

# 不同产地金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱的建立及其抗炎作用的谱效关系研究<sup>△</sup>

冯月<sup>1\*</sup>, 段飞鹏<sup>2</sup>, 李一圣<sup>2</sup>, 邱书奇<sup>1,2#</sup> (1. 遵义医科大学珠海校区临床医学院, 广东珠海 519041; 2. 深圳市耳鼻咽喉研究所/深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院耳鼻咽喉科, 广东深圳 518172)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)15-1825-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.15.06



**摘要** 目的: 建立不同产地金钗石斛醇提物的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱, 并进行其抗炎作用的谱效关系研究。方法: 制备12批不同产地金钗石斛(S1~S12)的醇提物样品。采用HPLC法检测, 并结合《中药指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》建立12批金钗石斛醇提物的指纹图谱并进行共有峰指认和相似度评价。以炎症因子[白细胞介素4(IL-4)、IL-6]含量为抗炎指标, 采用酶联免疫吸附试验考察12批金钗石斛醇提物对脂多糖诱导的炎症模型RAW264.7巨噬细胞的抗炎作用; 采用灰色关联度分析法分析金钗石斛醇提物指纹图谱中各共有峰与抗炎指标的关联度。结果: 12批金钗石斛醇提物共有18个共有峰, 指认了12号峰为石斛酚, 各样品相似度为0.911~0.996。金钗石斛S1~S12醇提物均可显著降低细胞培养液中IL-4的含量( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 金钗石斛S1~S8, S10醇提物均可显著降低细胞培养液中IL-6的含量( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。经灰色关联度分析发现, 除4、18号峰外, 其余共有峰与IL-4含量的关联度均大于0.6, 且5、7号峰与IL-4含量的关联度均大于0.8; 除9、14、4、3、18号峰外, 其余共有峰与IL-6含量的关联度均大于0.6, 且1、12、13号峰与IL-6含量的关联度均大于0.8。结论: 12批不同产地金钗石斛醇提物的HPLC指纹图谱的相似度较高、所含成分一致性较好; 其中1、5、7、12(石斛酚)、13号峰所代表的化学成分可能是金钗石斛潜在的抗炎药效成分。

**关键词** 金钗石斛; 高效液相色谱; 指纹图谱; 抗炎作用; 谱效关系

## Establishment of HPLC Fingerprints of Ethanol Extract of *Dendrobium nobiles* from Different Habitats and Spectrum Effect Relationship Study of Its Anti-inflammatory Effect

FENG Yue<sup>1</sup>, DUAN Feipeng<sup>2</sup>, LI Yisheng<sup>2</sup>, QIU Shuqi<sup>1, 2</sup> (1. School of Clinical Medicine, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Guangdong Zhuhai 519041, China; 2. Dept. of ENT, Shenzhen ENT Institute/Longgang ENT Hospital, Guangdong Shenzhen 518172, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To establish the HPLC fingerprints of ethanol extracts of *Dendrobium nobile* from different habitats, and to study spectrum effect relationship of its anti-inflammatory effect. **METHODS:** The ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile* from different habitats (S1-S12) were prepared. The fingerprints of ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile* were established by HPLC and *TCM Fingerprint Similarity Evaluation System* (version 2012). Common peaks were identified and the similarity was evaluated. Using the contents of inflammatory factors (IL-4, IL-6) as anti-inflammatory indexes, ELISA was used to investigate the effects of ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile* on RAW264.7 macrophages in inflammatory model induced by lipopolysaccharide. Grey correlation analysis was used to analyze the correlation between common peaks and anti-inflammatory indexes in the fingerprint of ethanol extract from *D. nobile*. **RESULTS:** There were 18 common peaks in ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile*, and No. 12 peak was identified as dendrophenol. The similarity of each sample was 0.911-0.996. The content of IL-4 in cell culture medium was significantly reduced by ethanol extracts of *D. nobile* S1-S12 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the content of IL-6 in cell culture was significantly reduced by ethanol extracts of *D. nobile* S1-S8, S10 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Grey correlation analysis found that except for peaks 4 and 18, the correlation degree between the other common peaks and the content of IL-4 was greater than 0.6, and the correlation degree between peaks 5 and 7 and the content of IL-4 was greater than 0.8; except for peaks 9, 14, 4, 3 and 18, the correlation degree between the other common peaks and the content of IL-6 was greater than 0.6, and the correlation degree between peaks 1, 12 and 13 and the content of IL-6 was greater than 0.8. **CONCLUSIONS:** HPLC

<sup>△</sup> 基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(No.2020M683137); 深圳市龙岗区科技发展专项资金-医疗卫生科技计划项目(No.LGK-CYLWS2019000846, No.LGKCYLWS2019000749)

\* 硕士研究生。研究方向: 治疗变应性鼻炎的中药新药。E-mail: 769096783@qq.com

# 通信作者: 主任医师, 教授, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 治疗耳鼻咽喉科疾病的中药新药。E-mail: qiuqi66858@163.com

fingerprints of ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile* from different habitats have high similarity and good consistency in composition; the chemical constituents represented by peaks 1, 5, 7, 12 (dendrophenol) and 13 may be potential anti-inflammatory components of *D. nobile*.

**KEYWORDS** *Dendrobium nobile*; HPLC; Fingerprint; Anti-inflammatory activity; Spectrum effect relationship

石斛为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl、鼓槌石斛 *D. chrysotoxum* Lindl 或流苏石斛 *D. fimbriatum* Hook 的栽培品及其同属植物近似种的新鲜或干燥茎,其性甘、微寒,具有益胃生津、滋阴清热的功效<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,石斛具有抗炎、增强免疫力、降血糖、抗衰老、抗肿瘤和保护神经系统等多种药理活性<sup>[2]</sup>。相关研究结果显示,金钗石斛被较好地应用于慢性咽炎<sup>[3]</sup>,对炎症因子的分泌和炎症反应的发生具有良好的抑制作用<sup>[4-5]</sup>。然而,不同产地的金钗石斛因其生长的土壤环境的异质性和微生态差异性<sup>[6]</sup>,可能在内在性状、化学成分、药理活性等方面表现出一定的差异<sup>[7]</sup>,而这些方面的差异在一定程度上影响着金钗石斛的临床药效。因此,对不同产地金钗石斛的内在质量进行考察是必要的,可为其质量控制以及临床用药提供一定的参考。

目前,相关研究以中药化学成分谱和中药药效活性为切入点进行中药谱效关系的研究,可以更加全面地对中药质量进行评价,并为其药效物质基础研究提供新思路<sup>[8-9]</sup>。已有研究采用谱效关系研究来考察不同产地中药材的内在质量差异,并筛选出潜在的药效成分<sup>[10-12]</sup>,因此,本研究参考文献[13-14]方法将12批不同产地金钗石斛以乙醇煎煮回流提取制备醇提物,并建立该醇提物的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱;以白细胞介素4(IL-4)、IL-6为炎症指标<sup>[15]</sup>,结合灰色关联度分析法<sup>[16]</sup>,初步探讨金钗石斛抗炎作用的药效基础,为该药材的内在质量评价提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有:e2695/2998型HPLC仪(美国Waters公司),BSA323S型电子精密天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),Milli-Q Advantage A10型超纯水机(美国Millipore公司),SB-1200型数显恒温水浴锅、N-1200B型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),FD-1C-80型冷冻干燥机(上海比朗仪器制造有限公司),109922-7730型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),5810F型台式离心机(德国Eppendorf公司),TUNE型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用12批金钗石斛药材(编号S1~S12)分别购自四川省乐山市夹江县、贵州省赤水市、云南省昭通市镇雄县,经深圳市龙岗区耳鼻咽喉医院中药新药研究室李一圣副主任中药师鉴定为兰科植物金钗石斛 *D. nobile* Lindl 的干燥茎。其他药品与试剂有:石斛酚对照品、地塞米松对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111875-201202、100129-201506,纯度均不低于99%),DMEM细胞培养基(美国HyClone公司,批号AE25719279),0.25%胰酶-EDTA(美国Gibco公司,批号

25200-056),胎牛血清(美国ScienCell公司,批号19797),脂多糖(美国Sigma公司,批号L2630),IL-4酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号M190521-003a),IL-6 ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号JUUIH4ECKG);甲醇为色谱纯,甲酸为分析纯,水为超纯水。不同产地金钗石斛药材来源信息见表1。

表1 不同产地金钗石斛药材来源信息

Tab 1 Source information of *D. nobile* from different habitats

编号	产地	编号	产地
S1	贵州省赤水市	S7	云南省昭通市镇雄县
S2	贵州省赤水市	S8	云南省昭通市镇雄县
S3	贵州省赤水市	S9	四川省乐山市夹江县
S4	贵州省赤水市	S10	四川省乐山市夹江县
S5	云南省昭通市镇雄县	S11	四川省乐山市夹江县
S6	云南省昭通市镇雄县	S12	四川省乐山市夹江县

### 1.3 细胞

本研究所用小鼠源性RAW264.7巨噬细胞株购自美国ATCC公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 金钗石斛醇提物HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 金钗石斛醇提物的制备 将12批金钗石斛药材以打粉机制成粗粉。精密称取各批药材粗粉各25 g,分别置于圆底烧瓶中,加入90%乙醇625 mL后,置于60℃水浴锅内回流提取2次,每次1 h;过滤,合并2次的滤液,使用旋转蒸发仪将滤液浓缩至20 mL;将浓缩后溶液转入烧杯中,继续置于60℃水浴锅中充分挥干乙醇,即得金钗石斛醇提物浸膏。将该浸膏置于-80℃条件下冷冻过夜,然后置于冷冻干燥机中冻干,即得金钗石斛醇提物粉末(以生药量计,得率为6.11%)

2.1.2 色谱条件 色谱柱为Sapphire C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为0.1%甲酸(B)-甲醇(D),梯度洗脱(0~10 min,5% D→10% D;10~20 min,10% D→20% D;20~28 min,20% D→30% D;28~55 min,30% D→60% D;55~65 min,60% D→65% D;65~75 min,65% D→90% D;75~80 min,90% D→10% D);流速为1.0 mL/min;柱温为25℃;检测波长为254 nm;进样体积为20 μL。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别称取“2.1.1”项下制备的12批金钗石斛醇提物粉末25 mg,置于烧杯中,以适量甲醇溶解后,转入25 mL量瓶,以甲醇定容;分别取1 mL上述溶液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取石斛酚对照品250 μg,置于烧杯中,以适量甲醇溶解后,转入25 mL量瓶,以甲醇定容;取1 mL上述溶液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液,即得对照品溶液。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.3”项下制备的供试品溶液

(S1号样品醇提取物)适量,按“2.1.2”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。将10号色谱峰(出峰时间适中且峰形较好,下同)作为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰的相对保留时间的RSD为0.04%~0.45% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD为0.55%~2.97% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取S1号样品醇提取物6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。将10号色谱峰作为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰的相对保留时间的RSD为0.02%~0.39% ( $n=6$ ),相对峰面积的RSD为1.13~2.98% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(S1号样品醇提取物),于室温放置0、2、4、8、12、16、24 h后,按“2.1.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将10号色谱峰作为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰的相对保留时间的RSD为0.01%~0.67% ( $n=7$ ),相对峰面积RSD为1.75%~2.58% ( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.1.8 12批不同产地金钗石斛醇提取物样品HPLC指纹图谱的生成 取“2.1.1”项下制备的12批金钗石斛醇提取物粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》,将色谱峰峰形较明显、信号强度较好的S1号样品醇提取物的色谱图作为参照色谱图,运用全谱峰匹配法和中位数法,将时间窗设置为0.1,经过多点校正后,自动匹配生成12批不同产地金钗石斛醇提取物的HPLC叠加指纹图谱和对照图谱R,详见图1。

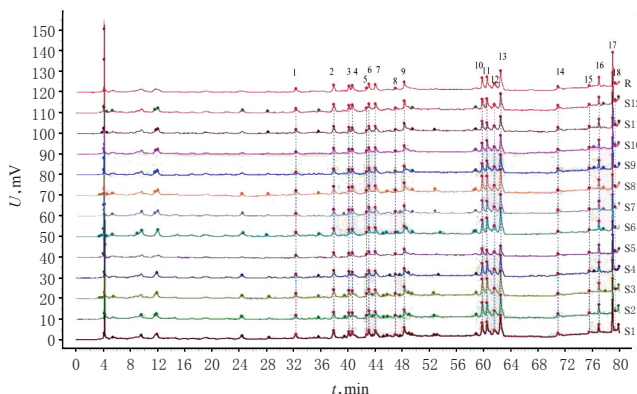


图1 12批不同产地金钗石斛醇提取物的HPLC叠加指纹图谱和对照图谱R

Fig 1 HPLC superimposed fingerprint diagram and comparison diagram R of ethanol extract from 12 batches of *D. nobile* from different habitats

2.1.9 共有峰指认 取“2.1.4”项下对照品溶液,按“2.1.2”项下色谱条件进样分析,得到如图2所示的石斛酚对照品色谱图。由图1可知,12批不同产地金钗石斛醇提取物一共有18个共有峰,通过与图2进行对比,指认出12号峰为石斛酚。

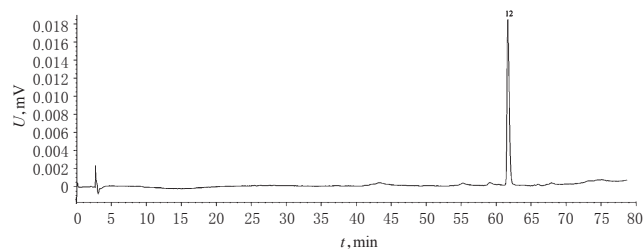


图2 石斛酚对照品的HPLC图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of dendrophenol control

2.1.10 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》对12批金钗石斛醇提取物的指纹图谱进行相似度评价。结果,12批金钗石斛醇提取物样品指纹图谱的相似度在0.911~0.996范围内,表明这12批样品的一致性较好,详见表2。

表2 12批金钗石斛醇提取物指纹图谱的相似度

Tab 2 Similarity of the fingerprints of the ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	1.000											
S2	0.985	1.000										
S3	0.982	0.996	1.000									
S4	0.974	0.991	0.985	1.000								
S5	0.927	0.933	0.911	0.958	1.000							
S6	0.949	0.963	0.971	0.964	0.958	1.000						
S7	0.975	0.986	0.981	0.992	0.964	0.962	1.000					
S8	0.981	0.989	0.990	0.985	0.937	0.978	0.989	1.000				
S9	0.970	0.986	0.977	0.994	0.963	0.963	0.994	0.985	1.000			
S10	0.972	0.987	0.980	0.995	0.960	0.966	0.995	0.988	0.996	1.000		
S11	0.969	0.973	0.957	0.975	0.980	0.928	0.979	0.973	0.981	0.981	1.000	
S12	0.981	0.982	0.971	0.973	0.957	0.946	0.980	0.984	0.979	0.982	0.993	1.000

## 2.2 金钗石斛醇提取物对脂多糖诱导的RAW264.7巨噬细胞抗炎作用的考察

本研究参考文献[15]的方法,探究金钗石斛醇提取物对脂多糖诱导的炎症模型RAW264.7巨噬细胞中炎症因子(IL-4、IL-6)含量的影响,以此评价其抗炎作用。

2.2.1 细胞培养 RAW264.7巨噬细胞采用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养基(简称“培养基”),于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养(以下培养条件相同),取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2.2 金钗石斛醇提取物对细胞培养液中IL-4、IL-6含量的影响 取RAW264.7巨噬细胞,按5×10<sup>4</sup>个/孔接种于96孔板,然后分为正常对照组、模型组、地塞米松组(阳性对照,100 μg/mL,给药质量浓度根据文献[17]设置)和



12批金钗石斛(S1~S12)醇提取物组(100 μg/mL, 给药质量浓度根据本课题组前期预实验结果设置), 每组设3个复孔。正常对照组加入培养基200 μL, 模型组细胞加入含100 ng/mL脂多糖的培养基200 μL, 各给药组加入含100 ng/mL脂多糖和相应药物的培养基200 μL; 细胞培养24 h后, 收集培养液, 以3 000 r/min离心5 min, 取上清液, 按照相应ELISA试剂盒说明书方法操作; 采用酶标仪于450 nm波长下测定吸光度, 计算上清液中IL-4、IL-6含量。采用SPSS 24.0软件对数据进行统计分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 方差齐时, 采用LSD检验; 方差不齐时, 采用Dunnett's T3检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果, 与正常对照组比较, 模型组细胞培养液中IL-4、IL-6含量均显著升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 地塞米松组细胞培养液中IL-4、IL-6含量均显著降低( $P<0.01$ ), 金钗石斛S1~S12醇提取物组细胞培养液中IL-4含量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 金钗石斛S1~S8、S10醇提取物组细胞培养液中IL-6含量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 表明12批金钗石斛醇提取物对细胞中IL-4、IL-6含量均具有不同程度的抑制作用; 且贵州省赤水市产金钗石斛(S1~S4)醇提取物的抑制作用较强, 云南省昭通市镇雄县产金钗石斛(S5~S8)醇提取物次之, 四川省乐山市夹江县产金钗石斛(S9~S12)醇提取物则相对较弱, 详见表3。

表3 12批不同产地金钗石斛醇提取物对RAW264.7巨噬细胞培养液中IL-4、IL-6含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Effects of ethanol extracts from 12 batches of *D. nobile* from different habitats on the contents of IL-4 and IL-6 in RAW264.7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	IL-4, pg/mL	IL-6, pg/mL
正常对照组	188.16 ± 8.38	16.47 ± 2.73
模型组	703.86 ± 6.29**	123.00 ± 1.49**
地塞米松组	438.54 ± 8.42**	39.59 ± 0.45**
金钗石斛S1醇提取物组	448.03 ± 11.41**	74.85 ± 0.79**
金钗石斛S2醇提取物组	490.96 ± 14.57**	77.80 ± 1.91**
金钗石斛S3醇提取物组	491.20 ± 30.91**	82.42 ± 2.18**
金钗石斛S4醇提取物组	501.25 ± 11.84**	62.93 ± 7.52**
金钗石斛S5醇提取物组	616.44 ± 10.75*	93.66 ± 0.75*
金钗石斛S6醇提取物组	618.74 ± 9.37*	86.15 ± 1.41**
金钗石斛S7醇提取物组	627.79 ± 2.69*	83.87 ± 2.70**
金钗石斛S8醇提取物组	585.96 ± 9.92**	84.71 ± 6.61**
金钗石斛S9醇提取物组	635.75 ± 7.81*	117.83 ± 1.48
金钗石斛S10醇提取物组	623.63 ± 8.37**	112.02 ± 1.28*
金钗石斛S11醇提取物组	617.22 ± 25.70**	117.34 ± 2.21
金钗石斛S12醇提取物组	653.44 ± 5.07*	120.28 ± 1.33

注: 与正常对照组比较, \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

## 2.3 谱效关系分析

2.3.1 抗炎指标的数据转化 将“2.2.2”项下RAW264.7巨噬细胞培养液中IL-4、IL-6含量按以下公式进行数据转化: IL-4抑制率=[1-(给药组IL-4含量-正常对照组IL-4含量)/(模型组IL-4含量-正常对照组IL-4含量)]×100%; IL-6抑制率=[1-(给药组IL-6含量-正常对照组IL-6含量)/(模型组IL-6含量-正常对照组IL-6含量)]×100%。抗炎指标的数据转化结果见表4。

表4 抗炎指标的数据转化结果(%)

Tab 4 Data transformation results of anti-inflammatory indexes(%)

组别	IL-4抑制率	IL-6抑制率
金钗石斛S1醇提取物组	49.61	45.23
金钗石斛S2醇提取物组	41.28	42.47
金钗石斛S3醇提取物组	39.29	56.42
金钗石斛S4醇提取物组	41.24	38.14
金钗石斛S5醇提取物组	16.95	27.59
金钗石斛S6醇提取物组	16.51	34.63
金钗石斛S7醇提取物组	17.75	36.78
金钗石斛S8醇提取物组	22.86	35.98
金钗石斛S9醇提取物组	13.21	4.91
金钗石斛S10醇提取物组	15.56	10.37
金钗石斛S11醇提取物组	16.80	10.75
金钗石斛S12醇提取物组	9.78	2.62

2.3.2 数据处理 采用均值法将“2.3.1”项下12批金钗石斛醇提取物的抗炎活性指标的转化数据与其共有峰峰面积数据进行归一化处理<sup>[18-19]</sup>。将归一化后的抗炎活性指标设置为母序列 $Y_{(k)}$ , 18个共有峰归一化后峰面积设置为子序列为 $X_i$ ( $i$ 表示共有峰编号1、2、3……18), 然后计算母序列与子序列的灰色关联系数 $A_{i(k)}$ :  $A_{i(k)} = [\Delta i_{(k)\min} + \rho \times \Delta i_{(k)\max}] / [\Delta i_{(k)} + \rho \times \Delta i_{(k)\max}]$ , 其中 $\Delta i_{(k)} = |Y_{(k)} - X_i|$ , 分辨系数 $\rho$ 为0.5。

2.3.3 灰色关联度分析 根据“2.3.2”项下得到的数据, 采用灰色关联度分析法计算母序列与子序列的灰色关联系数 $A_{i(k)}$ 的平均值, 即关联度。当关联度大于0.8, 则表示母序列与子序列关联度较大; 当关联度介于0.6~0.8之间, 则表示两者关联度一般; 当关联度小于0.6, 则表示两者关联度较小<sup>[19]</sup>。结果显示, 12批金钗石斛醇提取物的18个共有峰与IL-4含量的关联度为0.503 4~0.815 8, 除4、18号峰外, 其余共有峰与IL-4含量的关联度均大于0.6, 且5、7号峰与IL-4含量的关联度均大于0.8; 12批金钗石斛醇提取物的18个共有峰与IL-6含量的关联度为0.554 0~0.844 0, 除9、14、4、3、18号峰外, 其余共有峰与IL-6含量的关联度均大于0.6, 且1、12、13号峰与IL-6含量的关联度均大于0.8, 详见表5、表6。

## 3 讨论

本研究基于12批金钗石斛醇提取物HPLC指纹图谱与其抗炎作用的谱效关系, 初步揭示了不同产地金钗石斛内在质量的差异以及潜在的抗炎作用成分。由指纹

表5 金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱共有峰与 IL-4 含量的关联度

Tab 5 Correlation degree between common peaks in HPLC fingerprint of *D. nobile* and the content of IL-4

共有峰编号	关联度	共有峰编号	关联度
7	0.815 8	12	0.705 0
5	0.809 6	16	0.702 5
1	0.798 6	11	0.666 0
6	0.785 2	17	0.651 3
13	0.760 9	14	0.637 4
2	0.729 6	9	0.612 8
8	0.729 2	3	0.608 3
15	0.710 9	4	0.549 6
10	0.710 2	18	0.503 4

表6 金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱共有峰与 IL-6 含量的关联度

Tab 6 Correlation degree between common peaks in HPLC fingerprint of *D. nobile* and the content of IL-6

共有峰编号	关联度	共有峰编号	关联度
1	0.844 0	17	0.670 0
13	0.819 4	15	0.631 8
12	0.812 5	8	0.625 1
7	0.776 0	16	0.609 7
10	0.767 8	9	0.578 0
6	0.759 7	14	0.569 3
5	0.746 5	4	0.555 2
11	0.693 3	3	0.555 0
2	0.683 2	18	0.554 0

图谱可知,12批不同产地金钗石斛醇提物中有18个共有峰,并指出12号色谱峰为石斛酚。由相似度评价结果可知,四川省乐山市夹江县、贵州省赤水市、云南省昭通市镇雄县这3个产区的金钗石斛醇提物的相似度较高,均不低于0.9,表明各产地的金钗石斛所含成分一致性较好。

本研究进一步研究了12批不同产地金钗石斛醇提物对脂多糖诱导的炎症模型RAW264.7巨噬细胞的抗炎作用,发现贵州省赤水市产金钗石斛(S1~S4)和云南省昭通市镇雄县产金钗石斛(S5~S8)对细胞中炎症因子IL-4、IL-6具有较强的抑制作用;四川省乐山市夹江县产金钗石斛(S9~S12)也能降低细胞中IL-4、IL-6水平,但其抑制作用相对较弱。这表明不同产地金钗石斛所含成分在一致性较好的情况下,其内在质量仍有可能存在差异。由此笔者推测,这种差异可能与不同产地的气候条件、土壤酸碱度、微量元素、植株根际细菌多样性等因素有关<sup>[20]</sup>。

通过灰色关联度分析发现,本研究建立的12批金钗石斛醇提物 HPLC 指纹图谱的共有峰中,除4、18号峰外,其余共有峰与IL-4含量的关联度均大于0.6,且5、7号峰与IL-4含量的关联度均大于0.8;除9、14、4、3、18号峰外,其余共有峰与IL-6含量的关联度均大于0.6,且1、

12、13号峰与IL-6含量的关联度均大于0.8。由此说明,金钗石斛醇提物发挥抗炎作用的基础可能是其各共有峰所代表的化学成分共同作用的结果。

综上所述,本研究建立了12批不同产地金钗石斛醇提物的HPLC指纹图谱,其中5、7号峰所代表的成分与抗炎指标IL-4的关联度较大,1、12、13号峰与抗炎指标IL-6的关联度较大,由此推测,1、5、7、12(石斛酚)、13号峰所代表的化学成分可能是金钗石斛潜在的抗炎药效成分。后续本课题组将完善上述共有峰的指认和鉴定,从而进一步明确金钗石斛抗炎作用的药效物质,以期为该药材的整体质量控制提供依据。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:94.
- [2] 张雪琴,赵庭梅,刘静,等.石斛化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2018,49(13):3174-3182.
- [3] 虞泓,屈燕,陈心启.石斛酚含片清咽润喉功效的研究[J].云南大学学报(自然科学版),2005,27(5):440-445.
- [4] KIM J H, OH S Y, HAN S B, et al. Anti-inflammatory effects of *Dendrobium nobile* derived phenanthrenes in LPS-stimulated murine macrophages[J]. Arch Pharm Res, 2015,38(6):1117-1126.
- [5] 林牧,龚其海,吴芹,等.金钗石斛多糖对大鼠混合培养表皮细胞炎症相关因子表达的抑制作用[J].中药新药杂志,2016,25(24):2843-2846.
- [6] 何冬梅,王海,陈金龙,等.中药微生态与中药道地性[J].中国中药杂志,2020,45(2):290-302.
- [7] 黄林芳,张翔,陈士林.道地药材品质生态学研究进展[J].世界科学技术(中医药现代化),2019,21(5):844-853.
- [8] FAN Q, YANG R, YANG F, et al. Spectrum-effect relationship between HPLC fingerprints and antioxidant activity of *Angelica sinensis*[J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34(2):e4707.
- [9] LIU H, ZHU S, LIU Q, et al. Spectrum-effect relationship study between HPLC fingerprints and antioxidant of honeysuckle extract[J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(10):e4583.
- [10] 李毛加,沙玉茹,罗晓敏,等.基于谱效关联分析筛选竹叶椒挥发油抗菌质量标志物[J/OL].中草药,2021(2021-05-26) [2021-06-06].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1108.r.20210527.1414.006.html>.
- [11] 刘谊民,许婷,张黄琴,等.基于谱效关系和网络药理学的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制探索[J/OL].中国实验方剂学杂志,2021(2021-05-26) [2021-06-06].<https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfx.20210917>.
- [12] 侯小涛,陈晓璐,郝二伟,等.基于谱效关系的肉桂改善肾阳虚作用的质量标志物(Q-Marker)研究[J].中草药,2021,52(9):2597-2607.
- [13] JI S H, LEE S A, HONG S S, et al. Phenanthrenes from *Dendrobium nobile*. and their inhibition of the LPS-in-

# 烟管头草水提物对前列腺癌PC3细胞增殖、迁移与侵袭的影响<sup>Δ</sup>

刘波<sup>1,2\*</sup>, 余佳<sup>1,3</sup>, 王坤<sup>3</sup>, 晏晨<sup>4</sup>, 黄丽荣<sup>5</sup>, 骆衡<sup>1,3#</sup>(1. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 4. 安顺市人民医院药剂科, 贵州安顺 561000; 5. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵阳 550003)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)15-1830-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.15.07



**摘要** 目的:研究烟管头草水提物(AECC)对前列腺癌PC3细胞增殖、迁移与侵袭的影响。方法:将细胞分为对照组和AECC不同质量浓度组(5、10、20、40、80 μg/L),加入相应药物或培养基培养不同时间(24、48、72 h)后,检测细胞存活率。将细胞分为对照组和AECC低、中、高质量浓度组(20、40、80 μg/L),同法培养24 h后,采用Hoechst 33258染色法和流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况;采用Transwell实验检测细胞迁移数和侵袭数;采用实时荧光定量聚合酶链式反应和Western blot法检测AECC低、中质量浓度组细胞中β-连环蛋白(β-catenin)信号通路相关迁移与凋亡蛋白[β-catenin、基质金属蛋白酶7(MMP-7)、髓细胞淋巴瘤病毒致癌基因(c-Myc)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)]的mRNA和蛋白表达水平。结果:随着给药浓度的增加和作用时间的延长,AECC不同质量浓度组细胞存活率均显著低于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),且呈不断降低趋势。与对照组比较,AECC各质量浓度组细胞的早期凋亡率(中质量浓度组除外),细胞迁移数和侵袭数,以及AECC低、中质量浓度组细胞中MMP-7、c-Myc(低质量浓度组除外)、Bcl-2(低质量浓度组mRNA除外)的mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );AECC各质量浓度组细胞的晚期凋亡率,AECC低、中质量浓度组细胞中β-catenin、caspases-3(低质量浓度组除外)、Bax(低质量浓度组mRNA除外)的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论:AECC可抑制PC3细胞的增殖、迁移与侵袭,其作用机制可能与调控β-catenin信号通路相关的迁移与凋亡因子的表达有关。

**关键词** 烟管头草;前列腺癌PC3细胞;β-连环蛋白;增殖;迁移;侵袭

## Effects of Water Extract from *Carpesium cernuum* on Proliferation, Metastasis and Invasion of Prostate Cancer PC3 Cells

LIU Bo<sup>1,2</sup>, YU Jia<sup>1,3</sup>, WANG Kun<sup>3</sup>, YAN Chen<sup>4</sup>, HUANG Lirong<sup>5</sup>, LUO Heng<sup>1,3</sup>(1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 4. Dept. of Pharmacy, Anshun Municipal People's Hospital, Guizhou Anshun 561000, China; 5. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

- duced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(12): 3785-3787.
- [14] 许莉.金钗石斛化学成分及其应用研究[D].成都:成都中医药大学,2015.
- [15] 唐蕾,吴坚,于顾然,等.益气养阴逐瘀方对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型体外抗炎活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):141-148.
- [16] 张赞,黄逯,张慧,等.壮药玉叶金花抗炎镇痛作用的谱效关系研究[J].中国药理学通报,2020,36(6):870-874.
- [17] 刘曼,张红霞,周璐,等.受体相互作用蛋白3介导自身免疫性肝炎肝脏单核细胞来源巨噬细胞募集[J].中华消化杂志,2021,41(1):35-42.
- [18] 刘雯,刘云,刘进宝,等.基于灰色关联分析的藤茶不同极性部位在小鼠体内抗炎作用的谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(19):2382-2386.
- [19] 阮沛桦,邓红,傅咏梅,等.基于灰色关联度的叠鞘石斛叶抗氧化部位的筛选[J].热带作物学报,2020,41(8):1700-1707.
- [20] 安忠琦,詹伟,吴庆珊,等.金钗石斛根际可培养细菌多样性及抑菌活性研究[J].云南大学学报(自然科学版),2018,40(3):586-602.

Δ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合支撑[2020]4Y161号, No.黔科合基础[2016]1069)

\* 硕士研究生。研究方向:中药民族药活性。E-mail:liu041213207@163.com

# 通信作者:研究员,硕士生导师,博士。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:luoheng@gzcnpcn

(收稿日期:2021-04-25 修回日期:2021-06-07)  
(编辑:唐晓莲)