

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.019.html>

鬼针草乙醇提取物化学成分及其生物活性研究

韩 续 陈飞虎 葛金芳 李 宁

摘要 目的 对鬼针草乙醇提取物化学成分进行分离纯化鉴定,并初步筛选出具有较好生物活性的单体。方法 用 HPD 100 型大孔吸附树脂、小孔树脂凝胶 MCI、Sephadex LH-20 凝胶、硅胶等柱层析方法分离纯化,经核磁解析并与文献比对鉴定结构。体外培养 HSC-T6 肝星状细胞和 RAW264.7 腹腔巨噬细胞,不同浓度(6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)单体化合物刺激后,MTT 法观察单体化合物对细胞增殖的影响,ELISA 法测定单体化合物对 RAW264.7 细胞分泌肿瘤坏死因子(TNF)- α 的影响。结果 本研究中共得到 12 个单体化合物,分别为:咖啡酸乙酯(1)、异奥卡宁(2)、苏式-二羟基脱氢二松柏醇(3)、正二十八烷(4)、橙皮苷(5)、柚皮素(6)、芹菜素(7)、山奈酚-3-O- α -鼠李糖苷(8)、木犀草素(9)、麦芽糖(10)、没食子酸(11)、金丝桃苷(12),其中化合物 1、3 为首次从该植物中分离得到。化合物 9、11(6.25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$)可抑制 HSC-T6 细胞增殖反应,并显著减少 RAW264.7 细胞培养上清液中的 TNF- α 浓度。结论 本研究从鬼针草乙醇提取物中分离 12 个单体化合物,其中 2 个为首次分离得到。化合物 9 和 11 具有一定的体外抑制 HSC-T6 细胞增殖和 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 的作用。

关键词 鬼针草;单体;肝星状细胞;生物活性

中图分类号 R 348

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)12-1823-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.019

菊科鬼针草为一年生草本植物,广泛分布于热带以及亚热带地区,在我国大部分也有分布。鬼针草(*Bidens bipinnata* L.)为我国常用民间药,药用历史悠久,始载于《本草拾遗》,民间主要用于治疗伤风感冒、咽痛、腹痛腹泻、疟疾、糖尿病等。近代药理学研究^[1-2]也表明鬼针草具有抗疟疾、抗菌、抗氧化等药理作用。课题组前期研究^[3-4]显示鬼针草乙醇提取物具有抗肝纤维化作用,对于小鼠肝损伤以及

大鼠肝纤维化均有保护作用。该研究旨在更进一步的利用鬼针草药材,明确鬼针草药效的物质基础,对鬼针草进行提取分离,并将得到的化合物进行初步的活性筛选,为进一步利用鬼针草提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 AM-300、400、DRX-500 型核磁共振光谱仪(瑞士 Bruker 公司,四甲基硅烷作为内标);HPD100 型大孔树脂(河北宝恩公司);薄层色谱 GF254 硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司);Sephadex LH-20(瑞典 GEHealthcare Bio-Sciences 公司);MCI 小孔树脂(日本 Mitsubishi Chemical 公司);柱层析硅胶(青岛海洋化工厂);氘代试剂、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(美国 Sigma 公司);DMEM&PBS(美国 Hyclone 公司);肝星状细胞 HSC-T6(江苏凯基生物股份有限公司);ELISA 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司);转化生长因子 β 1(美国 PeproTech 公司);表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)(大连美仑生物技术有限公司);小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(中国科学院上海细胞研究所)。鬼针草采集于安徽省绩溪县,经安徽医科大学张群林教授鉴定为菊科鬼针草属鬼针草 *Bidens bipinnata* L. 标本号 JX053。

1.2 方法

1.2.1 分离提取 将 55 kg 鬼针草干燥全草用 70% 乙醇提取两遍,提取液蒸发至无醇味,过 HPD100 大孔树脂,分别用三倍柱体积双蒸水和 70% 乙醇洗脱,收集 70% 乙醇洗脱部分,蒸干得到浸膏 1.8 kg。浸膏用水溶解后上 HPD100 大孔树脂柱,用 10% ~ 100% 乙醇梯度洗脱,共得 5 个部分, B1 ~ B5。B1(350 g)部分过硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,最后甲醇洗脱)得 9 个部分 B1-1 ~ B1-9, B1-1 经 Sephadex LH-20 凝胶柱(30% ~ 100% 甲醇梯度洗脱)硅胶柱(石油醚:乙酸乙酯 8:1 ~ 1:1 梯度洗脱)、B1-2 经 MCI 柱(20% ~ 100% 甲醇梯度洗脱)、B1-3 硅胶柱(氯仿:甲醇 10:1 ~ 4:1 梯度洗脱)均得到化合物 1(共 2.079 2 g);B1-4 过硅胶柱(氯仿:甲醇 20:1 ~ 1:1 梯度

2017-07-07 接收

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项课题(编号:2009ZX09103-386)

作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:韩 续,男,硕士研究生;

陈飞虎,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: cf-hchina@sohu.com

洗脱)再过 SephadexLH-20 凝胶柱(乙醇洗脱)得化合物 2 (0.191 1 g); B1-5 经 SephadexLH-20 凝胶柱(30%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B1-5-1 和 B1-5-4, 再分别过硅胶柱(氯仿: 甲醇 18:1、氯仿: 甲醇 200:1 洗脱)得化合物 3 (0.022 8 g)、化合物 4 (0.008 3 g); B1-6 经 SephadexLH-20 凝胶柱(20%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B1-6-1~B1-6-4, B1-6-2、B1-6-3 分别再过硅胶柱(氯仿: 甲醇 20:1、8:1 洗脱)再经 SephadexLH-20 凝胶柱(乙醇洗脱)纯化得化合物 5 (0.018 8 g)、化合物 6 (0.217 8 g); B1-7 经硅胶柱(氯仿: 甲醇 30:1~1:1 梯度洗脱)得 B1-7-3 再过 SephadexLH-20 凝胶柱(乙醇洗脱)得化合物 9 (0.157 8 g); B2 (267 g) 过硅胶柱梯度洗脱得 B2-1~B2-7, B2-1 经 MCI 柱(20%~100% 甲醇梯度洗脱)再过硅胶柱(氯仿: 甲醇 70:1)再经过 SephadexLH-20 凝胶柱(乙醇洗脱)得化合物 11 (0.015 8 g); B2-2 经 MCI 柱(20%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B2-2-2 过 SephadexLH-20 (20%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B2-2-2-3 过硅胶柱(氯仿: 甲醇 35:1 洗脱)得化合物 7 (0.075 8 g); B2-3 过 SephadexLH-20 (20%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B2-3-3 过硅胶柱硅胶柱(氯仿: 甲醇 19:1 洗脱)得化合物 8 (0.043 6 g); B2-4 经 SephadexLH-20 (20%~100% 甲醇梯度洗脱)得 B2-4-2 和 B2-4-3, 分别过硅胶柱(氯仿: 甲醇 6:1、4:1 洗脱)再经 SephadexLH-20 凝胶柱(乙醇洗脱)纯化得到化合物 10 (0.008 9 g)、12 (0.023 3 g)。

1.2.2 结构鉴定 根据化合物的 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR 等核磁数据及与文献比对确定化合物结构。

1.2.3 药理活性初步筛选

1.2.3.1 细胞培养及分组 肝星状 HSC-T6 细胞用含 10% 热灭活的胎牛血清 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。设空白对照组、化合物不同浓度组(100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$)及阳性药物组(EGCG 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$)。取对数生长期的细胞(5 000/孔)接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后按上述分组加入相应药物, 空白对照组加入等体积培养基, 每个浓度 5 个复孔。

RAW264.7 细胞用含 10% 热灭活的胎牛血清 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。设空白对照组、模型组、化合物不同浓度组(100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$)及阳性药物组(EGCG 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$)。取对数生长期的细胞(100 000/孔)接种于 24 孔板中, 培养

12 h 后加入 LPS(1 mg/L)刺激 2 h 后按上述分组加入相应药物, 模型组只加入 LPS 刺激不加入药物, 空白对照组加入等体积培养基, 继续培养 24 h。收集培养上清液于 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min, -20 °C 保存待测。

1.2.3.2 MTT 法测定细胞增殖能力 细胞培养 48 h 后每孔加 20 μl MTT(5 mg/ml), 培养 4 h 后弃上清液, 每孔加 150 μl 的 DMSO, 震荡 10 min 后用酶标仪(490 nm 处)测吸光度值。实验重复 3 次。

1.2.3.3 ELISA 法测定 RAW264.7 细胞培养上清液中的中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 含量 TNF- α 含量检测按 ELISA 试剂盒说明操作。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素变量的方差分析。

2 结果

2.1 分离得到的 12 个化合物理化数据及其结构

化合物 1: 白色晶体, 分子式: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$, ^1H -NMR (CD_3OD 400 MHz) δ : 7.53 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.04 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, J = 8.5, 1.7 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 6.25 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 4.21 (2H, q, J = 7.2 Hz, $-\text{CH}_2-$), 1.31 (3H, t, J = 7.2 Hz, $-\text{CH}_3$); ^{13}C -NMR (CD_3OD 101 MHz) δ : 14.62 (C-1'), 61.40 (C-2'), 115.12 (C-8), 115.30 (C-2), 116.50 (C-5), 122.86 (C-6), 127.76 (C-1), 146.71 (C-4), 146.81 (C-3), 149.53 (C-7), 169.32 (C-9)。以上理化数据对比文献^[5]基本相同, 因此鉴定该化合物为咖啡酸乙酯。

化合物 2: 棕黄色粉末, 分子式: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$, ^1H -NMR (CD_3OD 400 MHz) δ : 7.25 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.94 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-2'), 6.90 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H-6'), 6.74 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 6.47 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-6), 5.31 (dd, J = 12.2, 3.0 Hz, 1H, H-2), 3.01 (dd, J = 16.8, 12.6 Hz, 1H, H-3ax), 2.67 (dd, J = 16.9, 3.0 Hz, 1H, H-3eq); ^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 194.07 (C-4), 153.97 (C-7), 152.67 (C-9), 146.86 (C-4'), 146.41 (C-3'), 133.94 (C-8), 131.86 (C-1'), 119.58 (C-6'), 119.34 (C-5), 116.19 (C-5'), 115.63 (C-1), 114.98 (C-2'), 110.87 (C-6), 81.52 (C-2), 45.00 (C-3)。以上数据对比文献^[6]基本一样, 确定

化合物为异奥卡宁。

化合物 3: 淡黄色粉末, 分子式: $C_{20}H_{24}O_8$, 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.93 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.89 (br. s), 6.81 (dd, $J = 1.5, 8.0$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.51 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.76 (m, 1H), 3.48 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.37 (dd, $J = 11.5, 6.5$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 149.28 (C-4'), 149.07 (C-3), 147.71 (C-4), 145.45 (C-3'), 137.07 (C-1'), 134.83 (C-1), 129.97 (C-5'), 119.87 (C-6), 116.79 (C-6'), 116.33 (C-5), 112.76 (C-2'), 110.69 (C-2), 89.34 (C-7), 77.73 (C-8'), 75.62 (C-7'), 65.00 (C-9), 64.46 (C-9'), 56.89 (C-3'-OCH₃), 56.55 (C-3-OCH₃), 55.55 (C-8)。以上数据与文献^[7]对照一致, 确定化合物为苏式-二羟基脱氢二松柏醇。

化合物 4: 白色粉末, 分子式: $C_{28}H_{58}$, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 0.95 (t, $J = 6.5$ Hz, 6H), 1.25 (m, 52H); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 101 MHz) δ : 32.08 (C-3, 26), 30.32 (C-5, 24), 29.86 (C-4, 25), 22.85 (C-2, 27), 14.28 (C-1, 28)。以上数据对比文献^[8]一致, 确定化合物为正二十八烷。

化合物 5: 黄色粉末, 分子式: $C_{28}H_{34}O_{15}$, 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.02 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 6.94 (m, 1H), 6.14 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.12 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J = 3.0, 12.5$ Hz, 1H), 4.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.53 (dd, $J = 12.0, 17.5$ Hz, 1H), 2.76 (dd, $J = 3.0, 17.5$ Hz, 1H), 1.08 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 197.08 (C-4), 165.17 (C-7), 163.08 (C-5), 162.53 (C-9), 147.99 (C-4'), 146.48 (C-3'), 130.92 (C-1'), 118.00 (C-6'), 114.18 (C-2'), 112.03 (C-5'), 103.35 (C-1), 100.64 (C-1'''), 99.45 (C-1''), 96.41 (C-6), 95.57 (C-8), 78.42 (C-2), 76.30 (C-3'''), 75.54 (C-5'''), 73.01 (C-2'''), 72.10 (C-4'''), 70.73 (C-4''), 70.30 (C-2'''), 69.62 (C-3'''), 68.36 (C-5'''), 66.06 (C-6''), 55.70 (-OCH₃), 42.08 (C-3), 17.88 (C-6'''). 以上数据对比文献^[9]一致, 确定化合物为橙皮苷。

化合物 6: 白色针状结晶, 分子式: $C_{15}H_{12}O_5$, 1H -NMR (CD_3COCD_3 , 300 MHz) δ : 12.17 (s, 5-OH, 1H), 8.75 (s, 7-OH, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.7, 3$ Hz, 2H), 6.89 (dd, $J = 8.7, 3$ Hz, 2H), 5.95 (s, 2H),

5.44 (dd, $J = 12.6, 3$ Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 17.5, 12.6$ Hz, 1H), 2.72 (dd, $J = 17.5, 3$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (CD_3COCD_3 , 75 MHz) δ : 43.43 (C-3), 79.90 (C-2), 95.84 (C-8), 96.80 (C-6), 103.11 (C-5a), 116.16 (C-3', 5'), 128.99 (C-2', 6'), 130.66 (C-1'), 158.74 (C-4'), 164.32 (C-5), 165.23 (C-8a), 167.49 (C-7), 197.21 (C-4)。以上数据对比文献^[10]一致, 确定化合物为柚皮素。

化合物 7: 黄色粉末, 分子式: $C_{15}H_{10}O_5$, 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 12.95 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.46 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 6.18 (s, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 181.75 (C-4), 164.13 (C-2), 163.73 (C-7), 161.45 (C-5), 161.17 (C-4'), 157.31 (C-9), 128.48 (C-2', 6'), 121.17 (C-1'), 115.95 (C-3', 5'), 103.70 (C-1), 102.84 (C-3), 98.83 (C-6), 93.96 (C-8)。以上数据对比相关文献^[11]基本相同, 确定化合物为芹菜素。

化合物 8: 淡黄色粉末, 分子式: $C_{21}H_{20}O_{11}$, 1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.72 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.99 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.32 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.34 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'), 4.20 ~ 3.69 (4H, m, rha-H), 0.90 (3H, d, $J = 5.7$ Hz, CH₃-6''); ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 179.56 (C-4), 165.81 (C-7), 163.16 (C-5), 161.52 (C-4'), 159.22 (C-2), 158.48 (C-9), 136.19 (C-3), 131.89 (C-2', 6'), 122.61 (C-1'), 116.48 (C-3', 5'), 105.90 (C-1), 103.47 (C-1''), 99.80 (C-6), 94.74 (C-8), 73.18 (C-4''), 72.09 (C-3''), 72.00 (C-5''), 71.90 (C-2''), 17.64 (C-6'')。以上数据对比相关文献^[12]基本相同, 确定化合物为山奈酚-3-O- α -L-鼠李糖苷。

化合物 9: 浅灰色粉末, 分子式: $C_{15}H_{10}O_6$, 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.98 (s, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.44 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 181.68 (C-4), 164.18 (C-7), 163.91 (C-2), 161.49 (C-5), 157.31 (C-9), 149.74 (C-4'), 145.76 (C-3'), 121.49 (C-1'), 119.01 (C-6'), 116.03 (C-5'), 113.37 (C-2'), 103.70 (C-1), 102.87 (C-3), 98.85 (C-6), 93.87 (C-8)。以上数据对比相关文献^[13]基本相同, 确定化合物为木犀草素。

化合物 10: 白色针晶, 分子式: $C_{12}H_{22}O_{11}$, 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.10 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3OD) δ : 98.04 (C-1'), 93.83 (C-1), 77.94 (C-5), 77.88 (C-4), 76.15 (C-3), 74.75 (C-3'), 73.70 (C-2'), 72.89 (C-2), 71.70 (C-5'), 71.57 (C-4'), 62.73 (C-6), 62.63 (C-6')。以上数据对比文献^[14]基本相同, 确定化合物为麦芽糖。

化合物 11: 无色针状结晶, 分子式: $C_7H_6O_5$, 1H -NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ : 7.15 (s, 2H); ^{13}C -NMR (101 MHz, CD_3COCD_3) δ : 167.92 (C-7), 145.99 (C-3, 5), 138.70 (C-4), 121.96 (C-1), 110.11 (C-2, 6)。以上数据对比相关文献^[15]基本相同, 确定化合物为没食子酸。

化合物 12: 黄色粉末, 分子式: $C_{21}H_{20}O_{12}$, 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.64 (s, 4-OH), 10.87 (s, 7-OH), 9.74 (s, 4'-OH), 9.16 (s, 3'-OH), 7.67 (dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, 1H), 7.52 (br. s, 1H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.14 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.87 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.65 (s, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 177.51 (C-4), 164.15 (C-7), 161.25 (C-5), 156.32 (C-9), 156.25 (C-2), 148.48 (C-4'), 144.85 (C-3'), 133.49 (C-3), 122.03 (C-1'), 121.11 (C-6'), 115.95 (C-5'), 115.20 (C-2'), 103.93 (C-1), 101.79 (C-1'), 98.68 (C-6), 93.51 (C-8), 75.87 (C-5'), 73.20 (C-3'), 71.21 (C-2'), 67.94 (C-4'), 60.15 (C-6')。以上数据与文献^[16]对照一致, 确定化合物为金丝桃苷。化学结构如图 1 所示。

2.2 不同化合物对 HSC-T6 细胞增殖能力的影响

MTT 法检测分离得到的 12 个化合物对 HSC-T6 细胞增殖能力的影响, 结果表明化合物 1、2、6、7、9、11 有一定的抑制 HSC-T6 细胞增殖的能力, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值如表 1 所示。化合物 11 的抑制活性与阳性药相当。

2.3 不同化合物对 RAW264.7 细胞增殖能力的影响 MTT 法检测分离得到的 12 个化合物对 RAW264.7 细胞增殖的影响, 结果表明化合物 1、2、7、9、11 有一定的抑制 RAW264.7 细胞增殖的能力, 表 2 为其 IC_{50} 值, 化合物 9、11 的抑制活性较强。

2.4 不同化合物对 RAW264.7 细胞分泌 $TNF-\alpha$

的影响 ELISA 法测定 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞培养上清液中 $TNF-\alpha$ 的含量, 结果见图 2。化合物 2、7、9、11 对 RAW264.7 细胞分泌 $TNF-\alpha$ 有一定的抑制作用。

表 1 部分单体化合物对 HSC-T6 细胞抑制效应的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

化合物	IC_{50} ($\mu mol/L$)
1	23.95 $\pm$ 3.55
2	30.00 $\pm$ 1.46
6	80.32 $\pm$ 0.03
7	33.15 $\pm$ 0.02
9	38.77 $\pm$ 0.95
11	3.96 $\pm$ 0.01
EGCG	4.27 $\pm$ 0.01

表 2 部分单体化合物对 RAW264.7 细胞抑制效应的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

化合物	IC_{50} ($\mu mol/L$)
1	108.37 $\pm$ 0.15
2	5.00 $\pm$ 1.58
7	80.20 $\pm$ 0.19
9	63.82 $\pm$ 0.22
11	37.87 $\pm$ 0.13
EGCG	73.42 $\pm$ 0.27

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径。目前认为, 肝纤维化是可逆性病变^[17]。近年来大量研究^[18]表明中医、中草药在抗肝纤维化确有优势, 许多中药都有干扰或抑制肝纤维化发生发展的作用, 如虎杖、三七、黄芪等都能达到改善肝功能、调节免疫、抗肝纤维化的作用。但由于中成药多成分、多作用靶点的特点, 作用机制较复杂, 为确保安全性, 需要更深入的研究。随着科研实力的增强以及对中医药深入的研究开发, 中医药在肝纤维化治疗方面会发挥更多更好的效果。前期课题组研究^[19]显示鬼针草提取物鬼针草 70% 乙醇提取物具有保肝护肝作用, 但其化学成分以及发挥效应的成分尚不明确。

肝脏内细胞外基质的过度沉积是肝纤维化发生的特征性改变, 目前普遍推测肝星状细胞的活化增生是肝纤维化发生的细胞学基础, 是肝纤维化发生过程的中心环节, 同时活化的肝星状细胞也是合成细胞外基质的主要细胞和基地^[20]。本研究以 HSC-T6 细胞为研究对象, 观察了鬼针草乙醇提取物中分离得到的不同单体化合物对 HSC-T6 细胞增殖能力的影响。结果表明, 化合物 1、2、6、7、9、11 (6.25 ~ 100 $\mu mol/L$) 可显著抑制 HSC-T6 细胞增殖。综合

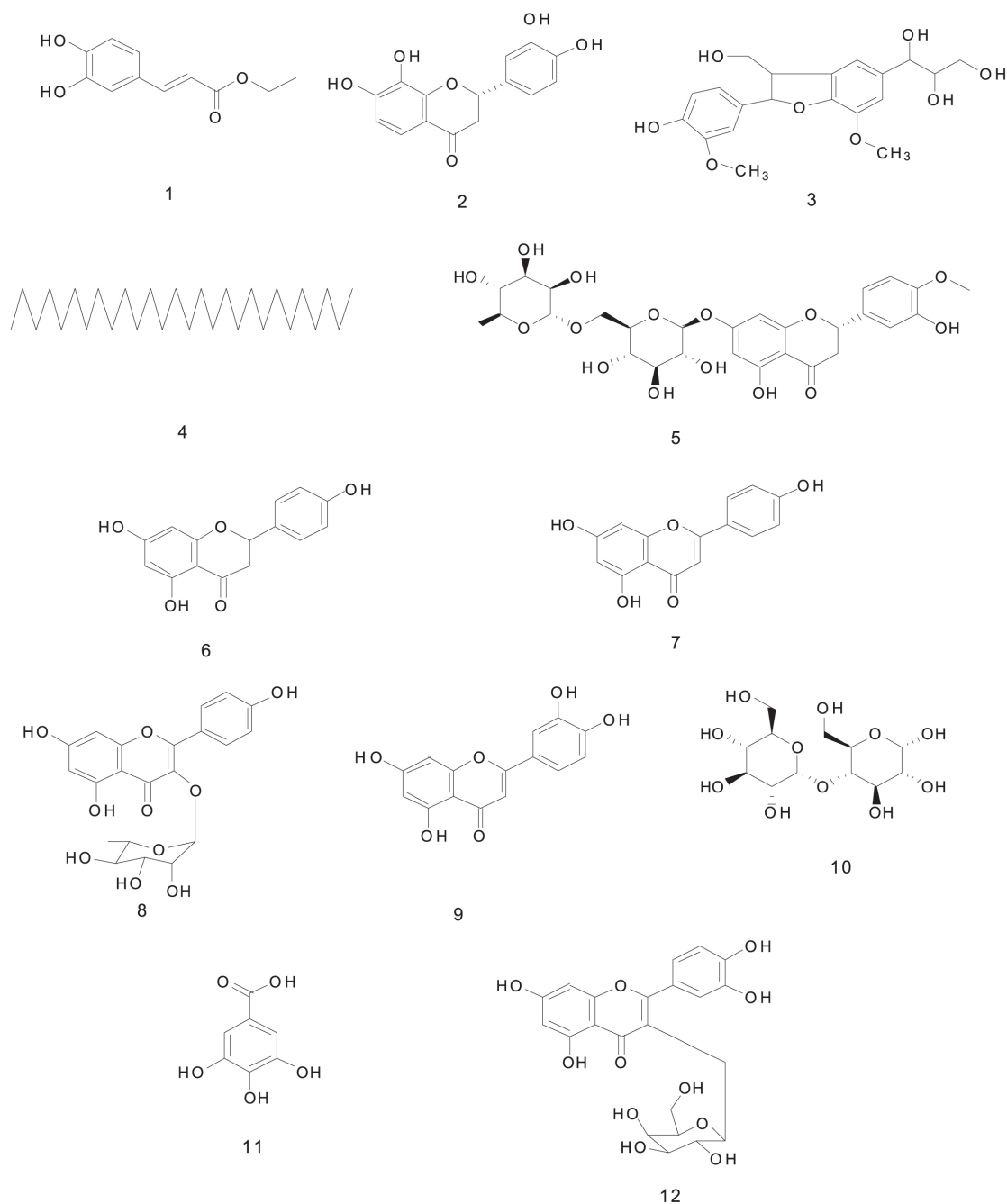


图1 化合物1~12的化学结构

本课题组前期研究^[3-4]结果:鬼针草 70% 乙醇提取物可显著降低小鼠血清谷氨酸转氨酶、谷草转氨酶活性,明显减轻小鼠肝脏病理损伤程度而发挥保肝作用,对四氯化碳导致的肝纤维化有明显治疗效果,提示鬼针草 70% 乙醇提取物的抗纤维化作用可能与抑制肝星状细胞增殖有关,其具体机制有待进一步研究。

炎症是纤维化发生的始发因素,肝脏炎症发生时巨噬细胞释放炎症介质,对肝脏造成损伤,损伤的

肝细胞等释放细胞因子如白介素-1、白介素-6、肿瘤坏死因子 α 等;同时炎症时单核巨噬细胞会合成和释放白介素-1、白介素-6、肿瘤坏死因子 α 等,直接或间接促 HSC 的激活,促进肝纤维化的发生发展^[21]。本研究中体外培养小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 细胞株,给予不同浓度的单体化合物,观察其对 RAW264.7 细胞增殖及其培养上清液中 TNF- α 含量的影响。结果表明,化合物 2、7、9、11 (6.25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 可抑制 RAW264.7 细胞增殖,

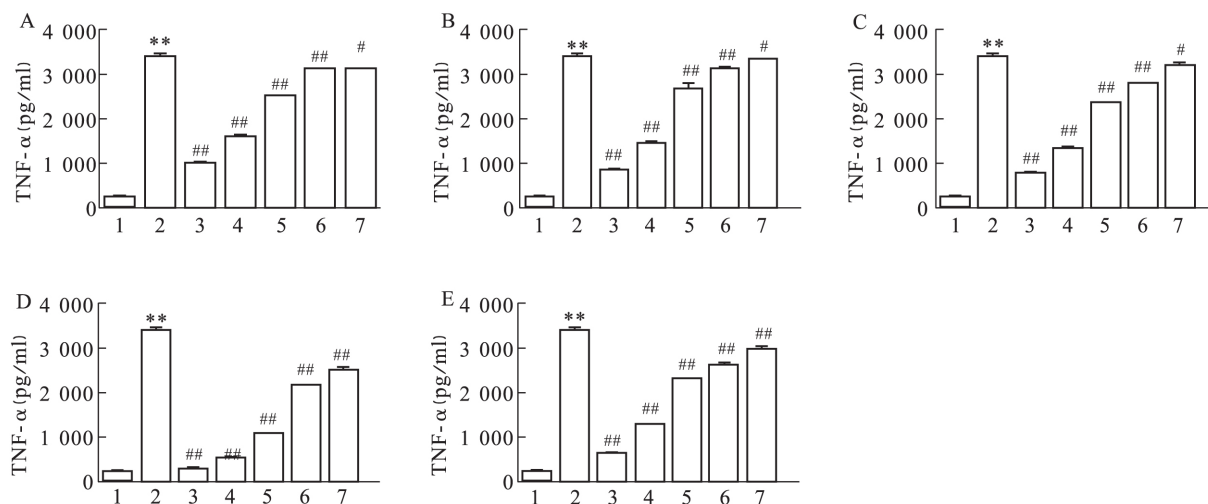


图2 部分化合物对LPS刺激的RAW264.7分泌TNF-α的影响

A:化合物2; B:化合物7; C:化合物9; D:化合物11; E:阳性对照药; 1:空白对照组; 2:模型组; 3:100 μmol/L; 4:50 μmol/L; 5:25 μmol/L; 6:12.5 μmol/L; 7:6.25 μmol/L; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

并显著减少其分泌的TNF-α量,提示这些化合物具有一定的抗炎作用,这可能是鬼针草70%乙醇提取物抗肝纤维化作用的机制之一。

综上所述,本研究对鬼针草乙醇提取物I、II部分进行分离纯化得到12个单体化合物,其中2个为首次从该植物中分离得到。体外药效学筛选结果提示,分离得到的部分化合物具有较好的抑制肝星状细胞增殖和巨噬细胞分泌TNF-α的生物活性,是其抗肝纤维化作用的可能机制。本研究可为鬼针草的进一步研究开发提供科学依据。

参考文献

- [1] Bartolome A P, Villaseñor I M, Yang W C. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:340215.
- [2] Yang W C. Botanical, pharmacological, phytochemical and toxicological aspects of the antidiabetic plant *Bidens pilosa* L [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014:698617.
- [3] Zhong M M, Chen F H, Yuan L P, et al. Protective effect of total flavonoids from *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59(7): 1017-25.
- [4] Yuan L P, Chen F H, Ling L, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(10): 1393-402.
- [5] 李阳, 张春云, 林挺, 等. 白花地胆草的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1751-5.
- [6] 邓子云, 陈飞虎, 李宁, 等. 鬼针草总黄酮部分化学成分研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(10): 1456-9.
- [7] Chai X Y, Ren H Y, Xu Z R, et al. Investigation of two flacourtiaceae plants: *Bennettiodendron leprosipes* and *Flacourtia ramont-chi* [J]. Planta Med, 2009, 75(11): 1246-52.
- [8] 苏明智, 罗舟, 颜鸣, 等. 脱皮马勃化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 664-6.
- [9] 吕敏, 苏艳芳, 高源, 等. 苏木蓝和花木蓝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 356-60.
- [10] 莫顺燕, 杨永春, 石建功. 桑黄化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 339-41.
- [11] 达娃卓玛, 周燕, 白央, 等. 绵头雪莲花的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1032-5.
- [12] Wang G J, Tsai T H, Lin L C. Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum* [J]. Phytochemistry, 2007, 68(19): 2455-64.
- [13] Youssef D, Frahm A W. Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*. III. Phenolic constituents of the aerial parts [J]. Planta Med, 1995, 61(6): 570-3.
- [14] 李小第, 姜会敏, 霍雅玉, 等. 刺玫果果肉石油醚层化学成分及胰脂酶和α-糖苷酶抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(6): 1011-5.
- [15] 董礼, 李磊, 廖志华, 等. 柴胡红景天化学成分的研究 [J]. 西北植物报, 2007, 27(12): 2564-7.
- [16] 任恒春, 万定荣, 谷婧, 等. 炭灰母化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1387-9.
- [17] Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39 Suppl 1: S60-3.
- [18] 汪涛, 涂燕云, 杨文凤, 等. 几种常用中成药治疗肝纤维化研究近况 [J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(11): 1143-5.
- [19] 孙旭群, 陈飞虎, 吴繁荣, 等. 鬼针草总黄酮对大鼠免疫性肝纤维化治疗作用及抗氧化机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44

(下转第1844页)

was 96.77% and 92.86% respectively, 12 months after operation were 89.29% and 92.31% respectively, which were significantly higher than the control group. The recurrence rate of the experimental group was 7.14%, which was significantly lower than that of control group, and the recurrence time of the experimental group was delayed. At 6, 12 months after operation, the menstrual blood volume, reduction rate of uterus size and CA125 value of the experimental group was lower than those of the control group. The rate of uterus volume reduction was higher than the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Scores were decreased and uterine size were significantly higher in the experimental subgroups (age > 38) dysmenorrhea than the experimental subgroups (age ≤ 38). Hypermenorrhea scores and menstrual volume decline in the experimental subgroup (course > 4) were significantly higher than the experimental subgroups (course ≤ 4), the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** HIFU combined with GnRH-a treatment is preferable to HIFU treatment, which can reduce the recurrence rate, delays the recurrence, and is more suitable for older, longer course patients with adenomyosis.

Key words adenomyosis; high intensity focused ultrasound; gonadotropin releasing hormone antagonist

(上接第 1838 页)

(4):462-5.

[20] Zhang C Y, Yuan W G, He P et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets

[J]. World J Gastroenterol 2016 22(48):10512-22.

[21] Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases[J]. J Hepatol, 2012 57(3):642-54.

Studies on the compounds of ethanol extracts from *Bidens bipinnata* L. and their biological activities

Han Xu, Chen Feihu, Ge Jinfang, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To isolate, purify and identify the chemical constituents from the ethanol extracts of *Bidens bipinnata* L. and screen for the bio activity. **Methods** The constituents of the total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. were isolated by macroporous resin HPD100, following by middle chromatogram isolated gel (MCI), Sephadex LH-20 and silica gel column chromatography. The structures were identified by NMR. The HSC-T6 cells and RAW264.7 cells were cultured and stimulated with the compounds with the concentrations ranging from 6.25 to 100 $\mu\text{mol/L}$. The cell proliferation ability was detected using MTT method, and the concentration of tumor necrosis factor α in the supernatant of RAW264.7 cells was measured via ELISA. **Results** Twelve compounds were isolated and identified as ethyl caffeate (1), isookanin (2), Threo-dihydroxydehydrodiconiferyl alcohol (3), octacosane (4), hesperidin (5), naringenin (6), apigenin (7), keampferol-3-O- α -L-rhamnoside (8), luteolin (9), maltose (10), gallic acid (11), hyperin (12). Compounds 1 and 3 were isolated from this genus for the first time. Components 9 and 11 could inhibit the proliferation of HSC-T6 cells and decrease the tumor necrosis factor α concentration in the supernatant of RAW264.7 cells. **Conclusion** Twelve compounds are isolated from ethanol extracts of *Bidens bipinnata* L., among which compound 1 and 3 are first isolated. Compound 9 and 11 could inhibit the proliferation of HSC-T6 cells and decrease the TNF- α concentration in the supernatant of RAW264.7 cells *in vitro*.

Key words *Bidens bipinnata* L.; components; HSC-T6; bio activities