

高效液相色谱法同时测定海南裸花紫珠中6种抗炎活性成分的含量与质量评价

陈娟^{1,2,3}, 胡虹^{1,2,3}, 施悦^{1,2,3}, 康兴东⁴, 王淑美^{1,2,3*}, 谢媛媛^{1,2,3*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东省中药质量工程技术研究中心, 广东 广州 510006; 3. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东 广州 510006; 4. 江西普正制药股份有限公司, 江西 吉安 331409)

摘要: 本研究采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导大鼠全身感染性炎症模型, 通过苏木精-伊红 (hematoxylin eosin, H&E) 染色观察模型大鼠肺和结肠组织病理改变, 并以炎症因子一氧化氮 (nitric oxide, NO)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 为指标, 评价裸花紫珠水提物干浸膏的抗炎作用。实验按照广东药科大学实验动物福利伦理委员会指导政策严格执行 (批准号: gdpulac2022132)。通过网络药理学预测裸花紫珠提取物中具有抗炎作用的化学成分和潜在作用靶点, 甄别质量标志物, 并采用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定它们的含量。结果表明, 裸花紫珠水提物干浸膏可显著减少炎症大鼠体 TNF- α 和 IL-6 的释放, 降低 NO 水平 ($P < 0.01$)。裸花紫珠中 83 个化学成分通过调控磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase, PI3K-Akt) 信号通路、酪氨酸激酶-信号转导因子和转录激活因子 3 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3, JAK-STAT3) 信号通路等发挥抗炎作用。结合质量标志物特异性、有效性、可测性以及量值传递规律等要素筛选得到 6-羟基木犀草苷、木犀草苷、咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 B 可能为裸花紫珠提取物的抗炎活性成分, 通过 LPS 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型验证了它们的抗炎活性。最后, 以这 6 个化合物作为含量测定指标成分, 评价了 16 批海南产裸花紫珠药材的质量。综上, 本研究通过体内外实验证实了裸花紫珠水提物干浸膏的抗炎作用, 6-羟基木犀草苷、木犀草苷、咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷 B 是裸花紫珠抗炎活性成分, 可用于裸花紫珠药材及系列制剂的质量评价。

关键词: 裸花紫珠; 抗炎; 网络药理学; 质量标志物; 多指标定量分析; 质量评价

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1408-14

Quality evaluation of *Callicarpa nudiflora* from Hainan Province based on simultaneous determination of six anti-inflammatory active components by HPLC

CHEN Juan^{1,2,3}, HU Hong^{1,2,3}, SHI Yue^{1,2,3}, KANG Xing-dong⁴, WANG Shu-mei^{1,2,3*}, XIE Yuan-yuan^{1,2,3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Quality Engineering and Technology Research Center, Guangzhou 510006, China; 3. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 4. Jiangxi Puzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Ji'an 331409, China)

Abstract: The anti-inflammatory efficacy of *Callicarpa nudiflora* extract were evaluated upon lipopolysaccha-

收稿日期: 2023-12-12; 修回日期: 2024-02-28.

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项课题资助项目 (2017YFC1700800).

*通讯作者 E-mail: 2395903468@qq.com; yuanyuan8078@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1382

ride (LPS)-induced infective inflammation in rats. Pathological changes of lung and colon tissues observed with hematoxylin-eosin (H&E) staining, together with inflammatory factors in serum, including nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), were applied to assess the mitigating effects of *C. nudiflora* water extract on model rats. The experimental protocol strictly adhered to the guidelines of the Ethics Committee of Animal Research of Guangdong Pharmaceutical University (Approval: gdpulac2022132). Quality markers with anti-inflammatory activities were recognized by network pharmacology analysis. Subsequently, a reliable method for simultaneously quantifying six components was established. As a result, the pathological injury on lung and colon tissues of model rats induced by LPS were improved by *C. nudiflora* water extract. Compared with model group, *C. nudiflora* extract had decreased the release of proinflammatory factors in serum, including TNF- α and IL-6, and reduced the NO ($P < 0.01$). Network pharmacological analysis obtained 83 chemical components, 466 component targets, 584 disease targets and 129 action targets, which were mainly concentrated in 624 biological processes such as inflammatory response and positive regulation of nitric oxide biosynthesis, as well as 162 pathways such as phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase (PI3K-Akt) signal pathway and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3 (JAK-STAT3) signal pathway. Upon analyzing their specificity, effectiveness, detectability, and quantity transfer rule from herb to extract, 6-hydroxyluteolin 7-glucoside, cynaroside, caffeic acid, acteoside, isoacteoside, and forsythoside B were identified as the quality markers. Their anti-inflammatory activities were verified with LPS-induced inflammation model of RAW264.7 cells. Then contents of these 6 quality markers in 16 batches of *C. nudiflora* were determined. Thereby, the anti-inflammatory efficacy of *C. nudiflora* extract were confirmed *in vivo*, 6-hydroxyluteolin 7-glucoside, cynaroside, caffeic acid, acteoside, isoacteoside, and forsythoside B were identified as anti-inflammatory ingredients, which can be used as quality control indicators for the herb and related formulation.

Key words: *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn.; anti-inflammation; network pharmacology; Q-marker; multi-index quantitative analysis; quality evaluation

裸花紫珠是马鞭草科紫珠属植物 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 的干燥叶或幼嫩枝叶, 是海南地区常用的传统民族药材^[1,2]。裸花紫珠提取物具有抗炎、抗菌、保护神经、抗氧化和镇痛等作用^[3]。目前国家药品监督管理部门批准的裸花紫珠单方制剂有12种, 包括颗粒剂、胶囊、分散片和片剂等剂型, 广泛用于血热毒盛所致呼吸道、消化道出血及细菌感染性炎症等的治疗, 有“天然抗生素”之称^[4,5]。

裸花紫珠药材及其系列制剂的质量是保障其在临床安全有效应用的前提。中国药典(2020年版)一部收载了裸花紫珠药材及其单方制剂裸花紫珠片和裸花紫珠胶囊的质量标准, 均以木犀草苷和毛蕊花糖苷作为含量测定的指标^[6]; 原国家食品药品监督管理局国家药品标准收载了裸花紫珠分散片与颗粒剂的质量标准, 其中, 裸花紫珠分散片以总黄酮、木犀草素为指标, 而裸花紫珠颗粒剂则仅以总黄酮为指标^[7]。

药品标准是对药品质量规格及检测方法所做出的技术规定, 是药品研究、生产、经营、使用、检验及监管共同遵循的法定依据。建立科学、客观的中药质量评价标准是提升中药质量的关键环节。随着中药分析技术的发展和各学科交叉融合, 中医药研究已开始向多角度、系统性的研究模式转变, 对裸花紫珠及其制剂的

质量研究也越来越深入。Huang等^[8]发现不同采收部位、不同生育期的裸花紫珠中咖啡酸、连翘酯苷B、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、芹菜素糖苷和木犀草素等7个化学成分含量差异显著, 其中叶中的化学成分分布较多, 且在盛花期至坐果前期化学成分积累较多, 为确定裸花紫珠的最佳采收时期和采收部位提供科学理论依据。He等^[9]建立了裸花紫珠分散片的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱, 对咖啡酸、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和木犀草素进行定量分析。然而, 这些研究均是以化学成分为基础的质量控制, 所测定指标成分含量的变化是否会影响到裸花紫珠药材的有效性和安全性, 仍需要深入探讨。Wu等^[10]采用液相色谱-质谱联用技术对裸花紫珠药材中26种化合物进行了定量分析, 并基于脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导RAW264.7细胞炎症模型和网络药理学研究, 筛选出了16种具有潜在抗炎活性的化合物。Li等^[11]通过裸花紫珠提取物指纹图谱与其抗大鼠足趾肿胀炎症作用相结合的“谱效关系”研究发现了梓醇、咖啡酸、原儿茶酸、连翘酯苷B、毛蕊花糖苷和异鼠李素等12个质量标志物。然而, 细胞模型和大鼠足趾肿胀局部炎症的模型均难以准确表征裸花紫珠对全身感染性炎症反应

的调控作用,由此发现的质量标志物难以反映裸花紫珠的整体效应。同时,含量测定的指标成分并非越多越好,其有效性、特有性和可测性是衡量其能否作为质量标志物的核心要素之一。

本研究采用LPS诱导大鼠全身感染性炎症模型,以炎症因子一氧化氮(nitric oxide, NO)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)为指标,评价裸花紫珠水提取物干浸膏的抗炎作用;通过网络药理学预测裸花紫珠提取物中具有抗炎作用的化学成分和潜在作用靶点。结合质量标志物的特有性、有效性、可测性以及量值传递规律等要素甄别质量标志物;并采HPLC测定它们的含量,用于16批海南产裸花紫珠药材的质量评价。

材料与方法

材料 本研究所用裸花紫珠水提取物干浸膏和采集于2017~2020年间的裸花紫珠药材均由江西普正制药有限公司提供。16批裸花紫珠药材(L001~L016)经康兴东高级工程师鉴定为马鞭草科裸花紫珠 *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn. 的干燥叶,密封后保存于阴凉干燥处,样品信息见表1,凭证标本储存于广东药科大学中药学院。

Table 1 The source of samples of *Callicarpa nudiflora*

Sample No.	Collection time	Production area/origin
L001	2017.07	Baisha, Hainan
L002	2018.05	Baisha, Hainan
L003	2020.06	Hainan
L004	2020.06	Hainan
L005	2020.09	Hainan
L006	2019.05	Hainan
L007	2018.04	Baisha, Hainan
L008	2020.05	Hainan
L009	2020.11	Baisha, Hainan
L010	2020.09	Baisha, Hainan
L011	2020.12	Hainan
L012	2020.07	Wuzhishan, Hainan
L013	2020.12	Hainan
L014	2020.07	Baisha, Hainan
L015	2020.11	Hainan
L016	2020.11	Hainan

细胞 小鼠单核巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院上海生命科学研究院。

实验动物 SPF级SD大鼠,7~8周龄,体重180~200 g,雄性,购自广东省医学院实验动物中心,动物许可证号SCXK(粤)2022-0002;实验单位使用许可证号SYXK(粤)2017-0125,实验前于广东药科大学实验动物中心适应性饲养3天,饲养环境温度20~23℃,相对湿度50%~60%,光照12 h、黑暗12 h,自由

进食饮水。实验规程和方案经广东药科大学实验动物福利伦理委员会批准(批准号:gdpulac2022132)。

仪器与试剂 岛津LC-20高效液相色谱仪(配有LC-20AD二元液相泵,SPD-20AV二极管阵列检测器,SIL-20AC自动进样器,CTO-20A柱温箱和LabSolutions工作站,日本岛津公司);KQE-300DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SQP型十万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);BMB Free-17型台式高速冷冻离心机[博美科学仪器(广州)有限公司];EYELA N-1300旋转蒸发仪(配有EYELA CCA-1112A冷却水循环装置和EYELA DPE-1250型溶剂回收装置);JJ200B千分之一电子天平(上海垒固仪器有限公司)。Spark 10M多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Heraguard ECO超净工作台和Forma™ Steri-Cycle il60™二氧化碳三气培养箱(赛默飞世尔科技公司,德国);倒置显微镜(日本Olympus公司)。

咖啡酸(caffeic acid, CAS号331-39-5,批号:11085-201703)购自中国食品药品检验研究院;6-羟基木犀草苷(6-hydroxyluteolin 7-glucoside, CAS号54300-65-1,批号:CHB210114)、连翘酯苷B(forsythoside B, CAS号81525-13-5,批号:CHB201205)、木犀草苷(luteoloside, CAS号5373-11-5,批号:CHB201227)、毛蕊花糖苷(acteoside, CAS号61276-17-3,批号:CHB201109)和异毛蕊花糖苷(isoacteoside, CAS号61303-13-7,批号:CHB210105)购自成都克洛玛生物科技有限公司;本研究所用对照品纯度均大于97.5%。色谱级甲酸(Lot#F1715004,阿拉丁aladdin实验室)、色谱级甲醇(Me-00040203, OCEANPAK)和色谱级乙腈(Ac-00030281, OCEANPAK)均购自上海麦克林生化科技有限公司;水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

地塞米松磷酸钠注射液(国药准字H41021254,产品批号22201301,遂成药业股份有限公司);LPS(批号GC19203,纯度>98.00%,GLP BIO公司);异氟烷(生产批号S10010533,上海玉研科学仪器有限公司);DMEM培养基、青-链霉素、0.25%胰蛋白酶和pH 7.4的PBS缓冲液均购自美国Gibco公司。胎牛血清(FBS)购自HOLOCENE公司;Cell-Counting-Kit(CCK-8)购自美国GLP BIO公司;Elabscience® Rat TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号KL098XR45157,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);Rat IL-6 ELISA试剂盒(批号RX302856R,泉州市睿信生物科技有限公司);一氧化氮测试盒(批号20220207,南京建成生物工程研究);BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,生产批号092721220323,上海碧

云天生物技术有限公司); 苏木素 (美国 SIGMA 公司); 伊红 (水溶, 天津光复精细化工有限公司); H_2O_2 、酒精、二甲苯和中性树胶等均为分析纯。

数据库及软件 CMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); 化源网 (<https://www.chemsrc.com/>); PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); 微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>); STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>); Metascape 数据库 (<http://metascape.org/>); Cytoscape 软件 (v3.10.0, <https://cytoscape.org>)。

裸花紫珠水提物干浸膏对 LPS 诱导模型大鼠全身感染性炎症的影响

模型建立、分组与给药 将 24 只 SD 雄性大鼠 (200 ± 10 g) 随机分为 4 组, 即对照组 (control)、模型组 (model)、裸花紫珠组 (相当于生药量 $2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, L) 和阳性药地塞米松组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, D), 每组 6 只, 各组实验期间自由饮食饮水。裸花紫珠水提物干浸膏的给药量是根据中国药典 (2020 版) 一部“裸花紫珠”项下成人每日最大用量 30 g, 经等效剂量折算得来。空白组和模型组灌胃给予纯净水, 一天 1 次, 连续 6 天; 裸花紫珠组灌胃给予裸花紫珠水提物 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$ (相当于生药量 $2.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 一天 1 次, 连续 6 天; 阳性药地塞米松组每日灌胃给予纯水, 一天 1 次, 连续 5 天, 第 6 天腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。第 7 天, 模型组和裸花紫珠组腹腔注射 LPS ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 1 h 后, 分别灌胃给予纯净水和裸花紫珠水提物, 地塞米松组在腹腔注射等量 LPS 1 h 后, 腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。末次给药后 24 h, 异氟烷麻醉实验动物, 腹主动脉取血, 室温静置 1~2 h 后离心 20 min ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C), 取上清液, -80°C 分装保存。

组织病理学检查 每组取 4 只大鼠的结肠组织和右肺下叶组织用 4% 多聚甲醛组织固定液固定后, 进行常规脱水、透明、石蜡包埋, 制备组织切片, 切片厚度为 $2 \mu\text{m}$, HE 染色、封片后, 在光学显微镜下放大 20~100 倍观察。参照既往评分体系以充血、水肿、间质炎症、炎症细胞浸润等为指标评价肺组织损伤程度; 以结肠绒毛结构损伤情况为评价结肠组织的指标。

NO、IL-6 和 TNF- α 水平的测定 采用 ELISA 测定血清中 TNF- α 和 IL-6 的水平, 将血清加入到包被了特定抗体的 96 孔板中, 使样品或标准品中的 TNF- α 或 IL-6 与特定抗体结合, 而游离的成分被洗去。依次加入生物素化的抗体和辣根过氧化物酶标记的亲合素, 形成“TNF- α 或 IL-6+抗体+生物素+亲和素”特异性免

疫复合物。加入显色底物四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB), TMB 在辣根过氧化物酶的催化下呈现蓝色, 加终止液后变成黄色。用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值, TNF- α 或 IL-6 浓度与 OD 值呈正比, 绘制标准曲线计算血清中 TNF- α 、IL-6 的水平。血清中的 NO 采用 Griess 法测定^[12]。

网络药理学分析

成分筛选及靶点预测 通过文献检索和 TCMSP 等数据库查询, 以药材名为关键词, 搜索裸花紫珠药材的化学成分, 建立裸花紫珠化学成分质谱数据库, 在 PubChem 数据库中获取它们的 Canonical SMILES (simplified molecular input line entry system, 简化分子线性输入规范) 式, 将各化合物的 Canonical SMILES 式导入 Swisstargetprediction 数据库进行靶点预测, 收集 Probability* > 0.1 的靶点, 去重, 作为裸花紫珠化学成分的作用靶点。通过 Genecards 数据库, 检索关键词“bacterial infectious inflammation”得到感染性炎症的相关基因及靶点蛋白。

构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络 将感染性炎症靶点与裸花紫珠化合物作用靶点取交集, 得到裸花紫珠治疗感染性炎症的交集靶点, 交集靶点导入 STRING 数据库中构建互作网络模型, 物种选择“human sapiens”, 获取蛋白质相互作用信息, 保存为 *.csv 文件, 将此文件导入 Cytoscape 3.10.0 软件进行“Analyze Network”处理, 筛选 degree 值大于 2 倍中位值的靶点作为裸花紫珠治疗感染性炎症的潜在作用靶点。

基因本体 (gene ontology, GO) 分析与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes, KEGG) 通路富集分析 将获得的裸花紫珠治疗感染性炎症的潜在作用靶点导入 Metascape 数据库, 物种限定“human sapiens”, 对靶点分别进行 GO biological processes、GO cellular component、GO molecular functions 和 KEGG pathway 富集分析, 在微生信网站中绘制裸花紫珠成分治疗感染性炎症所涉及的 KEGG 富集图。

“成分-靶点-通路”网络构建及可视化分析 借助 Cytoscape 3.10.0 软件构建“活性成分-靶点-KEGG 通路”可视化调控网络图, 运用该软件中的“analyze network”功能进行网络拓扑分析, 根据 degree 筛选得到裸花紫珠治疗感染性炎症的关键活性成分及重要 KEGG 通路。

LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症实验

CCK-8 法检测 RAW264.7 细胞活性 将对数生长期的 RAW264.7 细胞, 以每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。设置对照

组、地塞米松组和不同给药组, 裸花紫珠水提取物浸膏用DMEM培养基溶解, 终浓度为8、16、32、64、128、256、512、1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对照品用DMEM培养基溶解, 终浓度为6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。弃去培养基, 各给药组加入100 μL 不同浓度药液与LPS (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)按1:1混合的溶液, 空白组和对照组分别加入100 μL 不含药物的DMEM培养基, 模型组加入100 μL 含LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的DMEM培养基, 每组设立6个复孔, 恒温培育18~24 h后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 避光孵育4 h, 测定450 nm处的OD值, 按公式细胞存活率 = $\text{OD}_{\text{给药}}/\text{OD}_{\text{对照}}$ 计算细胞存活率。

NO、IL-6和TNF- α 水平的测定 取对数生长期的RAW264.7细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞接种于24孔板中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h。设置对照组、地塞米松组和不同给药组, 弃去培养基后, 用PBS润洗。各给药组每组加入500 μL 不同浓度药液与LPS (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)按1:1混合的溶液, 空白组和对照组分别加入500 μL 不含药物的DMEM培养基, 模型组加入500 μL 含LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的DMEM培养基, 恒温培育18~24 h后, 吸取上清液, 采用Griess法检测NO水平, 按照ELISA试剂盒说明书检测IL-6和TNF- α 水平。

HPLC法测定裸花紫珠药材中6-羟基木犀草-7-O-葡萄糖苷、木犀草苷、咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷B含量

色谱条件 色谱柱: Venusll MP C18 (2) (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.2%甲酸-水(A)和乙腈(B)。洗脱梯度: 0~2 min, 5% \rightarrow 11% B; 2~5 min, 11% \rightarrow 15% B; 5~27 min, 15% \rightarrow 16% B; 27~32 min, 16% B; 32~38 min, 16% \rightarrow 17% B; 38~50 min, 17% \rightarrow 30% B; 50~60 min, 30% \rightarrow 33% B; 60~62 min, 33% \rightarrow 95% B; 62~64 min, 95% \rightarrow 5% B; 64~70 min, 5% B。流速为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为10 μL ; 检测波长分别为330和350 nm。

对照品溶液的制备 取咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷B、木犀草苷、异毛蕊花糖苷、毛蕊花糖苷适量, 精密称定, 加甲醇分别制成含咖啡酸1 040 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、6-羟基木犀草苷510 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷B 2 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷430 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异毛蕊花糖苷1 015 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和毛蕊花糖苷2 060 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

供试品溶液的制备 取裸花紫珠粉末(过四号筛)约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶, 精密加入70%甲醇25 mL, 密塞, 称定重量, 超声提取40 min (40 kHz), 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取上清液, 过0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。

另精密量取续滤液1 mL, 置10 mL量瓶中, 加70%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为毛蕊花糖苷含量测定用供试品溶液。

方法学考察

专属性 取混合对照品溶液、空白溶液、裸花紫珠药材供试品溶液(L007), 分别注入液相色谱仪, 比较色谱图。

精密度 取L007批次裸花紫珠药材, 按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 按照色谱条件连续进样6次, 记录6种指标成分的峰面积, 并计算同一供试品溶液连续进样6次各指标成分峰面积的相对标准偏差(RSD)值。

重复性 取L007批次裸花紫珠药材, 按“供试品溶液的制备”项下方法平行制备6份供试品溶液, 按照色谱条件进样, 记录6种指标成分的峰面积, 并计算各指标成分峰面积的RSD值。

中间精密度 考察随机变动因素, 如不同日期、不同分析人员、不同仪器对精密度的影响。三位不同分析人员, 每人于不同日期, 平行取5份L007批次裸花紫珠药材, 按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 在同一实验室里另外一台液相色谱仪, 按照色谱条件进样, 记录6种指标成分的峰面积, 并计算各指标成分峰面积的RSD值。

稳定性 取L007批次裸花紫珠药材, 按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 分别在0、4、10、18、24、30 h按照色谱条件进样, 记录6种指标成分的峰面积, 并计算各指标成分峰面积的RSD值。

线性关系 精密吸取毛蕊花糖苷对照品溶液适量, 加70%甲醇制得206 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按1、2、4、8、20、100倍数逐级稀释, 成6个不同浓度的混合对照品溶液, 按色谱条件进样分析, 以对照品浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 绘制峰面积与浓度之间的工作曲线, 计算线性回归方程及相关系数。精密吸取各对照品溶液适量, 加70%甲醇制得混合对照品溶液(咖啡酸52 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、6-羟基木犀草苷102 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、连翘酯苷B 210 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、异毛蕊花糖苷203 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按1、2、8、20、40、80倍数逐级稀释成6个不同浓度的混合对照品溶液, 按色谱条件进样分析, 以对照品浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 绘制峰面积与浓度之间的工作曲线, 计算线性回归方程及相关系数。

加样回收率 取L007批次裸花紫珠药材9份, 精密称定0.25 g的药材粉末, 分别按样品-对照品的比例为1:1、1:1.2、1:0.8加入一定量的各对照品, 每个比例

按“供试品溶液的制备”项下方法各制备3份供试品溶液,按照色谱条件进样分析,计算各指标成分的加样回收率及RSD值。

含量测定 精密称取16批裸花紫珠药材粉末0.50 g,按“供试品溶液的制备”项下方法制备药材供试品溶液,按色谱条件进样分析,测定各批次裸花紫珠药材中6个指标成分的含量。

统计学分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 26.0软件(SPSS Inc. Chicago, USA)分析实验结果的统计学差异,两组间比较采用Student's *t*-test, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。使用GraphPad Prism 9.5作统计图。

结果

1 裸花紫珠水提物干浸膏对LPS诱导大鼠全身感染性炎症的影响

与对照组大鼠相比,模型大鼠腹腔注射LPS溶液24 h后,粪便变稀且有近透明黏液,食欲减退,体重减轻,说明LPS诱发了全身炎症反应。如图1A所示,对照组鼠右肺组织形态正常,肺泡上皮细胞结构完整,肺泡壁较薄,无肺泡充血,无炎症细胞浸润,未见明显病理改变^[13,14];模型组鼠炎性中性粒细胞明显浸润,肺泡壁明显增厚,出现肺间质水肿,毛细血管充血;各给药组肺组织病变程度降低,裸花紫珠组毛细血管少量充血,肺泡壁增厚情况不明显,肺间质轻度水肿;地塞米松组仅见少量炎性细胞浸润,肺间质水肿程度减轻。以上结果表明,裸花紫珠水提物可显著缓解LPS诱导的大鼠肺损伤,减少肺水肿和炎性细胞浸润。

图1B所示,对照组结肠绒毛致密,排列有序,绒毛上皮完整,细胞形态正常,无明显断裂充血等状况^[15];

模型组结肠绒毛结构受到严重破坏,绒毛顶端上皮脱落,绒毛明显断裂充血等;地塞米松组结肠绒毛完整,未见明显损伤;裸花紫珠给药组结肠绒毛明显增长,黏膜和绒毛均恢复至正常水平。以上结果表明,腹腔注射LPS不仅会造成肺组织损伤,也会造成肠道炎症反应,裸花紫珠水提物对LPS诱导的全身炎症反应具有保护作用。

为了进一步探讨裸花紫珠水提物干浸膏对LPS诱导感染性炎症模型大鼠的保护作用,测定了大鼠血清中的TNF- α 、IL-6和NO等细胞因子水平。如图2所示,与对照组相比,模型组大鼠血清中的TNF- α 、IL-6、NO显著升高,进一步说明腹腔注射LPS可导致模型大鼠全身感染性炎症,感染性炎症模型复制成功($P < 0.01$)。与模型组相比,裸花紫珠水提物干浸膏和地塞米松组血清中的TNF- α 、IL-6、NO水平均显著降低($P < 0.05$),提示裸花紫珠水提物干浸膏对LPS诱导的感染性炎症具有一定缓解作用。

2 裸花紫珠干预防全身感染性炎症网络药理学研究

2.1 裸花紫珠水提物干浸膏化学成分、靶点和疾病靶点的筛选

通过TCMSP数据库和文献检索^[1,16,17],共收集得到83个化学成分,其中包括17个环烯醚萜类、25个苯丙素类、30个黄酮类、9个三萜类和1个二萜类化合物,采用SwissTargetPrediction预测它们的潜在作用靶点,删除重复靶点,经UniProt数据库标准化靶点名称,最后得到466个化学成分靶点。通过GeneCards数据库,以“infectious inflammation”为关键词,经UniProt校正靶点名称,得到584个疾病靶点。

2.2 作用靶点筛选和富集分析

化学成分靶点和疾病靶点的交集靶点有314个,

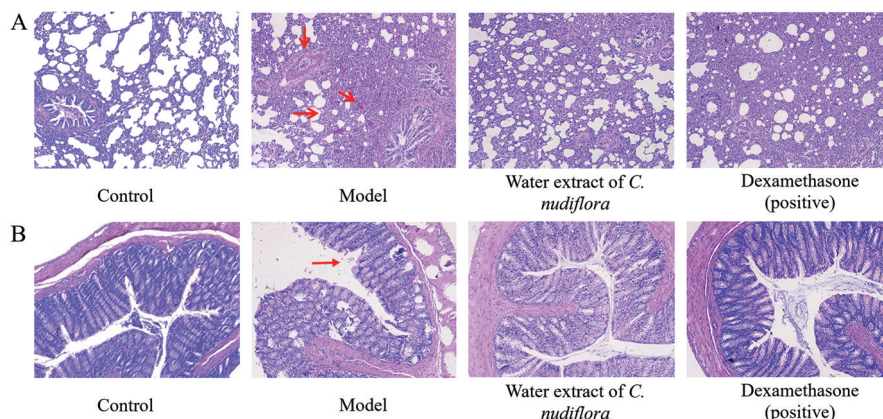


Figure 1 Effects of treatment with water extract of *C. nudiflora* and dexamethasone (positive) on infectious inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats. Scale bar: 100 μ m. A: Representative pictures of lung tissue sections detected with hematoxylin and eosin (H&E) staining ($n = 3$, 100 \times , red arrow indicated inflammatory cells infiltration and aggregation); B: Representative pictures of colon tissue sections detected with hematoxylin and eosin (H&E) staining ($n = 3$, 100 \times , red arrow indicated damaged structure of colonic villi)

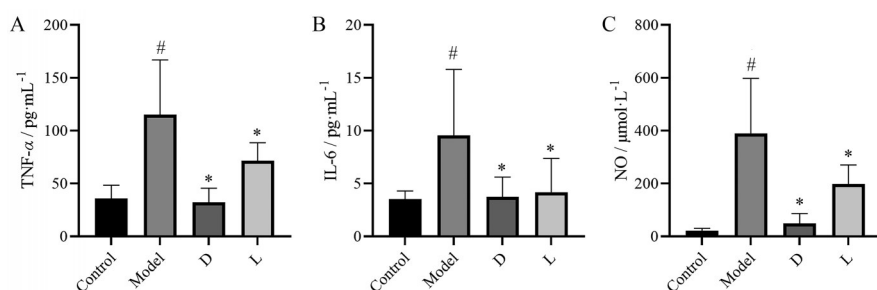


Figure 2 Regulation of *C. nudiflora* extract on inflammatory factors levels in serum of LPS-induced infectious inflammation rats. The expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α , A), interleukin-6 (IL-6, B) and nitric oxide (NO, C) in rats of each group ($n = 6, \bar{x} \pm s$). [#] $P < 0.05$ vs control; ^{*} $P < 0.05$ vs model. L: Water extract of *C. nudiflora*; D: Dexamethasone (positive)

将其导入 STRING 数据库得到的基因相互作用 PPI 网络, 网络共有 126 个节点, 1 237 条边, 节点的平均度值为 19.5, 网络中心度为 0.399。经“Analyze Network”处理后 degree 值大于 2 倍中位值的 129 个靶点作为裸花紫珠治疗感染性炎症的潜在作用靶点, 包括细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53, TP53)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src, SRC)、信号转导因子和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、热休克蛋白 HSP 90- α (heat shock protein HSP 90- α , HSP90AA1)、连环蛋白 (catenin beta-1, CTNNB1)、转录因子 JUN、 α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC- α threonine-protein kinase, AKT1) 和 IL-6 等。

生物过程 (biological process, BP) 富集分析中共得到 624 个条目, 其中排名靠前的条目包括蛋白质磷酸化、凋亡过程负调控、肽基酪氨酸磷酸化、蛋白激酶 B 信号的正调控、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路和丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应的正调控等。细胞组成 (cellular component, CC) 富集在细胞质、胞液、大分子复合物、细胞核、核浆、细胞质核周区等 86 个条目。分子功能 (molecular function, MF) 富集在蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、酶结合、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白激酶结合、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合等 164 个条目。GO 富集分析结果表明, 作用靶点大多分布在细胞胞浆、细胞核和质膜中, 主要通过对含氮化合物的细胞反应、蛋白质磷酸化等生物过程以及蛋白激酶活性、激酶结合等分子功能来发挥治疗炎症的作用。

KEGG 通路富集结果见图 3, 作用靶点主要富集在癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、胰岛素抵抗、JAK-STAT 信号通路等 162 条通路。表明裸花紫珠的抗炎作用可能与调控磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋

白激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase, PI3K-Akt) 信号通路、酪氨酸激酶-信号转导因子和转录激活因子 3 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3, JAK-STAT3) 等信号通路有关。

2.3 “成分-靶点-通路”网络分析

采用 Cytoscape 3.10.0 软件构建裸花紫珠治疗感染性炎症的“活性成分-靶点-KEGG 通路”网络如图 4 所示, 六边形代表化学成分, “V”形代表化学成分作用靶点, 四边形代表通路。该网络由 230 个节点和 1 329 条边构成, 节点大小与度值相关。通过对化学成分的度值进行分析, degree 值较高的化合物有黄酮类成分 (阿亚黄素、槲皮素 3,3',4'-三甲基醚、6-羟基木犀草苷、木犀草苷、槲皮素、6-羟基木犀草素、木犀草素、芹菜素、异鼠李素、鼠李素)、苯丙素类成分 [香草酸、香草素、咖啡酸、4-羟基肉桂酸、阿魏酸、6-*O*-(*E*)-咖啡酰基吡喃葡萄糖、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷 B]、萜类 [齐墩果酸、rel-2 α , 3 α , 19 α , 23-tetrahydroxyolean-12-en-28-oic acid、(2 α , 3 α)-2, 3, 24-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid、euscaphic acid、corosolic acid、callicarpic acid A、callicarpic acid B] 等, 提示裸花紫珠中不同成分作用于多个靶点和通路, 进而发挥抗炎作用。

3 裸花紫珠质量标志物甄别

基于质量标志物“五原则”中的有效性、特有性、可测性以及量值传递规律等要素筛选^[18], 确定木犀草苷、毛蕊花糖苷、咖啡酸、异毛蕊花糖苷、6-羟基木犀草苷和连翘酯苷 B 作为裸花紫珠治疗感染性炎症的质量标志物。

4 裸花紫珠水提取物及 6 个化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞上清液 NO、IL-6 和 TNF- α 水平的影响

4.1 裸花紫珠水提取物及 6 个化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞存活率的影响

与对照组相比, LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后, 模型组的细胞存活率与对照组相比没有

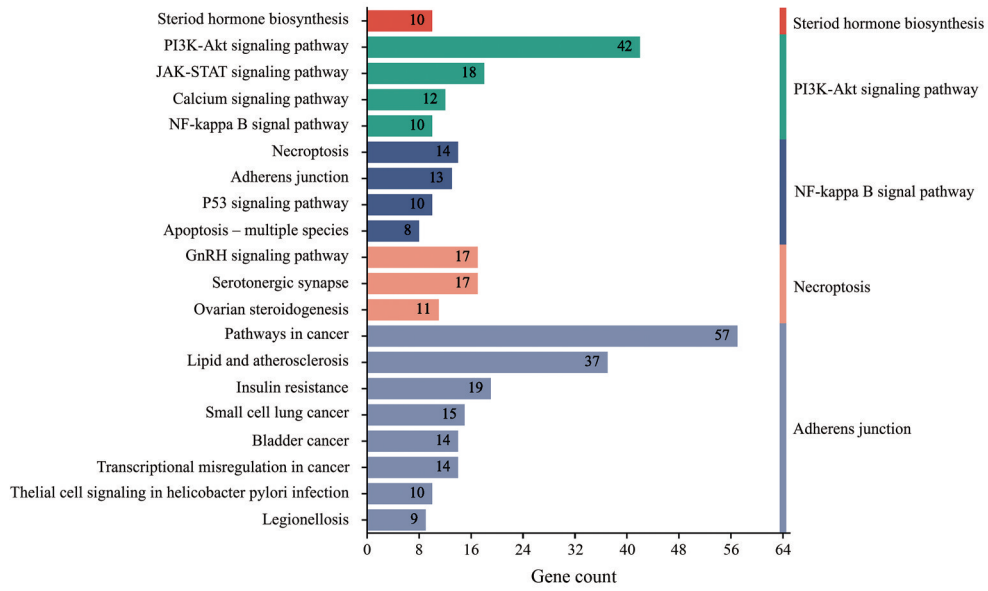


Figure 3 KEGG pathway enrichment analysis

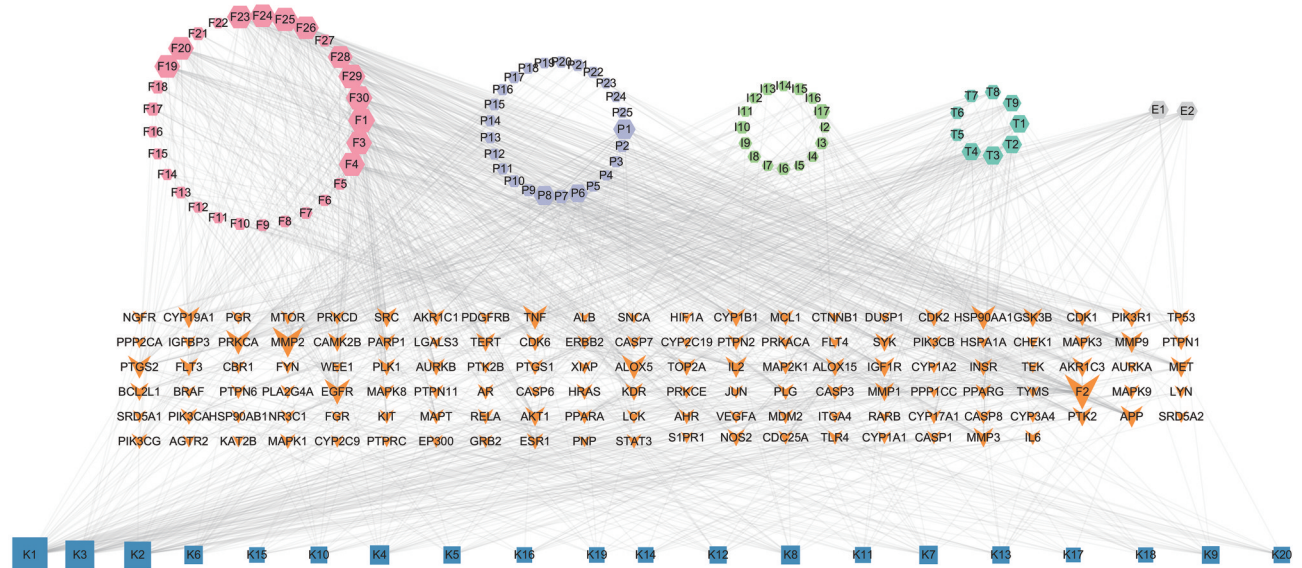


Figure 4 "Chemical components-targets-pathways" network

显著差异 ($P > 0.05$), 说明实验浓度下的 LPS 对细胞增殖无抑制作用。不同浓度裸花紫珠水提取物干浸膏 (8、16、32、64、128、256、512、1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与 LPS 共同刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后, 裸花紫珠水提取物干浸膏各给药组的细胞存活率均在 90% 以上, 实验选用的裸花紫珠水提取物干浸膏所有浓度对 RAW264.7 细胞均无明显细胞毒性作用, 可作为后续给药浓度。不同浓度 (6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的木犀草苷、毛蕊花糖苷、咖啡酸、异毛蕊花糖苷、6-羟基木犀草苷和连翘酯苷 B 与 LPS 共同刺激 RAW264.7 细胞 24 h 后, 各浓度组细胞增殖率均大于 90%, 且与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明以上 6 个化合物在 6.25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

给药浓度内对细胞增殖无影响, 属于安全给药范围。

4.2 裸花紫珠水提取物干浸膏对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 和 IL-6 释放量的影响

裸花紫珠水提取物干浸膏对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 和 IL-6 释放量的影响如图 5A、6A、7A 所示, LPS 刺激细胞后, 细胞上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 的表达量与对照组比显著增加, 说明 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型建立成功。与模型组比, 各浓度 (8~1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 裸花紫珠水提取物干浸膏均能显著降低细胞上清液中 TNF- α 水平; 但仅浓度为 64~1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的裸花紫珠水提取物干浸膏能显著降低细胞上清液中 NO 和 IL-6 含量, 且表现出一定的浓度依

赖性, 低浓度 (8~32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的裸花紫珠水提取物干浸膏抑制 LPS 诱导的炎症细胞释放 NO 和 IL-6 的作用不显著。

4.3 6个化合物对LPS诱导RAW264.7细胞NO、TNF- α 和IL-6释放量的影响

如图 5B~G、图 6B~G 和图 7B~G 所示, LPS 刺激细胞后, 与对照组比较, 细胞上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 的释放量明显增多, 说明 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型建立成功。与模型组比较, 浓度在 6.25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的木犀草苷、毛蕊花糖苷、咖啡酸、异毛蕊花糖苷、6-羟基木犀草苷和连翘酯苷 B 能显著降低细胞上清液中 NO、TNF- α 和 IL-6 的含量, 且表现出一定的浓度依赖性。

5 裸花紫珠药材多指标成分含量测定及质量评价

5.1 方法学考察

5.1.1 专属性 测得裸花紫珠药材供试品溶液色谱图如图 8 所示。在本研究所建立色谱条件下, 6 个化合物分离度良好, 方法专属性良好。

5.1.2 线性关系 6 个指标成分的线性回归方程及相关系数见表 2, 各指标成分在相应浓度范围内均具有良好的线性关系。

5.1.3 精密度 同一供试品溶液 (L007 批次), 连续进样 6 次, 咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷 B、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 6 个色谱峰面积的 RSD 值 ($n = 6$) 分别为 0.18%、0.23%、0.20%、0.12%、0.09%、0.45%, 均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

5.1.4 重复性 同一批次裸花紫珠药材 (L007 批次) 平行制备 6 份供试品溶液中, 咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷 B、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 6 个成分含量的 RSD 值 ($n = 6$) 分别为 0.83%、0.60%、0.66%、0.61%、0.56%、1.22%, 均小于 2%, 表明供试品溶液制备方法的重复性良好。

5.1.5 中间精密度 3 位不同实验人员分别制备 5 份供试品溶液, 咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷 B、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 6 个成分含量的 RSD 值分别为 1.92%、1.16%、1.33%、1.16%、1.27%、

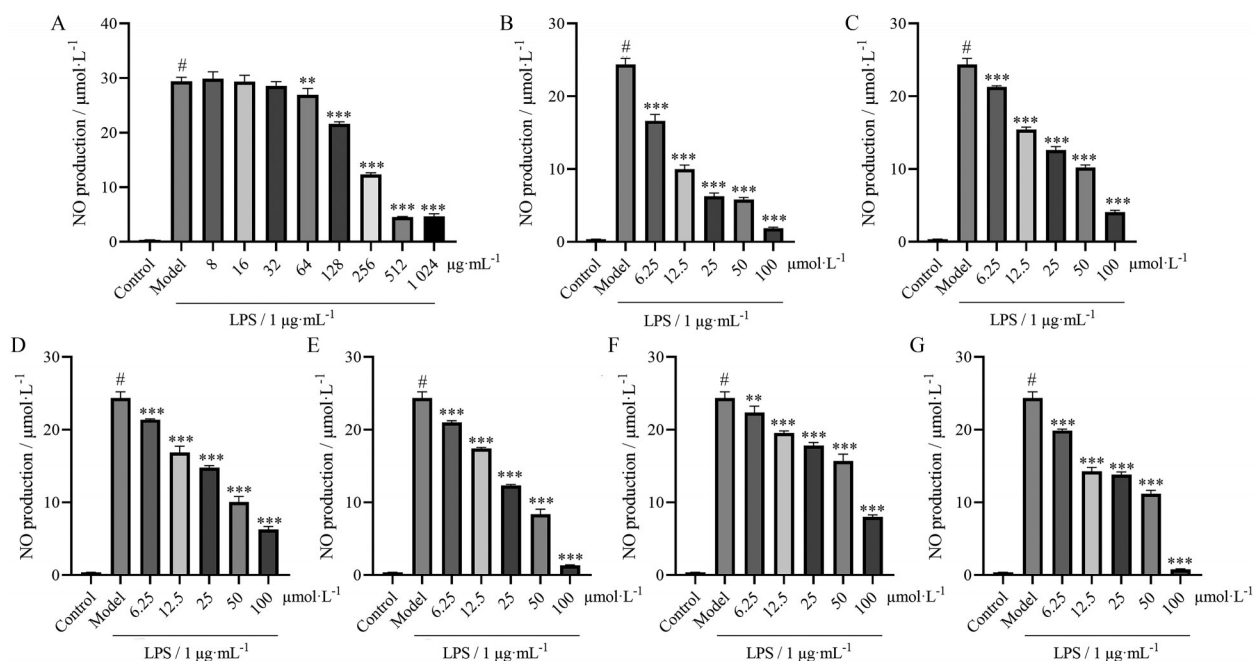


Figure 5 Effect of *C. nudiflora* extract and six potential quality markers on NO level of LPS-induced inflammation model of RAW264.7. A: Water extract of *C. nudiflora*; B: Acteoside; C: Isoacteoside; D: 6-Hydroxyluteolin 7-O-glucoside; E: Forsythoside B; F: Cynaroside; G: Caffeic acid ($n = 3, \bar{x} \pm s$). # $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

Table 2 Linear relations of 6 index components of *C. nudiflora*. LOQ: Limit of quantification; LOD: Low of detection

Analyte	Calibration curve	r	Linear range / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Caffeic acid	$Y = 2.05 \times 10^4 X - 3.50 \times 10^3$	0.999 8	0.650–52.00	0.172 3	0.058 5
6-Hydroxyluteolin-7-O-glucoside	$Y = 3.46 \times 10^4 X - 2.04 \times 10^4$	1.000	1.275–102.00	0.178 5	0.051 0
Forsythoside B	$Y = 9.38 \times 10^3 X - 1.05 \times 10^4$	1.000	2.625–210.0	0.813 8	0.288 8
Cynaroside	$Y = 2.64 \times 10^4 X - 1.20 \times 10^4$	1.000	1.075–86.00	0.333 3	0.118 3
Acteoside	$Y = 1.58 \times 10^4 X - 4.98 \times 10^3$	1.000	2.060–206.0	0.741 6	0.226 6
Isoacteoside	$Y = 6.84 \times 10^3 X - 7.02 \times 10^3$	1.000	2.538–203.0	0.837 4	0.279 1

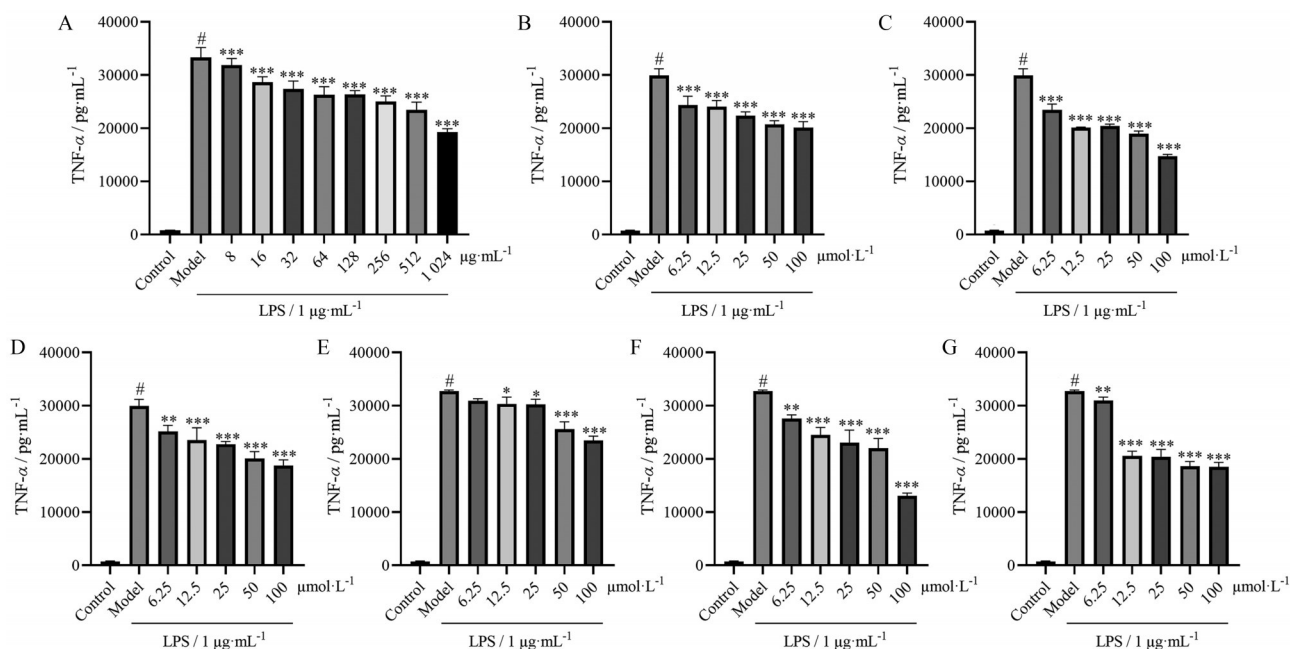


Figure 6 Effect of *C. nudiflora* extract and six potential quality markers on TNF- α level of LPS-induced inflammation model of RAW264.7. A: Water extract of *C. nudiflora*; B: Acteoside; C: Isoacteoside; D: 6-Hydroxyluteolin 7-glucoside; E: Forsythoside B; F: Cynaroside; G: Caffeic acid ($n = 3, \bar{x} \pm s$). # $P < 0.05$ vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

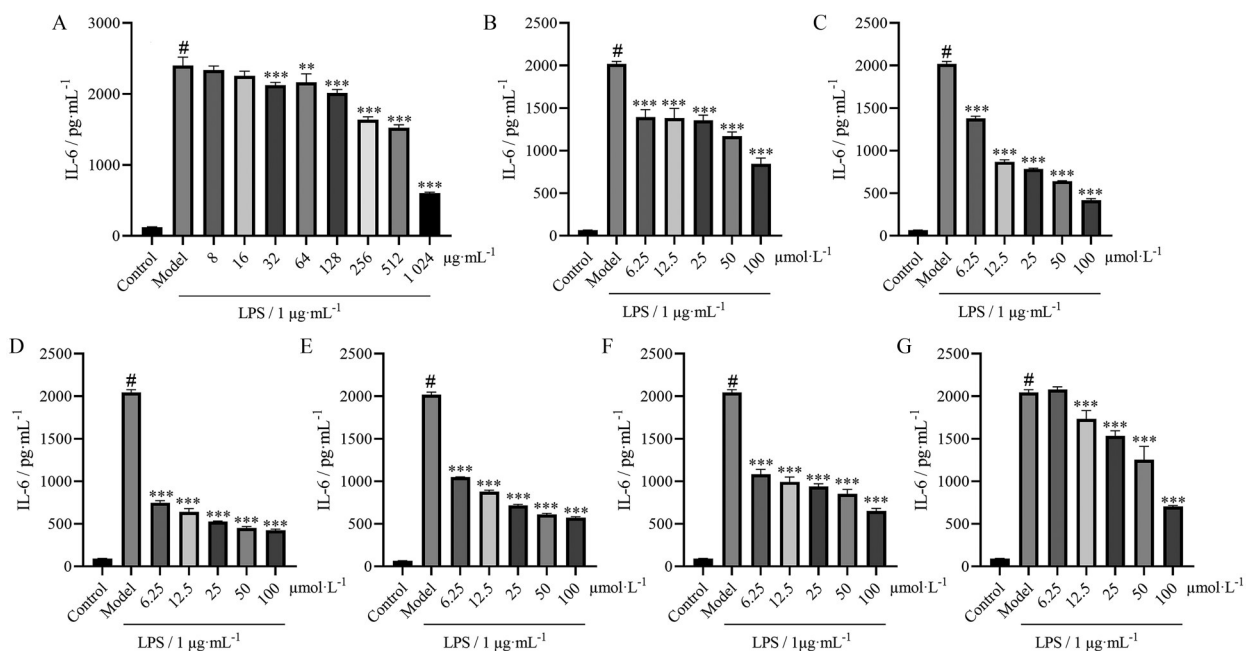


Figure 7 Effect of *C. nudiflora* extract and six potential quality markers on IL-6 level of LPS-induced inflammation model of RAW264.7. A: Water extract of *C. nudiflora*; B: Acteoside; C: Isoacteoside; D: 6-Hydroxyluteolin 7-glucoside; E: Forsythoside B; F: Cynaroside; G: Caffeic acid ($n = 3, \bar{x} \pm s$). # $P < 0.05$ vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

1.84%, 均小于2%, 表明供试品溶液制备方法的耐用性良好。

5.1.6 稳定性 将裸花紫珠供试品溶液(L007批次)在室温下放置30 h, 分别在0、4、10、18、24、30 h进样分析, 咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷B、木犀草苷、

毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷6个成分色谱峰峰面积的RSD值($n = 6$)分别为0.40%、0.11%、0.49%、0.53%、0.55%、0.36%, 均小于2%, 表明供试品溶液在室温下放置30 h内稳定性良好。

5.1.7 加样回收率 精密称取同一批次已知含量的裸

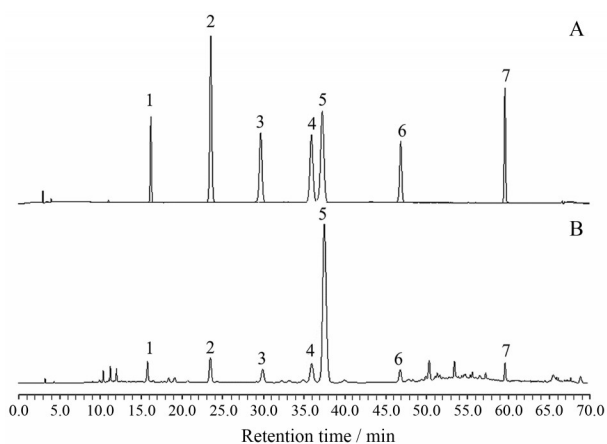


Figure 8 HPLC chromatograms of mixed standard solution (A) and sample solvent of *C. nudiflora* (B). 1: Caffeic acid; 2: 6-Hydroxyluteolin-7-*O*-glucoside; 3: Forsythiaside B; 4: Cynaroside; 5: Acteoside; 6: Isoacteoside; 7: Luteolin (not determined)

花紫珠药材9份,分别按样品/对照品的比例为1:1、1:1.2、1:0.8加入一定量的各对照品,按照色谱条件进样分析,咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷B、木犀草苷、异毛蕊花糖苷平均回收率($n=6$)分别为98.11%、101.36%、102.27%、100.04%、99.17%,均符合2020版中国药典分析方法验证指导原则相关要求,结果表明所建立的分析方法准确性良好。

5.2 裸花紫珠药材质量评价

16批裸花紫珠药材的各指标成分含量如表3所示。中国药典(2020版)裸花紫珠项下规定:本品按干燥品计算,含木犀草苷不得少于0.050%,含毛蕊花糖苷不得少于0.80%,本研究测定的16批裸花紫珠药材

中,毛蕊花糖苷含量在1.45%~5.86%之间,木犀草苷含量在0.14%~0.30%之间均符合药典裸花紫珠项下规定。

讨论

本研究在对裸花紫珠药材成分进行含量测定的过程中,考察了不同的流动相(0.1%甲酸水-乙腈、0.2%甲酸水-乙腈和0.1%磷酸水-乙腈),不同柱温(25、30、40℃)和流速(1.0、0.8、0.5 mL·min⁻¹)对指标成分分离度的影响。结果表明,以0.2%甲酸-水为水相可显著提高裸花紫珠各指标成分的分离度;柱温对其分离度影响不大,在柱温为30℃时6个指标成分出峰均匀;流速为1.0 mL·min⁻¹时各色谱峰分离情况最优。同时,进行了梯度洗脱条件的优化,确定了裸花紫珠药材及提取物中6个指标成分同时进行含量测定的最佳色谱条件。

通过对不同提取溶剂、提取方法、提取条件和料液比等进行系统考察,确定最优的样品前处理方法,与中国药典裸花紫珠药材的供试品溶液制备方法一致。方法学考察结果表明本研究所建立HPLC分析方法可准确测定咖啡酸、6-羟基木犀草苷、连翘酯苷B、木犀草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷等6个指标成分的含量。

研究表明,LPS是参与感染性炎症的重要介质^[19],通常作为炎症级联反应的启动因子^[20],可以激活机体的免疫系统,引起细胞因子的合成与释放,促炎症因子大量增加,导致机体的一系列炎症反应,释放多种炎症

Table 3 Contents of 6 analytes determined in 16 samples

Sample No.	Content/%						Total
	Caffeic acid	6-Hydroxy-luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	Forsythiaside B	Cynaroside	Acteoside	Isoacteoside	
L001	0.03	0.09	0.07	0.14	1.45	0.17	1.95
L002	0.13	0.13	0.26	0.18	4.46	0.39	5.55
L003	0.09	0.13	0.46	0.23	5.86	0.59	7.36
L004	0.08	0.19	0.24	0.30	5.15	0.56	6.52
L005	0.06	0.17	0.13	0.25	2.65	0.37	3.63
L006	0.09	0.14	0.16	0.24	2.75	0.29	3.67
L007	0.13	0.13	0.34	0.21	5.32	0.42	6.55
L008	0.07	0.08	0.26	0.17	2.94	0.30	3.82
L009	0.04	0.13	0.09	0.21	2.02	0.25	2.74
L010	0.05	0.16	0.10	0.24	3.10	0.26	3.91
L011	0.07	0.16	0.21	0.25	4.60	0.38	5.67
L012	0.07	0.18	0.19	0.25	5.11	0.43	6.23
L013	0.04	0.13	0.08	0.21	2.26	0.19	2.91
L014	0.06	0.20	0.21	0.28	5.68	0.59	7.02
L015	0.06	0.15	0.13	0.22	3.03	0.39	3.98
L016	0.05	0.14	0.15	0.20	2.66	0.24	3.44
Min	0.03	0.08	0.07	0.14	1.45	0.17	1.95
Max	0.13	0.20	0.46	0.30	5.86	0.59	7.36
Average	0.07	0.14	0.19	0.22	3.69	0.36	4.68
RSD	40.1	21.8	52.4	17.5	37.8	35.5	38.4

介质^[21,22]。产生活性氧,破坏肠道上皮细胞黏膜,造成肠道菌群易位,形成级联放大作用,进而导致肺等其他器官功能发生障碍,发展至终末期可能涉及全身多个脏腑和系统的炎性损伤^[23]。LPS诱导急性肺损伤可导致炎症大鼠血清TNF- α 水平增加,肺泡破坏,肺组织损伤严重等^[24-26]。LPS诱导急性肠道损伤,可损坏肠道上皮结构,导致血液中的炎症因子IL-6、TNF- α 等促炎因子急剧增加^[27]。

裸花紫珠颗粒剂临床上用于抗感染性炎症的治疗,裸花紫珠提取物对二甲苯所致小鼠耳肿具有保护作用,可抑制NO生成,干扰诱导型NO合酶(iNOS)活性残基与iNOS蛋白相互作用;减轻鸡蛋清诱导的大鼠足跖肿胀,抑制前列腺素E2(PGE2)合成^[28];降低LPS炎症RAW 264.7细胞诱导的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平等^[10]。

质量标志物已成为质量控制研究中一个核心理念和重要依据^[29],为建立符合中医药自身特色的中药质量标准提供了新的思路和方法。然而,如何从复杂的物质体系中发现化学成分与药物功效之间的关系,科学地选择有效、准确、合适的质量标志物是当前学者们探索的热点难题。化学物质基础研究是中药质量标志物发现过程中不可或缺的基础和前提,以化学成分系统分析为核心发现中药质量标志物的策略,包括基于高分辨质谱的化学成分解析^[30];结合药效评价和血中移行成分分析确定中药药效成分^[31];采用药物代谢动力学研究明确给药后主要化学成分在体内暴露的“量-效”关系及其在体内的动态变化规律^[32]。安全和有效是保障中药临床疗效,进行中药质量控制的主要依据和根本目的。上述从中药复杂体系中筛选质量标志物的策略常与网络药理学方法相结合^[33],在数据处理上采用多元统计分析方法关联生物活性,多种数据分析方法与不同分析策略整合应用,从不同层面上选择质量标志物,可以规避单一方法的片面性^[34,35]。

苯乙醇苷类是裸花紫珠中最典型的化合物类型,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、连翘酯苷B和大车前苷等均符合质量标志物的“特有性”原则;阿亚黄素、6-羟基木犀草苷、木犀草苷、木犀草素、异鼠李素、鼠李素等黄酮类化合物degree值排名靠前,但它们普遍存在于中药材中,并不适合作为裸花紫珠的特征性质量标志物。根据质量标志物的“有效性”原则,筛选裸花紫珠治疗感染性炎症的质量标志物。黄酮类成分和苯乙醇苷类成分可能是裸花紫珠抗炎的主要药效物质基础。研究表明,毛蕊花糖苷具有抗氧化活性,具有较高的二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基清除率和铁还原抗氧化能力,预防体内活性氧(ROS)生成和线粒体功能障碍^[36]。

毛蕊花糖苷可改善结肠炎小鼠的肠道炎症,氧化应激和核转录因子(NF- κ B)的活化,恢复肠道微生物的生态失调^[37]。异毛蕊花糖苷可抑制环氧合酶-2(COX-2)、iNOS、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 表达,降低磷酸alpha核因子 κ B抑制蛋白 α 抗体(I κ B α)和kappa B抑制因子激酶(IKK)以及NF- κ B/p65核易位的水平来减弱LPS诱导的NF- κ B转录活性,可有效抑制二甲苯诱导的耳水肿和LPS诱导的内毒性死亡,并预防LPS诱导的急性肾损伤^[38]。连翘酯苷B可降低LPS刺激的RAW264.7细胞中TNF- α 、IL-1水平,抑制IKK和调节NF- κ B通路,其抗炎机制可能是连翘苷B与LPS结合,降低血清LPS的生物活性,抑制NF- κ B活化^[39]。咖啡酸在裸花紫珠中的含量较高,其能抑制体内COX-2、PGE2以及IL-8在IL-1 β 的释放,抗氧化和抗肠道炎症^[40]。木犀草苷可以保护子宫免受金葡萄菌诱导的损伤,并改善炎症细胞的浸润,降低促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的表达水平,增加IL-10的表达水平,NF- κ B信号通路,在金黄色葡萄球菌诱导的子宫内膜炎中起抗凋亡、抗菌和抗炎活性作用^[41]。6-羟基木犀草苷具有抗氧化活性,DPPH自由基清除率较高,亦具有氧自由基吸收能力和铁还原抗氧化电位(FRAP)活性^[42]。阿亚黄素是木犀草苷的衍生物,具有相同母核,推测其也具有一定程度的抗氧化和抗炎作用。鼠李素细胞毒性小,可抑制IL-6和NO的释放,对脂多糖和大肠杆菌刺激的小鼠巨噬细胞中有显著的抗炎作用,减轻肺损伤^[43]。鼠李素和异鼠李素通过影响MAPK和NF- κ B的信号通路,抑制LPS在体内激活的细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、JNK、I κ B α 和NF- κ B(p65)的磷酸化反应,抑制COX-2的表达,缓解急性肺损伤模型动物的中性粒细胞浸润和水肿^[44]。然而,阿亚黄素、木犀草素、异鼠李素、鼠李素等黄酮类成分在裸花紫珠药材中的含量较低,基于质量标志物的“可测性”原则,不能作为裸花紫珠的特征性质量标志物。因此,本研究最终确定木犀草苷、毛蕊花糖苷、咖啡酸、异毛蕊花糖苷、6-羟基木犀草苷和连翘酯苷B作为裸花紫珠治疗感染性炎症的质量标志物,通过LPS诱导RAW264.7细胞炎症模型验证了它们的抗炎活性。含量测定结果表明,毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷B等苯乙醇苷类化合物在不同批次间变化比较显著,RSD分别为37.8%、35.5%和52.4%。而黄酮类化合物木犀草苷和6-羟基木犀草苷的含量比较稳定,含量变化RSD分别为17.5%和21.8%。研究表明,不同生长时期、不同药用部位、不同杀青工艺等均会影响裸花紫珠中连翘酯苷B、毛蕊花糖苷等次生代谢产物的含量^[45],它们在多大程度上影响裸花紫珠药材的

有效性值得进一步深入探究。中药具有多成分、多靶点、多环节作用的特性,对于中药质量的评价也不应局限于几个化合物的含量,更应该从整体效应的角度,明确化合物含量变化与药材活性的关系^[46]。因此,后续研究将深入挖掘裸花紫珠改善感染性炎症的生物标志物,通过生物标志物(群)表达水平(含量)变化与药物中指标成分含量变化的相关性分析,建立化学分析与生物标志物检测相融合的药物质量标准,可真实反映药物的“质”与“量”。

综上,本研究通过体内外实验证实了裸花紫珠水提物干浸膏的抗炎作用,6-羟基木犀草苷、木犀草苷、咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和连翘酯苷B是裸花紫珠抗炎活性成分,可用于裸花紫珠药材及系列制剂的质量评价。

作者贡献: 陈娟负责实验操作、数据处理及文章撰写与修改;胡虹完成了动物实验;施悦完成了细胞实验;康兴东负责药材的基原鉴定。王淑美和谢媛媛指导本文的选题设计、实验思路与方法建立、实验数据处理、文章撰写。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Yang Y, Li ZY, Shao JJ, et al. *Callicarpa nudiflora* Hook. & Arn.: a comprehensive review of its phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113123.
- [2] Kang XD, Ye Y. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of *Callicarpa nudiflora* [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res (特产研究)*, 2021, 43: 95-101.
- [3] Feng SX, Zhang M, Yi B, et al. Research progress on chemical constituents in *Callicarpa nudiflora* and their pharmacological activities [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 1015-1026.
- [4] Shao BM, Li XF, Yan BB, 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 (中国药房)*, 2023, 34: 2465-2470.
- [5] Mao J, Zhou J, Xue J, et al. Establishment of comprehensive protection system for intellectual property of single herb by taking *Callicarpa nudiflora* products of Jiuzhitang for example [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2024, 30: 11-18.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 378, 1816, 1817.
- [7] He Y, Hu XX, Hu WT, et al. Simultaneous determination of 6 constituents in Luohua Zizhu series preparations by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*, 2021, 38: 2815-2819.
- [8] Huang M, Chen ZX, Yu FL, et al. Distribution and dynamic changes of chemical constituents in *Callicarpa nudiflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 1308-1315.
- [9] He Y, Hu XX, Zeng WY, et al. Study on HPLC fingerprint and multi-indicator quantitative analysis of Luohua Zizhu Dispersible Tablets [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2020, 31: 969-974.
- [10] Wu YS, Shi L, Liu XG, et al. Chemical profiling of *Callicarpa nudiflora* and its effective compounds identification by compound-target network analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113110.
- [11] Li YM, Yang YF, Kang XD, et al. Study on the anti-inflammatory effects of *Callicarpa nudiflora* based on the spectrum-effect relationship [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 806808.
- [12] Schmözl L, Wallert M, Lorkowski S. Optimized incubation regime for nitric oxide measurements in murine macrophages using the Griess assay [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 449: 68-70.
- [13] Sun HJ. Study of Efficacy of Wine-processed *Scutellaria baicalensis* on LPS-induced Acute Lung Injury Based on Gut Microbiota and Related Metabolomics (酒炙黄芩干预LPS致急性肺损伤小鼠的肠道菌群与相关代谢组学研究) [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine, 2021.
- [14] Deng HZ, Chen K, Li P, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits pulmonary fibrosis in rats by regulating AMPK/NLRP3 pathway-mediated pyroptosis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2023, 54: 841-848.
- [15] Xu ML, Wang YY, Yu M, et al. Study on chemical components of aqueous extract from *Callicarpa nudiflora* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2022, 34: 42-49.
- [16] Yi B, Zhang M, Hu YM, et al. Analysis of constituents from different parts of *Callicarpa nudiflora* by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 4661-4669.
- [17] Tu YH, Sun LN, Guo ML, et al. The medicinal uses of *Callicarpa L.* in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146: 465-481.
- [18] Zhang TJ, Bai G, Liu CX. The concept, core theory and research methods of Chinese medicine quality markers [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 187-196.
- [19] Yu DJ, Wu L. Progress in the treatment of systemic inflammatory response syndrome caused by abdominal infection with Chinese medicine [J]. *World J Integr Tradit West Med (世界中西医结合杂志)*, 2010, 5: 635-637.
- [20] Mendes SJF, Sousa FIAB, Pereira DMS, et al. Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syn-

- drome through TRPA1-dependent and independent mechanisms [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34: 60-70.
- [21] Wang MZ, Jia JF, Cui YZ, et al. Research progress on lipopolysaccharide-induced intestinal barrier signaling pathways [J]. *Chin J Anim Nutr (动物营养学报)*, 2020, 32: 2060-2065.
- [22] Zhang SJ, Qi SY, Gong M, et al. Analysis of action mechanism of TCM external treatment for systemic inflammatory response syndrome [J]. *J Gansu Univ Chin Med (甘肃中医药大学学报)*, 2021, 38: 13-16.
- [23] Li C. Effects of Lipopolysaccharide on Morphology and Defense Function of Intestinal Mucosal Epithelial Barrier in Mice (脂多糖对小鼠肠道黏膜上皮屏障形态结构与防御功能的影响) [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2022.
- [24] Cui R. Correlation Researches Between Protection of *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Coptis chinensis* Franch on Rat's Acute Lung Injury and Cholinergic Anti-inflammatory Pathway (黄芩和黄连对急性肺损伤大鼠的保护作用及其与胆碱能抗炎通路的相关性实验研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [25] Wang XF, Jin M., Tong J, et al. Protective effect of hydroxysafflor yellow A against acute lung injury induced by oleic acid and lipopolysaccharide in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 940-944.
- [26] Huang SJ, Fan WJ, Pei JR, et al. The effect of Jiegeng decoction on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice based on metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1913-1921.
- [27] Wang SQ. Protective Mechanism of Chlorogenic Acid on LPS-induced Intestinal Epithelial Injury of Mouse (绿原酸对LPS诱导小鼠肠上皮损伤的保护机制研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2020.
- [28] Yang ZM, Gu SX, Yan XJ, et al. Study on anti-inflammatory activity of *Callicarpa nudiflora* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2015, 26: 2620-2622.
- [29] Chen QG, Zhao Y, Li MS, et al. HPLC-MS and network pharmacology analysis to reveal quality markers of Huo-Xue-Jiang-Tang Yin, a Chinese herbal medicine for Type 2 diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 1072975.
- [30] Cheng Yao, Bi YL, Feng X, et al. Identification of potential Q-markers of Semen Armeniacae Amarum based on UPLC-MS/MS and metabonomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3195-3202.
- [31] Liu SB, Sun H, Lu SW, et al. Deciphering Q-markers of Zhibai Dihuang Pill based on chinmedomics [J]. *Acta Chin Med Pharmacol (中医药学报)*, 2021, 49: 14-22.
- [32] Dong XT, Ke JT, Gan PR, et al. To explore the quality markers of Huangqin Qingre Chubi capsule in the treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology combined with pharmacokinetics and target verification [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1422-1429.
- [33] Feng YY, Xie YY, Wang YP, et al. Molecular mechanism of Xuebijing injection in treatment of sepsis according to "drug-target-pathway" network [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 556-562.
- [34] Xu JR, Yu QC, Lai L, et al. Comprehensive quality evaluation of *Scutellaria baicalensis* Georgi by determination of multi-component content [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 3141-3152.
- [35] Gao MY, Lang YX, Zhang YY, et al. Research progress on quality markers of Chinese materia medica [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant (特产研究)*, 2022, 44: 149-153, 160.
- [36] Xiao Y, Ren Q, Wu L. The pharmacokinetic property and pharmacological activity of acteoside: a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113296.
- [37] Liu Y, Huang W, Zhu Y, et al. Acteoside, the main bioactive compound in *Osmanthus fragrans* flowers, palliates experimental colitis in mice by regulating the gut microbiota [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 1148-1162.
- [38] Gao H, Cui Y, Kang N, et al. Isoacteoside, a dihydroxyphenylethyl glycoside, exhibits anti-inflammatory effects through blocking toll-like receptor 4 dimerization [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 2880-2896.
- [39] Jiang WL, Xu Y, Zhang SP, et al. Forsythoside B protects against experimental sepsis by modulating inflammatory factors [J]. *Phytother Res*, 2012, 26: 981-987.
- [40] Zielińska D, Zieliński H, Laparra-Llopis JM, et al. Caffeic acid modulates processes associated with intestinal inflammation [J]. *Nutrients*, 2021, 13: 554.
- [41] Wang XY, Yuan T, Yin N, et al. Luteoloside protects the uterus from *Staphylococcus aureus*-induced inflammation, apoptosis, and injury [J]. *Inflammation*, 2018, 41: 1702-1716.
- [42] De Beer D, Joubert E, Malherbe CJ, et al. Use of countercurrent chromatography during isolation of 6-hydroxyluteolin-7-O- β -glucoside, a major antioxidant of *Athrixia phyllicoides* [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 6179-6186.
- [43] Lee H, Krishnan M, Kim M, et al. Rhamnetin, a natural flavonoid, ameliorates organ damage in a mouse model of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*-induced sepsis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 12895.
- [44] Gong G, Guan YY, Zhang ZL, et al. Isorhamnetin: a review of pharmacological effects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110301.
- [45] Tan XJ, Yu FL, Huang M, et al. Effects of different primary processing methods on the contents of the main chemical composition of *Callicarpa nudiflora* Hook. et Arn [J]. *Chin J Trop Agric (热带农业科学)*, 2018, 38: 33-39.
- [46] Xie YY, Wang YM, Luo GA. Identification and application of biomarkers in life cycle of drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 456-464.