 、IL-4、IFN- γ 水平测定结果 与空

表1 神香草40%乙醇洗脱物中化学成分分析结果

Tab 1 Analysis results of chemical components in 40% ethanol eluate in *H. officinalis*

编号	保留时间, min	[M+H] ⁺ , m/z	[M-H] ⁻ , m/z	分子式	分子量	相对百分含量, %	化合物名称
1	8.03	181.049 4	179.033 6	C ₈ H ₈ O ₄	180.04	2.67	咖啡酸
2	8.83	595.165 0	593.150 6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.16	2.36	木犀草素 7-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷
3	9.34	465.102 3	463.088 0	C ₁₁ H ₁₀ O ₁₂	464.10	1.58	金丝桃苷
4	9.69	579.170 1	577.155 9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄	578.17	9.80	未知化合物
5	10.04	609.180 5	607.166 6	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₅	608.18	2.04	香叶木苷
6	10.82		359.076 8	C ₁₀ H ₈ O ₆	360.07	9.94	迷迭香酸
7	11.17	555.146 3	553.150 1	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	532.15	2.93	未知化合物
8	11.90	615.167 4	617.177 1	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₆	638.17	1.59	金合欢素的2个葡萄糖醛酸
9	13.74	209.060 6	207.065 2	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	208.07	2.18	3,4-二甲氨基肉桂酸
10	17.36	285.075 3	283.060 9	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.07	2.89	金合欢素
11	19.76	329.101 5		C ₁₆ H ₁₆ O ₆	328.10	2.98	三裂鼠尾草素

白组比较,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-4水平显著升高($P < 0.01$),IFN- γ 水平显著降低($P < 0.01$),IL-4/IFN- γ 比值显著增大。与模型组比较,各给药组小鼠BALF中TNF- α 、IL-4水平均降低,IFN- γ 水平均升高,IL-4/IFN- γ 比值均减小;其中,地塞米松组和神香草40%乙醇洗脱物高、中剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表2。

表2 各组小鼠BALF中TNF- α 、IL-4和IFN- γ 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 2 Results of TNF- α , IL-4 and IFN- γ levels in BALF of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量, mg/kg	TNF- α , pg/mL	IL-4, pg/mL	IFN- γ , pg/mL	IL-4/IFN- γ
空白组		68.48 \pm 10.31	27.30 \pm 9.15	200.12 \pm 73.83	0.15 \pm 0.07
模型组		214.26 \pm 48.30**	221.35 \pm 104.18**	102.73 \pm 13.59**	2.23 \pm 1.21**
地塞米松组	1.6	66.51 \pm 31.05 [#]	29.55 \pm 11.28 [#]	173.10 \pm 25.39 [#]	0.18 \pm 0.09 [#]
神香草40%乙醇洗脱物高剂量组	200	69.08 \pm 34.54 [#]	33.38 \pm 14.78 [#]	189.73 \pm 51.43 [#]	0.18 \pm 0.09 [#]
神香草40%乙醇洗脱物中剂量组	100	100.82 \pm 25.52 [#]	61.01 \pm 36.33 [#]	129.81 \pm 24.85 [#]	0.48 \pm 0.28 [#]
神香草40%乙醇洗脱物低剂量组	50	161.32 \pm 62.82	142.97 \pm 53.52	103.45 \pm 42.25	1.60 \pm 0.84

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. blank group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2.2 肺组织病理变化观察结果 与空白组比较,模型组小鼠肺组织破坏严重,支气管管壁明显增厚,血管周围有炎症细胞浸润。与模型组比较,地塞米松组和神香草40%乙醇洗脱物高剂量组小鼠肺组织病理变化明显改善,炎症细胞浸润及组织破坏减轻,炎症现象明显缓解;神香草40%乙醇洗脱物中、低剂量组小鼠肺组织中仍有一定的炎症细胞浸润,结果见图3。

4 讨论

哮喘是由多种炎症细胞、细胞因子和炎症介质共同参与的气道慢性炎症性疾病^[9]。生理条件下,机体中Th1、Th2细胞处于动态平衡,而Th1/Th2的失衡是评价支气管哮喘的重要指标,一系列的过敏反应可能发生在

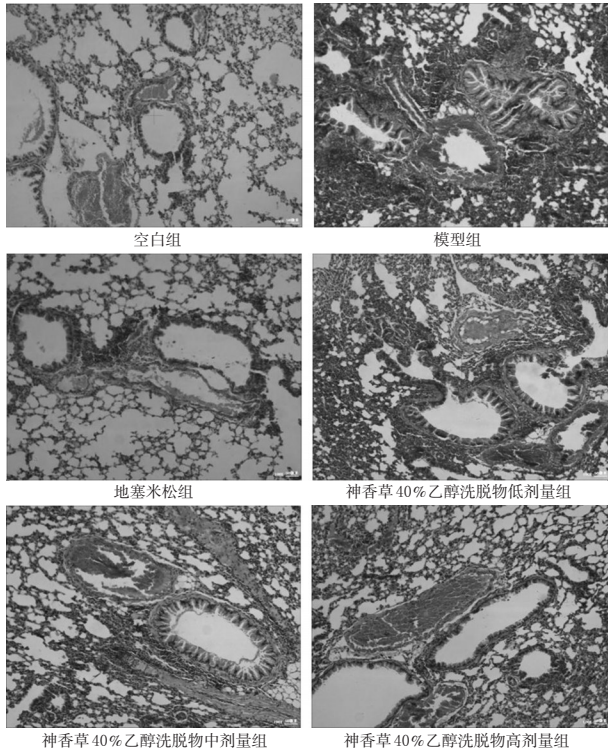


图3 各组小鼠肺组织病理切片图(HE,×100)

Fig 3 Pathological sections of lung tissue of mice in each group (HE,×100)

Th1 细胞活性的减小和/或 Th2 细胞活性的增加^[10]。有研究表明,除了嗜酸性粒细胞、肥大细胞等炎症细胞外,炎症介质 TNF- α 和中性粒细胞也可诱导哮喘炎症的发生^[11-12]。TNF- α 在非特异性免疫中是一种重要的促炎因子,可介导 Th2 细胞或 Th17 细胞产生免疫应答^[13],也可以促进中性粒细胞的表达。IL-4 为主要的 Th2 型细胞因子,主要参与气道黏液分泌和嗜酸性粒细胞的产生、浸润。IFN- γ 是重要的 Th1 型细胞因子,可抑制 Th2 型细胞因子的表达^[10]。

地塞米松可抑制中性粒细胞和巨噬细胞渗出向炎症部位聚集,减少其在炎症区域血管内皮细胞的黏附,具有较好的抗炎作用,故本研究以其为阳性对照。本研究采用 OVA 致敏+滴鼻激发的方法复制小鼠哮喘模型,该方法简单可行、模型复制成功率高^[14]。本研究结果表明,神香草 40% 乙醇洗脱物可呈剂量依赖性降低哮喘小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-4 水平,升高 IFN- γ 水平,减小 IL-4/TNF- γ 比值,促进 Th1/Th2 免疫调节的平衡,起到防治哮喘的作用。

HPLC-HR-MS/MS 分析鉴定得到的成分的相对百分含量为 40.96%,其中黄酮类成分占 13.44%,酚酸类成分占 16.38%。有文献报道,神香草总黄酮可能通过抑制嗜酸性细胞等炎症细胞及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)的分泌消除气道炎症,这是其发挥抗哮喘的重要环节^[6];而其中的酚类成分迷迭香酸具有抗炎、抗菌、调节免疫及抗氧化作用^[15]。因此,笔者推测神香草防治哮喘活性强的最主要成分可能是其含量较高的黄酮类和酚酸类化合

物,但有待进一步探讨和研究。本研究结果为进一步分离神香草抗哮喘有效部位防治哮喘的活性成分奠定了基础。

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] 顾政一.维吾尔药现代化研究与应用[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,2015:404-408.
- [3] 麦合苏木·艾克木,努尔江·肉孜,阿不都热依木·玉苏甫,等.维药神香草总黄酮抗炎、止咳、祛痰及平喘作用研究[J].新疆医科大学学报,2014,37(4):403-406.
- [4] 王雅娟,朱慧志,孔献春,等.川芎嗪改善哮喘大鼠气道高反应性的作用观察[J].中成药,2014,36(4):834-837.
- [5] Ji NF, Xie YC, Zhang MS, et al. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(1):76-81.
- [6] 魏苗苗.原儿茶酸对过敏性哮喘模型小鼠的保护作用及相关机制的研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [7] 毛艳,贺金华,蔡晓翠,等.维药神香草提取物体外抗炎作用的谱效关系研究[J].中国药房,2017,28(10):1364-1367.
- [8] 赵军,徐芳,贺金华,等.硬尖神香草化学成分研究[J].中药材,2013,36(1):54-57.
- [9] Yuan Y, Yang B, Ye Z, et al. *Sceptridium ternatum* extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3):701-706.
- [10] Wei Y, Liu B, Sun J, et al. Regulation of Th17/Treg function contributes to the attenuation of chronic airway inflammation by icariin in ovalbumin-induced murine asthma model[J]. *Immunobiology*, 2015, 220(6):789-797.
- [11] Wei Y, Luo QL, Sun J, et al. Bu-Shen-Yi-Qi formulae suppress chronic airway inflammation and regulate Th17/Treg imbalance in the murine ovalbumin asthma model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi:10.1016/j.jep.2015.01.016.
- [12] Lukawska JJ, Livieratos L, Sawyer BM, et al. Imaging inflammation in asthma: real time, differential tracking of human neutrophil and eosinophil migration in allergen challenged, atopic asthmatics in vivo[J]. *EBio Medicine*, 2014, 1(2/3):173-180.
- [13] Lee HS, Park HW, Song WJ, et al. TNF- α enhance Th2 and Th17 immune responses regulating by IL-23 during sensitization in asthma model[J]. *Cytokine*, 2016, doi:10.1016/j.cyto.2015.12.001.
- [14] 麦合苏木·艾克木,努尔江·肉孜,阿不都热依木·玉苏甫.维药神香草总黄酮对卵清白蛋白致大鼠哮喘模型气道炎症的影响[J].科技导报,2013,31(36):71-75.
- [15] 程胜,陈辉龙,王正云,等.滴鼻和雾化两种不同激发方式对小鼠支气管哮喘模型气道炎症的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2014,43(2):121-124.

(收稿日期:2017-03-16 修回日期:2017-06-12)

(编辑:林 静)