

基于谱效关系的地菍石油醚提取物抗炎活性物质基础研究[△]

罗仕西^{1*}, 麻秀萍^{1,2,3#}, 刘静¹, 熊武青¹, 孙庆文¹, 丁宁¹(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心/贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵州中医药大学茶+大健康食品开发研究中心, 贵阳 550025)

中图分类号 R917; R284

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2024)23-2877-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.23.07



摘要 目的 建立地菍石油醚提取物的指纹图谱,并结合细胞药效学实验探究其抗炎活性物质基础。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》生成20批地菍石油醚提取物的指纹图谱,并进行相似度评价和共有峰指认;建立脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞RAW264.7炎症模型,以一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的抑制率为指标,考察地菍石油醚提取物的抗炎活性,并运用灰色关联度法、偏最小二乘回归分析法进行谱效关系研究;采用分子对接验证抗炎活性成分与TNF-α、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白质受体的结合活性。结果 20批地菍石油醚提取物的指纹图谱中有19个共有峰,20批样品的相似度为0.603~0.990;指认了牡荆素(5号峰)、异牡荆素(6号峰)、鞣花酸(7号峰)、槲皮素(9号峰)、木犀草素(10号峰)5个成分。地菍石油醚提取物19个共有峰与NO、TNF-α抑制率的关联度均大于0.7,峰19、13、9(槲皮素)、12、5(牡荆素)、6(异牡荆素)、8、7(鞣花酸)、18、1与NO抑制率呈正相关;峰8、10(木犀草素)、13、15、3、19、17、7(鞣花酸)、18、1与TNF-α抑制率呈正相关。牡荆素、异牡荆素、槲皮素与iNOS蛋白质受体的结合能均小于-5.0 kcal/mol。**结论** 牡荆素、异牡荆素、槲皮素可能是地菍石油醚提取物发挥抗炎作用的药效物质基础。

关键词 地菍; 石油醚提取物; 指纹图谱; 抗炎; 谱效关系

Fundamental study on the anti-inflammatory activity of the petroleum ether extract from *Melastoma dodecandrum* based on spectrum-effect relationship

LUO Shixi¹, MA Xiuping^{1,2,3}, LIU Jing¹, XIONG Wuqing¹, SUN Qingwen¹, DING Ning¹(1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. National Miao Medicine Engineering Technology Research Center/Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Center, Guiyang 550025, China; 3. Tea+Big Health Food Development and Research Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To explore the material basis of the anti-inflammatory effect of the petroleum ether extract from *Melastoma dodecandrum* by establishing its fingerprint and combining it with cellular pharmacodynamics experiments. **METHODS** HPLC method was adopted; the fingerprints of 20 batches of petroleum ether extract from *M. dodecandrum* were drawn using *The Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition)*; similarity evaluation and common peak identification were carried out. The lipopolysaccharide-induced inflammation model of mice mononuclear macrophages (RAW264.7) was established; the inhibitory rates of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor α (TNF-α) were used as indexes to investigate the anti-inflammatory activity of the petroleum ether extract from *M. dodecandrum*; grey correlation degree method and partial least square regression analysis were adopted to study the spectrum-effect relationship. Molecular docking was used to validate the binding activity of the anti-inflammatory active ingredients with TNF-α and iNOS protein receptor. **RESULTS** There were 19 common peaks in the fingerprint of the petroleum ether extract from *M. dodecandrum*, the similarity of 20 batches of samples ranged from 0.603-0.990, and five components were identified, such as vitexin (peak 5), isovitexin (peak 6), ellagic acid (peak 7), quercetin (peak 9) and luteolin (peak 10). The grey correlation degree between 19 common peaks of the petroleum ether extract from *M. dodecandrum* and the inhibition rates of NO and TNF-α were all greater than 0.7; peaks 19, 13, 9 (quercetin), 12, 5 (vitexin), 6 (isovitexin), 8, 7 (ellagic acid), 18, 1 were positively correlated with NO inhibition rate, and peaks 8, 10 (luteolin), 13, 15, 3, 19, 17, 7 (ellagic acid), 18, 1 were positively correlated with inhibition rate of TNF-α. The binding

△基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 82460850);贵州省中央引导地方科技发展资金项目(No.黔科中引地〔2022〕4016);贵州省教育厅滚动支持省属高校科研平台团队项目(No.黔教技〔2022〕022号)

*第一作者 硕士研究生。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研究。E-mail:13765463921@163.com

#通信作者 教授,硕士生导师。研究方向:中药及民族药质量控制及新药研究。E-mail:mxp001130@sina.com

energies of vitexin, isovitexin and quercetin with iNOS protein receptor were less than -5.0 kcal/mol. **CONCLUSIONS** Vitexin, isovitexin and quercetin may be the basis of the anti-inflammatory effect of the petroleum ether extract from *M. dodecandrum*.

KEYWORDS *Melastoma dodecandrum*; petroleum ether extract; fingerprint; anti-inflammatory; spectrum-effect relationship

地菍为野牡丹科植物地菍 *Melastoma dodecandrum* Lour. 的全草, 又名嘎狗噜, 是畲族特色药, 其性凉, 味甘、涩, 具有活血止血、清热解毒的功效, 临幊上常用于治疗高热、咽喉肿痛、黄疸、水肿、痛经、崩漏、带下、痔疮、毒蛇咬伤等病症^[1]。目前, 研究者已从地菍中分离鉴定出了170余种化合物, 主要包括有机酸、脂肪酸、挥发油、黄酮以及鞣质类等成分, 其中黄酮类化合物占地菍总化学成分的22%^[2-3]。研究表明, 地菍具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、止血、降血糖等药理作用^[4-5], 但具体是其中哪些化学成分发挥治疗作用尚不明确。

中药谱效关系是在中药指纹图谱的基础上, 将中药指纹图谱中化学成分的变化与中药药效结合起来, 建立“谱-效”数学模型, 筛选出与药效关系密切的特征峰, 阐明中药发挥药效的物质基础^[6]。本课题组前期研究发现, 地菍石油醚提取物具有一定抗炎作用, 在此基础上, 笔者采用高效液相色谱(HPLC)法建立20批地菍石油醚提取物指纹图谱, 然后以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导RAW264.7细胞建立炎症模型, 考察地菍石油醚提取物对炎症指标一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的影响, 进而采用灰色关联度法、偏最小二乘回归分析法研究其抗炎谱效关系, 并结合分子对接技术验证其抗炎活性成分, 从而为地菍石油醚提取物的抗炎活性物质基础研究和应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Essentia LC-16型HPLC仪(日本Shimadzu公司), FA2204N型万分之一分析天平(上海菁海仪器有限公司), BB150型CO₂培养箱、1530型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), CJV1500-Y型洁净工作台(山东新华医疗器械股份有限公司), CKX53型倒置相差显微镜(上海蛮吉光电科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸(批号110831-201906, 纯度91.5%)、原儿茶酸(批号110809-201906, 纯度97.7%)、牡荆素(批号111687-201704, 纯度94.9%)、鞣花酸(批号111959-201903, 纯度88.85%)、山柰素(批号110861-202013, 纯度93.2%)、木犀草素(批号111520-202006, 纯度94.9%)、槲皮素(批号100081-201610, 纯度99.1%)、阿魏酸(批号110773-201915, 纯度99.4%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 异牡荆素对照品(批号C101499-201219, 纯度98.0%)购自贵州迪大生物科技有限责任公司; LPS(批号93572-42-0)购自美国Sigma公司; DMEM培养基(批号8122576)、青霉素-链霉素(批号15140-122)均购自美国Gibco公司; 胎牛血清(批号2148389)购自以色列BI公司; 二甲基亚砜(批号401Q037)购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8试剂盒(批号KA223173)购自上

海陶术生物科技有限公司; NO试剂盒(批号S0021S-3)购自上海碧云天生物科技有限公司; TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号E-EL-M3063)购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

20批地菍药材(编号S1~S20)采集于贵州、广东、广西、湖南、浙江等地, 由贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定均为野牡丹科植物地菍 *M. dodecandrum* Lour. 的全草, 地菍药材来源信息见表1。

表1 地菍药材来源信息表

编号	产地	采收日期	编号	产地	采收日期
S1	贵州省黔南布依族苗族自治州	2020年7月	S11	湖南省永州市	2021年7月
S2	贵州省黔南布依族苗族自治州	2020年7月	S12	广东省揭阳市	2021年7月
S3	贵州省黔东南苗族侗族自治州	2018年7月	S13	贵州省贵阳市	2022年7月
S4	贵州省黔南布依族苗族自治州	2020年11月	S14	浙江省温州市	2022年7月
S5	贵州省黔南布依族苗族自治州	2020年11月	S15	广西壮族自治区玉林市	2022年7月
S6	贵州省黔南布依族苗族自治州	2020年11月	S16	贵州省黔南布依族苗族自治州	2022年7月
S7	浙江省台州市温岭市	2021年7月	S17	贵州省贵阳市	2022年7月
S8	广西壮族自治区河池市	2021年7月	S18	广东省茂名市	2022年7月
S9	广西壮族自治区钦州市	2021年7月	S19	广西壮族自治区钦州市	2022年7月
S10	广西壮族自治区玉林市	2021年7月	S20	福建省宁德市	2022年7月

1.3 细胞

小鼠RAW264.7单核巨噬细胞(批号CL-0190)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 地菍石油醚提取物HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

采用NanochromCore AQ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m)色谱柱, 以0.1%磷酸(A)-甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 10% B; 3~13 min, 10% B→20% B; 13~20 min, 20% B→25% B; 20~30 min, 25% B→30% B; 30~40 min, 30% B→35% B; 40~50 min, 35% B→45% B; 50~70 min, 45% B→70% B; 70~85 min, 70% B→80% B; 85~95 min, 80% B→85% B; 95~110 min, 85% B→95% B; 110~115 min, 95% B; 115~120 min, 95% B→100% B; 120~130 min, 100% B); 流速为1 mL/min; 柱温为35 °C; 检测波长为260 nm; 进样体积为10 μ L。

2.1.2 供试品溶液的制备

取地菍药材粗粉0.15 kg, 加入14倍量的95%乙醇水浴回流2次, 每次1 h; 合并滤液, 浓缩成浸膏(9.83 g)。浸膏加水混悬, 用石油醚萃取至无色, 所得萃取液减压浓缩, 水浴挥干溶剂, 即得地菍石油醚提取物(得率为1.47%)。精密称取地菍石油醚提取物0.1 g, 置于10 mL容量瓶中, 加甲醇超声溶解后, 用甲醇定容, 采用0.45 μ m微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.3 混合对照品溶液的制备

取原儿茶酸、阿魏酸、没食子酸、牡荆素、异牡荆素、鞣花酸、槲皮素、木犀草素、山柰素对照品适量, 置于同一容量瓶中, 加甲醇制成各成分质量浓度分别为4.60、

20.74、7.78、22.60、30.15、21.42、15.00、12.53、6.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度试验: 取同一批地菍药材(编号 S16), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 以峰6(异牡荆素)为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.02%~0.12%、1.03%~2.99%($n=6$), 表明方法精密度良好。

(2) 稳定性试验: 取同一批地菍药材(编号 S16), 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温放置0、2.5、5、7.5、10、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 以峰6(异牡荆素)为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.09%~0.18%、1.46%~2.98%($n=6$), 表明该供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

(3) 重复性试验: 取同一批地菍药材(编号 S16)6份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 以峰6(异牡荆素)为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间及相对峰面积的RSD分别为0.02%~0.06%、1.58%~3.26%($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.1.5 地菍石油醚提取物HPLC指纹图谱的生成

将20批地菍药材按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》, 以样品S16的图谱为参照图谱, 采用中位数法, 设置时间窗宽度为0.3 min, 进行多点校正后得到HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R。结果显示, 共确定了19个共有峰, 详见图1。

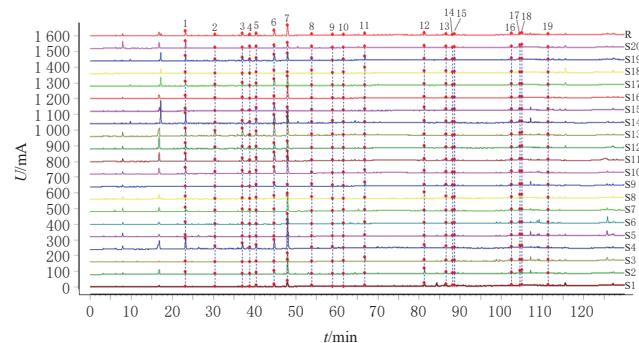
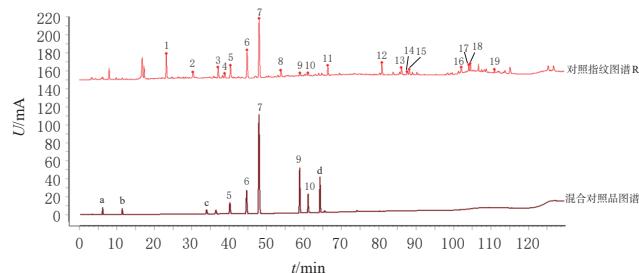


图1 20批地菍石油醚提取物的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱R

2.1.6 共有峰的指认

取“2.1.3”项下混合对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将对照指纹图谱R与混合对照品溶液的图谱进行比对, 共指认出5个成分, 分别为牡荆素(5号峰)、异牡荆素(6号峰)、鞣花酸(7号峰)、槲皮素(9号峰)、木犀草素(10号峰)。结果见图2。



a:没食子酸;b:原儿茶酸;c:阿魏酸;5:牡荆素;6:异牡荆素;7:鞣花酸;9:槲皮素;10:木犀草素;d:山柰素。

图2 对照指纹图谱R及混合对照品的叠加图谱

2.1.7 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对20批地菍石油醚提取物的图谱进行相似度评价。结果显示, 20批地菍石油醚提取物图谱与对照指纹图谱R之间的相似度分别为0.917、0.971、0.910、0.939、0.925、0.927、0.973、0.837、0.644、0.990、0.905、0.943、0.941、0.930、0.771、0.975、0.945、0.603、0.904、0.873, 表明不同批次地菍石油醚提取物间化学成分及含量存在差异; 其中编号S9、S15、S18的样品提取物图谱与对照指纹图谱R的相似度均低于0.8。进一步分析发现, 这3批样品提取物图谱中7号峰(鞣花酸)峰面积均小于6号峰(异牡荆素), 而其余各批次样品提取物图谱中7号峰峰面积均大于6号峰, 这提示鞣花酸、异牡荆素可能是影响地菍石油醚提取物质量的差异物。

2.2 地菍石油醚提取物对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞的抗炎作用考察

2.2.1 受试样品的制备

精密称定地菍石油醚提取物20 mg, 加入500 μL 二甲基亚砜, 配制成质量浓度为40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 实验时用DMEM培养基稀释至所需浓度。

2.2.2 细胞培养

将RAW264.7细胞复苏于培养瓶中, 在37 °C、5%CO₂培养箱中培养, 当细胞生长密度为80%左右时进行传代。

2.2.3 细胞活力检测

取20批地菍石油醚提取物适量, 分别配制成质量浓度为2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液。取对数生长期的RAW264.7细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL并接种于96孔板中, 每孔100 μL , 于37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h。分别设置对照组、给药组及空白组(不含细胞), 对照组及空白组加入DMEM培养基100 μL , 给药组给予不同质量浓度(2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 浓度根据前期预实验结果设置)的石油醚提取物, 每组设置6个复孔。培养24 h后, 加入CCK-8溶液10 μL , 培养2 h。然后在450 nm波长下检测吸光度(A)值, 并计算细胞存活率: 细胞存活率 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。结果见表2。

表2 不同质量浓度地葱石油醚提取物对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

编号	2.5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{g/mL}$
S1	98.32 \pm 0.09	108.04 \pm 0.05	99.50 \pm 0.19	44.97 \pm 0.17	11.42 \pm 0.09
S2	110.81 \pm 0.07	113.18 \pm 0.08	94.25 \pm 0.14	49.14 \pm 0.52	20.38 \pm 0.04
S3	79.37 \pm 0.09	83.02 \pm 0.12	44.51 \pm 0.14	7.11 \pm 0.04	11.73 \pm 0.03
S4	99.03 \pm 0.06	103.75 \pm 0.17	99.11 \pm 0.10	72.10 \pm 0.14	34.17 \pm 0.04
S5	72.71 \pm 0.07	105.13 \pm 0.07	106.19 \pm 0.03	67.69 \pm 0.04	55.35 \pm 0.12
S6	95.01 \pm 0.06	83.32 \pm 0.08	81.05 \pm 0.06	57.42 \pm 0.15	35.35 \pm 0.08
S7	107.03 \pm 0.07	97.90 \pm 0.10	98.01 \pm 0.10	79.35 \pm 0.14	39.98 \pm 0.06
S8	78.28 \pm 0.04	93.14 \pm 0.08	88.46 \pm 0.10	49.94 \pm 0.12	25.14 \pm 0.04
S9	105.36 \pm 0.11	100.50 \pm 0.10	91.79 \pm 0.13	56.56 \pm 0.02	29.30 \pm 0.26
S10	110.10 \pm 0.18	98.41 \pm 0.09	38.09 \pm 0.07	54.52 \pm 0.06	37.66 \pm 0.06
S11	107.48 \pm 0.07	97.69 \pm 0.10	102.81 \pm 0.10	69.56 \pm 0.14	35.31 \pm 0.05
S12	92.80 \pm 0.07	101.30 \pm 0.04	77.78 \pm 0.15	68.40 \pm 0.14	37.23 \pm 0.01
S13	92.62 \pm 0.04	96.80 \pm 0.04	93.11 \pm 0.04	77.01 \pm 0.08	39.38 \pm 0.05
S14	63.98 \pm 0.07	110.95 \pm 0.08	123.73 \pm 0.09	101.76 \pm 0.07	40.08 \pm 0.11
S15	92.56 \pm 0.04	99.67 \pm 0.05	91.45 \pm 0.09	71.05 \pm 0.11	39.26 \pm 0.03
S16	109.39 \pm 0.13	108.99 \pm 0.23	78.93 \pm 0.10	64.33 \pm 0.30	42.27 \pm 0.07
S17	107.79 \pm 0.08	101.81 \pm 0.14	94.83 \pm 0.15	69.22 \pm 0.13	28.12 \pm 0.07
S18	88.98 \pm 0.08	91.71 \pm 0.07	119.19 \pm 0.06	56.40 \pm 0.12	41.30 \pm 0.06
S19	116.81 \pm 0.23	91.53 \pm 0.11	89.32 \pm 0.22	50.85 \pm 0.07	23.11 \pm 0.04
S20	98.66 \pm 0.16	94.15 \pm 0.14	90.57 \pm 0.07	75.94 \pm 0.11	35.45 \pm 0.12
平均值	96.35	99.05	90.13	62.17	33.10

由表2可知,当地葱石油醚提取物给药质量浓度为2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞平均存活率分别为96.35%、99.05%、90.13%、62.17%、33.10%;当给药质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞平均存活率虽达90.13%,但在该给药质量浓度下,编号S3、S10样品提取物作用后的细胞存活率均较低,分别为44.51%、38.09%。综合考虑20批石油醚提取物对细胞存活率的影响,选择给药质量浓度5 $\mu\text{g/mL}$ 进行后续实验。

2.2.4 地葱石油醚提取物对细胞NO释放量的影响

取对数生长期RAW264.7细胞,调整细胞密度为 6×10^5 个/ mL 并接种于96孔板中,每孔100 μL ,于37 $^\circ\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培养24 h。实验设置正常组、模型组、给药组(分别命名为地葱石油醚提取物S1~S20组)。正常组仅加入细胞培养基,模型组加入1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS,给药组加入1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS和5 $\mu\text{g/mL}$ 的地葱石油醚提取物,每组设置4个复孔。药物/培养基干预24 h后,取细胞培养液,按照NO试剂盒说明书方法检测细胞培养液中NO含量,并计算NO抑制率。NO抑制率=(模型组细胞培养液中NO含量-给药组细胞培养液中NO含量)/模型组细胞培养液中NO含量×100%。采用SPSS 26.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 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,检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果见表3。由表3可知,与正常组比较,模型组细胞培养液中NO含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各地葱石油醚提取物给药组细胞培养液中NO含量均显著降低($P<0.01$)。NO抑制率在27.98%~43.59%之间。

表3 各组细胞培养液中NO含量和NO抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	NO含量/(mmol/mL)	NO抑制率/%	组别	NO含量/(mmol/mL)	NO抑制率/%
正常组	0.29 \pm 0.10	—	地葱石油醚提取物S10组	35.21 \pm 2.26 ^a	33.18
模型组	52.70 \pm 4.95 ^a	—	地葱石油醚提取物S11组	36.19 \pm 1.31 ^b	31.33
地葱石油醚提取物S1组	29.73 \pm 1.83 ^b	43.59	地葱石油醚提取物S12组	32.99 \pm 1.23 ^b	37.41
地葱石油醚提取物S2组	33.16 \pm 2.08 ^b	37.08	地葱石油醚提取物S13组	33.65 \pm 1.08 ^b	36.14
地葱石油醚提取物S3组	34.91 \pm 0.92 ^b	33.76	地葱石油醚提取物S14组	31.58 \pm 4.74 ^b	40.07
地葱石油醚提取物S4组	33.94 \pm 2.33 ^b	35.61	地葱石油醚提取物S15组	33.25 \pm 2.66 ^b	36.91
地葱石油醚提取物S5组	33.00 \pm 2.22 ^b	37.38	地葱石油醚提取物S16组	33.99 \pm 2.11 ^b	35.51
地葱石油醚提取物S6组	32.84 \pm 1.52 ^b	37.69	地葱石油醚提取物S17组	33.38 \pm 0.83 ^b	36.66
地葱石油醚提取物S7组	37.95 \pm 0.65 ^b	27.98	地葱石油醚提取物S18组	33.66 \pm 6.30 ^b	36.13
地葱石油醚提取物S8组	35.34 \pm 2.88 ^b	32.94	地葱石油醚提取物S19组	35.15 \pm 1.91 ^b	33.30
地葱石油醚提取物S9组	34.50 \pm 1.23 ^b	34.53	地葱石油醚提取物S20组	32.89 \pm 5.25 ^b	37.59

a:与正常组相比, $P<0.01$;b:与模型组相比, $P<0.01$ 。

2.2.5 地葱石油醚提取物对细胞TNF- α 释放量的影响

取对数生长期RAW264.7细胞,调整细胞密度为 2×10^5 个/ mL 并接种于24孔板中,每孔500 μL ,于37 $^\circ\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培养24 h。按“2.2.4”项下方法分组、给药及干预,每组设置4个复孔。干预24 h后,取各组细胞上清液,按照ELISA试剂盒说明书方法检测细胞培养液中TNF- α 含量,并计算TNF- α 抑制率。TNF- α 抑制率=(模型组细胞培养液中TNF- α 含量-给药组细胞培养液中TNF- α 含量)/模型组细胞培养液中TNF- α 含量×100%。数据按“2.2.4”项下统计学方法处理。结果见表4。由表4可知,与正常组比较,模型组细胞培养液中TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地葱石油醚提取物各给药组(地葱石油醚提取物S3组除外)细胞培养液中TNF- α 含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。TNF- α 抑制率在18.15%~82.83%之间。

表4 各组细胞培养液中TNF- α 含量和TNF- α 抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	TNF- α 含量/(ng/mL)	TNF- α 抑制率/%	组别	TNF- α 含量/(ng/mL)	TNF- α 抑制率/%
正常组	0.09 \pm 0.02	—	地葱石油醚提取物S10组	41.49 \pm 13.12 ^a	52.86
模型组	89.07 \pm 13.65 ^a	—	地葱石油醚提取物S11组	30.53 \pm 5.48 ^b	65.73
地葱石油醚提取物S1组	24.68 \pm 3.01 ^b	72.29	地葱石油醚提取物S12组	34.13 \pm 13.65 ^b	61.68
地葱石油醚提取物S2组	33.81 \pm 18.79 ^b	62.04	地葱石油醚提取物S13组	44.13 \pm 8.66 ^b	50.47
地葱石油醚提取物S3组	72.91 \pm 20.41	18.15	地葱石油醚提取物S14组	26.85 \pm 6.54 ^b	69.86
地葱石油醚提取物S4组	25.44 \pm 9.04 ^b	71.44	地葱石油醚提取物S15组	35.84 \pm 9.60 ^b	59.77
地葱石油醚提取物S5组	17.32 \pm 4.27 ^b	80.56	地葱石油醚提取物S16组	21.01 \pm 5.49 ^b	76.41
地葱石油醚提取物S6组	22.91 \pm 8.00 ^b	74.28	地葱石油醚提取物S17组	25.17 \pm 8.96 ^b	71.74
地葱石油醚提取物S7组	20.39 \pm 3.90 ^b	82.83	地葱石油醚提取物S18组	32.71 \pm 9.96 ^b	63.28
地葱石油醚提取物S8组	47.11 \pm 8.86 ^b	60.33	地葱石油醚提取物S19组	37.68 \pm 15.46 ^b	57.70
地葱石油醚提取物S9组	28.07 \pm 12.71 ^b	68.49	地葱石油醚提取物S20组	15.68 \pm 3.83 ^b	82.39

a:与正常组相比, $P<0.01$;b:与模型组相比, $P<0.01$;c:与模型组相比, $P<0.05$ 。

2.3 地葱石油醚提取物抗炎谱效关系分析

2.3.1 灰色关联度分析

灰色关联度分析是一种衡量事物或因素间关联程度的方法,在谱效关系研究中可反映共有峰对应成分对药效的贡献^[7]。本研究以NO、TNF- α 抑制率为参考序

列,以20批地葱石油醚提取物指纹图谱中19个共有峰峰面积为比较序列,计算参考序列与比较序列的灰色关联度值(即关联度),并对关联度大小进行排序,结果见表5。由表5可知,19个共有峰与NO、TNF- α 抑制率的关联度均大于0.7,具体为0.781~0.923,表明共有峰与药效指标间均有相关性^[8]。由此可得,地葱石油醚提取物的抗炎作用是多成分协同起效的,其中以峰16、15对应成分的贡献最大;关联度排名前8位的共有峰对应成分均未知,但这些成分的保留时间靠后,说明其极性相对较小,后续本课题组将进一步对其进行分离鉴定。

表5 20批地葱石油醚提取物中各共有峰与炎症因子抑制率的关联度测定结果

共有峰	与NO抑制率的 关联度	与NO抑制率的 关联度排名	与TNF- α 抑制率的 关联度	与TNF- α 抑制率的 关联度排名
峰16	0.923	1	0.901	1
峰15	0.916	2	0.900	2
峰13	0.904	3	0.872	7
峰14	0.901	4	0.882	6
峰19	0.889	5	0.885	5
峰18	0.888	6	0.887	3
峰17	0.882	7	0.887	4
峰12	0.874	8	0.850	8
峰11	0.850	9	0.825	13
峰5(牡荆素)	0.847	10	0.839	10
峰8	0.846	11	0.837	11
峰10(木犀草素)	0.844	12	0.842	9
峰7(鞣花酸)	0.840	13	0.827	12
峰6(异牡荆素)	0.830	14	0.821	14
峰1	0.818	15	0.815	16
峰4	0.808	16	0.816	15
峰2	0.790	17	0.796	17
峰3	0.786	18	0.790	18
峰9(槲皮素)	0.781	19	0.781	19

2.3.2 偏最小二乘回归分析

在偏最小二乘回归分析中,回归系数的绝对值可反映共有峰对药效指标的贡献程度,其数值越大,则贡献越大;变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值可解释自变量对因变量的贡献程度,当VIP值>1时,则表明自变量对因变量有显著贡献^[9]。本研究以20批地葱石油醚提取物指纹图谱中19个共有峰的峰面积为自变量,以NO、TNF- α 抑制率为因变量,采用SIMCA 14.1软件进行偏最小二乘回归分析,结果见图3。

结果显示,峰17、9、19、13、5(牡荆素)、6(异牡荆素)、15与NO抑制率的VIP值均大于1(图3A)。峰19、13、9(槲皮素)、12、5(牡荆素)、6(异牡荆素)、8、7(鞣花酸)、18、1与NO抑制率的标准化回归系数均大于0,提示其与NO抑制率呈正相关;其余共有峰与NO抑制率的标准化回归系数均小于0,提示其与NO抑制率呈负相关(图3B)。峰11、8、16、19、4、12、10(木犀草素)与TNF- α 抑制率的VIP值均大于1(图3C)。峰8、10(木犀草素)、13、15、3、19、17、7(鞣花酸)、18、1与TNF- α 抑制率的标准化回归系数均大于0,提示其与TNF- α 抑制率呈正相关;其余共有峰与TNF- α 抑制率的标准化回归系数均小于0,提示其与TNF- α 抑制率呈负相关(图3D)。

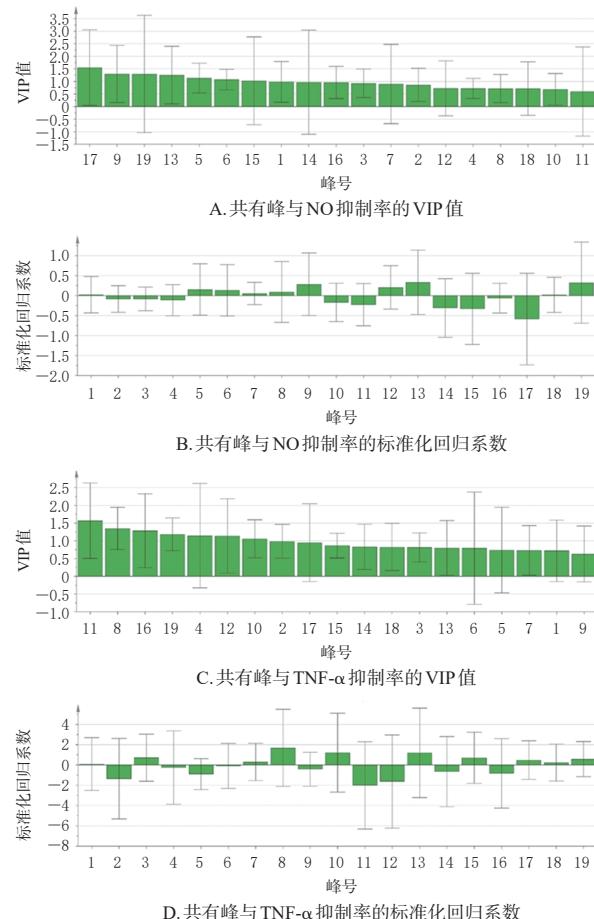


图3 共有峰与NO、TNF- α 抑制率的VIP值及标准化回归系数

呈正相关;其余共有峰与TNF- α 抑制率的标准化回归系数均小于0,提示其与TNF- α 抑制率呈负相关(图3D)。

2.4 地葱石油醚提取物抗炎活性成分验证

分子对接是一种研究小分子配体与蛋白质受体之间相互作用的理论方法,可针对某一特定的靶标蛋白,筛选出具有活性的化合物^[10-11]。通过谱效关联分析发现,牡荆素、异牡荆素、槲皮素、木犀草素均为地葱发挥抗炎活性的重要成分。牡荆素、异牡荆素、槲皮素与NO抑制率呈正相关,而诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)可高效产生NO,从而导致炎症^[12]。因此,本研究选择iNOS为靶点蛋白与牡荆素、异牡荆素、槲皮素进行分子对接。鞣花酸、木犀草素与TNF- α 抑制率呈正相关,故本研究选择TNF- α 为靶点蛋白与鞣花酸、木犀草素进行分子对接。通过TCMSP数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)查找活性成分并保存为mol2格式,在PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)中找到iNOS、TNF- α 蛋白质受体结构并保存为pdb格式,通过AutoDock Tools 1.5.7软件设置对接参数。使用Autodock Vina软件进行分子对接,并计算最低结合能。结果显示,牡荆素、异牡荆素、槲皮素与iNOS蛋白质受体的结合能均小于-5.0 kcal/mol。

3 讨论

20批地菍药材分别采自贵州、广西、广东、浙江、湖南、福建等地,这些样品的图谱与对照指纹图谱R的相似度在0.603~0.990之间,相似度低于0.8的样品主要产自广西、广东地区,9个贵州地区产样品的相似度均大于0.9。这表明样品间存在一定差异,导致该差异的原因可能与产地、生长年限、地形地貌、土壤、气候等因素有关,笔者将在后续的地菍药材质量评价中考察其生长条件。

本课题组采用灰色关联度法和偏最小二乘回归分析法对地菍石油醚提取物及其抗炎活性进行了谱效关系研究。灰色关联度结果表明,地菍石油醚提取物中19个共有峰与NO、TNF- α 抑制率的关联度均大于0.7。偏最小二乘回归分析发现,峰19、13、9(槲皮素)、12、5(牡荆素)、6(异牡荆素)、8、7(鞣花酸)、18、1与NO抑制率呈正相关,为主要药效峰;峰8、10(木犀草素)、13、15、3、19、17、7(鞣花酸)、18、1与TNF- α 抑制率呈正相关,为主要药效峰。综合2种分析方法所得结果,将关联度值大于0.7和偏最小二乘回归分析VIP值大于1,并且与NO、TNF- α 抑制率呈正相关的共有峰作为地菍抗炎活性成分。此外,本课题组将基于谱效分析筛选出的抗炎活性成分与iNOS、TNF- α 蛋白质受体进行了分子对接验证,结果发现,牡荆素、异牡荆素、槲皮素与iNOS蛋白质受体均有较好的结合活性。因此,笔者推测牡荆素、异牡荆素、槲皮素为地菍抗炎的潜在活性成分。

综上所述,本研究建立了地菍石油醚提取物的HPLC指纹图谱,20批样品化学成分一致性较好,但样品间含量存在一定差异;地菍石油醚提取物抗炎活性成分可能为牡荆素、异牡荆素、槲皮素。在后续研究中,可通过高分辨质谱及有效部位分离等手段对地菍石油醚提取物中抗炎活性相关未知峰进行成分鉴定。

参考文献

- [1] 雷后兴,李建良.中国畲药学[M].北京:人民军医出版社,2014:159.
LEI H X, LI J L. Chinese She pharmacy[M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2014:159.
- [2] WANG J F, JIA Z Y, ZHANG Z H, et al. Analysis of chemical constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. by UPLC-ESI-Q-exactive focus-MS/MS[J]. Molecules, 2017, 22(3):476.
- [3] 刘爽,毛佳乐,邱伟文,等.畲药地菍化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2024,41(7):996-1005.
LIU S, MAO J L, QIU W W, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effect of She medicine *Melastoma dodecandrum* Lour. [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2024, 41(7):996-1005.
- [4] 刘静,明惠仪,麻秀萍,等.地菍中6种成分含量测定及其与抗氧化活性的相关性分析[J].中国药房,2022,33(16):1962-1967.
LIU J, MING H Y, MA X P, et al. Content determination
- of 6 components in *Melastoma dodecandrum* and analysis of its correlation with antioxidant activity[J]. China Pharm, 2022, 33(16):1962-1967.
- [5] WENG J Y, ZHOU J K, LIANG L Q, et al. UHPLC/QTOF-MS-based metabolomics reveal the effect of *Melastoma dodecandrum* extract in type 2 diabetic rats[J]. Pharm Biol, 2019, 57(1):807-815.
- [6] 张强,杨宇婷.中药谱效关系研究现状概述[J].时珍国医国药,2022,33(3):680-683.
ZHANG Q, YANG Y T. Overview of the research status of the relationship between spectrum and effect of traditional Chinese medicine[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(3):680-683.
- [7] 林婧,梁洁,黄春燕,等.壮药华佗豆不同极性部位HPLC指纹图谱的建立及其镇痛抗炎作用的谱效关系[J].中国药房,2021,32(17):2079-2084.
LIN J, LIANG J, HUANG C Y, et al. Establishment of HPLC fingerprint of different polar parts of Zhuang medicine *Calonyction muricatum* and spectrum-effect relationship of its analgesic and anti-inflammatory effects[J]. China Pharm, 2021, 32(17):2079-2084.
- [8] 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.
HOU X T, CHEN X L, HAO E W, et al. Quality marker study of Cinnamomi Cortex on improving kidney-Yang deficiency based on spectrum-effect relationship[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(9):2597-2607.
- [9] 邵冰梅,李小锋,闫蓓蓓,等.裸花紫珠醇提物UPLC指纹图谱建立及抗呼吸道合胞病毒谱效关系研究[J].中国药房,2023,34(20):2465-2470.
SHAO B M, LI X F, YAN B B, et al. Establishment of UPLC fingerprint and study on anti-respiratory syncytial virus spectrum-effective relationship of ethanol extract from *Callicarpa nudiflora*[J]. China Pharm, 2023, 34(20):2465-2470.
- [10] 许晴,李智,万梅绪,等.中药活性成分筛选新技术研究进展[J].药物评价研究,2021,44(7):1541-1547.
XU Q, LI Z, WAN M X, et al. Research progress on screening technology of active ingredients in traditional Chinese medicine[J]. Drug Eval Res, 2021, 44(7):1541-1547.
- [11] CHANG Y Q, ZHANG D, YANG G Y, et al. Screening of anti-lipase components of *Artemisia argyi* leaves based on spectrum-effect relationships and HPLC-MS/MS[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:675396.
- [12] KIM J G, KIM M J, LEE J S, et al. *Smilax guianensis* Vitman extract prevents LPS-induced inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway in RAW 264.7 cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2020, 30(6):822-829.

(收稿日期:2024-06-17 修回日期:2024-09-18)

(编辑:唐晓莲)