

当归挥发油对人脐静脉内皮细胞增殖作用的谱效关系

马霞¹, 丁军霞², 顾志荣¹, 孙宇靖^{1,3}, 王亚丽^{1,3,4*}

- (1. 甘肃中医药大学 科研实验中心, 兰州 730000; 2. 第二师库尔勒医院, 新疆 库尔勒 841000)
3. 甘肃中医药大学 当归研究所, 兰州 730000;
4. 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探讨不同产地当归挥发油与人脐静脉内皮细胞增殖作用的相关关系。**方法:**利用水蒸气蒸馏法提取当归挥发油,采用GC-MS联用分析技术建立44批不同产地当归药材挥发油指纹图谱,质谱检索库及保留指数法鉴定各色谱峰所示化学成分,用噻唑蓝染色(MTT)实验考察不同产地当归挥发油对HUVECs细胞的增值率,再通过线性回归分析方法,建立并分析当归挥发油促HUVECs细胞增殖作用的相关关系。**结果:**通过线性回归分析得色谱峰 X_1, X_2 与细胞增殖率呈负相关的关系,其余色谱峰与细胞增殖率均呈正相关的关系,且其中 X_3, X_6, X_7 号色谱峰回归系数较大,是当归挥发油促HUVECs细胞增殖的主要化学成分。**结论:**该方法能快速、有效地建立当归挥发油谱效相关关系,可为当归挥发油化学成分药理性质的研究提供参考依据。

[关键词] 当归; 挥发油; 人脐静脉内皮细胞; 谱效关系; 线性回归分析

[中图分类号] 285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060070

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1105.002.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:05

Correlation Analysis Between Volatile Oil from Angelicae Sinensis Radix and Its Effect on HUVECs Proliferation

MA Xia¹, DIND Jun-xia², GU Zhi-rong¹, SUN Yu-jing^{1,3}, WANG Ya-li^{1,3,4*}

- (1. Center of Scientific Experiment, Gansu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730000, China;
2. Korla Hospital of the Second Division, Korla 841000, China;
3. Institute of Angelica Sinensis, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China;
4. Key Laboratory of TCM Quality and Standard of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation between the GC-MS fingerprints of volatile oil from Angelicae Sinensis Radix of different regions and its effect on proliferation. **Method:** The volatile oil from Angelicae Sinensis Radix was extracted by steam distillation, and GC-MS analysis technology was used to establish the fingerprints of volatile oil from 44 batches of Angelicae Sinensis Radix of different regions. Mass spectrometry database and retention index were used to identify the chemical components indicated in various chromatographic peaks, and then Methyl thiazolyltetazolium (MTT) was used to investigate the effect of volatile oil from Angelicae Sinensis Radix of different regions on HUVECs proliferation. Finally, the fingerprint-effect relationship of volatile

[收稿日期] 20160414(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960037);甘肃省发改委战略新兴产业和产业技术研究与开发专项项目;甘肃省科技支撑计划项目(144FKCA078)

[第一作者] 马霞,在读硕士,从事中药成分分析和质量标准研究, Tel:18093189246, E-mail:1905924331@qq.com

[通讯作者] *王亚丽,博士,教授,从事中药成分分析和质量标准研究, Tel:13669313636, E-mail:cnwy11166@hotmail.com

oil and promoting HUVECs proliferation effect could be established and analyzed by linear regression analysis. **Result:** Linear regression analysis showed that, X_1 and X_2 peaks were negatively correlated with cell proliferation rate, and other peaks showed positive correlation. Among them, X_3 , X_6 and X_7 peaks had larger linear regression coefficient, showing main constituents for promoting HUVECs proliferation. **Conclusion:** This method can quickly and effectively establish the spectrum-effect relationship for volatile oil from *Angelicae Sinensis Radix*, providing experimental basis for studying their pharmacological properties.

[Key words] *Angelicae Sinensis Radix*; volatile oil; HUVECs; fingerprint-effect relationship; linear regression analysis

当归为伞形科植物当归的干燥根,是临床常用中药,有补血、活血调经、润肠止痛之功效,主产于我国甘肃、云南及湖北等地^[1]。对于当归挥发油化学成分的研究已有许多报道^[2-5],挥发油主要含有 α -蒎烯、藁本内酯和丁烯基苯酐等多种成分,其中藁本内酯含量最高,其次是丁烯基苯酐。目前当归药理活性的研究涉及较为广泛,主要有子宫平滑肌双向调节^[6-7]、心血管系统^[8]、平喘作用^[9]、免疫功能^[10]、镇痛抗炎^[11]等方面。学者们曾提出某些具有行气活血作用的中药可能具有促进血管生成的作用,从而有利于冠心病患者心脏侧枝循环的形成,减轻心肌缺血缺氧^[12]。在中医药领域中当归药材多用于补血活血,而挥发性成分具有良好的收敛作用,故而具有活血的功效,而现代研究发现^[13-14]当归药材能促进血管内皮细胞的增殖,其途径是干扰细胞内钙离子的代谢缓解血管平滑肌痉挛及上调血管内皮生长因子表达促进内皮细胞增殖,从而达到活血功效;但是对于当归挥发性成分中各色谱峰对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增殖作用的研究未见详细报道,因此本文拟建立谱效关系,阐明挥发性成分各色谱峰对 HUVECs 的相关关系。

中药色谱指纹图谱中每个特征峰代表一种化学成分,其药效亦是多种成分共同作用的结果,指纹图谱与药效之间必然存在某种相关关系。本文以水蒸气蒸馏法所得当归挥发油为研究对象,比较其药理活性,并测定其特征指纹图谱,采用线性回归进行数据处理,以探索指纹图谱各特征峰所代表的化学成分对药效作用相关性,旨在为当归谱效关系的进一步开发和利用提供参考依据。

1 材料

7890A/5987 型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司),BT1250 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),IX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Bio-TEK 型酶标仪(美国 Bio-RAD 公司),MCO-5AC 型培养箱(日本三洋电机公司),GR60DR 型全自动

高温灭菌器[致微(厦门)仪器有限公司],THZ-82 型气浴恒温振荡器(金坛市恒丰仪器厂)。

四唑盐(Biotapped,北京博奥拓科技有限公司),二甲亚砜(天津市百世化工有限公司),青霉素-链霉素双抗(美国 Hyclone 公司,批号 SV30010),0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司,批号 J140028),细胞培养基低糖 DEME(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(FBS,美国 Gbico 公司,批号 150214),人脐静脉内皮细胞(HUVECs,甘肃省陆军总院药剂科实验室保存和自行传代)。

实验所用当归样品于 2012 年 10 月底—11 月初采集于甘肃省的 12 个县级产区,经甘肃中医学院药学院晋玲教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根。样品信息见表 1。

表 1 当归样品信息

Table 1 Information of *Angelicae Sinensis Radix*

产地	样品编号	产地	样品编号
甘肃康乐县	S1 ~ S4	甘肃渭源县	S30 ~ S34
甘肃和政县	S5 ~ S6	甘肃文县	S35 ~ S40
甘肃临洮县	S7 ~ S11	甘肃漳县	S41 ~ S44
甘肃岷县	S12 ~ S29		

2 方法与结果

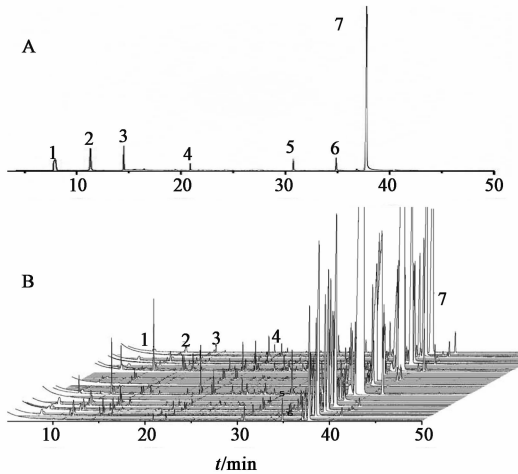
2.1 当归挥发油 GC-MS 指纹图谱

2.1.1 色谱条件 GC 条件:Agilent HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane 毛细管色谱柱(250 mm × 30 μ m,0.25 μ m);进样口温度 250 $^{\circ}$ C,辅助加热区温度 280 $^{\circ}$ C;升温程序,初始温度 50 $^{\circ}$ C,以 4 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹升至 130 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 2 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹升至 130 $^{\circ}$ C,再以 2 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹升至 200 $^{\circ}$ C,共运行时间 57 min;载气高纯氮气,流速 1 mL \cdot min⁻¹,不分流,进样量 0.2 μ L。

质谱条件:EI 源,电子轰击能量 70 eV,离子源温度 230 $^{\circ}$ C,扫描范围 m/z 30 ~ 350,容积延迟 4 min。

2.1.2 挥发油制备与测定 将不同产地当归样品

阴干,粉碎后过 50 目筛。称取当归粉末 125 g,置于 3 000 mL 圆底烧瓶中,加适量水与玻璃珠数粒,振摇混合后浸泡过夜,采用 2015 年版《中国药典》一部附录(XD)项下甲法提取^[1],加热 8 h,读取挥发油量;吸取 0.2 mL 加正己烷定容至 50 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按上述色谱条件进行 GC-MS 分析,制得不同产地当归挥发油指纹图谱和共有模式图见图 1。



A. 共有模式;B. 44 批样品

图 1 当归挥发油 GC-MS 指纹谱

Fig 1 GC-MS chromatography of volatile oil from Angelicae Sinensis Radix

经保留指数和 GC-MS 质谱库检索共同定性,推测 7 个共有峰依次是(1*R*)- α -蒎烯(X_1),反- β -罗勒烯(X_2),2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯(X_3),对乙烯基愈疮木酚(X_4),匙叶桉油烯醇(X_5),正丁烯基苯酚(X_6)及 *Z*-藁苯内酯(X_7)化合物。

2.2 药效实验

2.2.1 细胞培养 将 HUVECs 接种于含有 90% DEME 低糖培养液 + 10% FBS,青霉素 100 U·mL⁻¹,链霉素 0.1 g·L⁻¹的培养液,37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养。待细胞长满后,用适量胰蛋白酶消化传代,选用第 3~5 代细胞。

2.2.2 药物浓度筛选 将提取的当归挥发油加适量 DMSO 溶解,用培养液配制成质量浓度 2,3,4,6,8,10,12,14 μg·L⁻¹ 的样品溶液,取细胞接种于 96 孔板,给药组加入已配置不同剂量的挥发油溶液每孔 100 μL,空白组加等体积的培养液,按 2.2.1 项条件常规培养 24 h 后检测吸光度 *A*,量效曲线见图 2。

从图 2 量效曲线可以看出,当归挥发油对 HUVECs 的增殖 ≤ 4 μg·L⁻¹ 时呈正比,而 > 4 μg·L⁻¹ 时,吸光度不再增加,保持平稳小幅度的下降趋势,

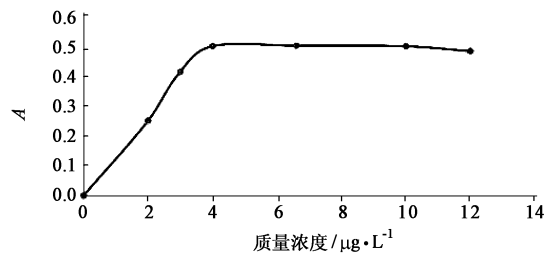


图 2 当归挥发油对 HUVECs 的量效曲线

Fig 2 Dose-effect curve on volatile oil to promote HUVECs proliferation

因此,在当归促进 HUVECs 增殖作用时所含当归挥发油最适浓度范围是 4 μg·L⁻¹。

2.2.3 MTT 法检测药效 用噻唑蓝 (Methyl thiazolyltetrazolium, MTT) 染色法检测细胞增殖率,培养细胞至数目为 1 × 10⁴ 个/mL 时,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,培养 24 h 后,加已配置的含挥发油的培养液,每孔 100 μL,每组接种 4 个复孔;继续 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养,分别于培养后 24,48 h 取出,每孔加入 MTT 溶液 (5 g·L⁻¹) 20 μL,37 °C 继续孵育 4 h,终止培养,弃去培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪上 490 nm 波长下测各孔 *A*。重复 4 次各组分别减去各自对照的调零孔后取平均值,计算细胞增殖率,见公式(1)。

$$\text{细胞增殖率} = \frac{\text{给药组} - \text{对照组}}{\text{对照组}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.4 当归挥发油对 HUVECs 的增殖率 将 44 批样本挥发油配置成 4 μg·L⁻¹ 进行 HUVECs 的增殖实验,测得 *A*,并按公式(1)计算当归挥发油对 HUVECs 的增殖率,结果见表 2。当归挥发油对 HUVECs 细胞具有很好的增殖作用。

从表 2 可以看出,当归挥发油能够较好地促进 HUVECs 细胞的增殖作用,但不同样品间的药效活性具有相对明显的差异。从样品的来源、生长环境、采收季节等各个方面进行综合分析,表明这一现象主要可能是由于不同的生长环境或采收期使样品中化学成分的积累和转化存在一定的差异,才导致不同样品中化学成分含量和组成不一致,而化学成分组成和含量的不同会直接影响其药效作用的差异。

2.3 谱效关系建立 采用 Minitab 17 Statistical 软件将得到的 7 个共有峰峰面积与细胞增殖率进行线性回归分析,7 个共有峰峰面积为自变量(X_1, \dots, X_6, X_7),细胞增殖率为因变量(*Y*),用后退法建立多元线性回归方程;得到回归方程 $Y = -1.002 \times 10^{-13} - 0.260X_1 - 0.873X_2 + 0.933X_3 + 0.065X_4 + 0.093X_5 +$

表 2 当归挥发油对 HUVECs 的增殖率

Table 2 Proliferation rate of volatile oil to promote HUVECs proliferation %

No.	增殖率	No.	增殖率	No.	增殖率
S1	40.03	S16	65.05	S31	70.04
S2	72.75	S17	58.75	S32	41.29
S3	62.46	S18	42.96	S33	37.83
S4	35.32	S19	57.28	S34	72.27
S5	66.79	S20	36.95	S35	97.98
S6	41.09	S21	95.71	S36	23.58
S7	81.29	S22	67.58	S37	23.58
S8	11.24	S23	43.62	S38	79.92
S9	11.72	S24	63.35	S39	64.45
S10	57.97	S25	83.03	S40	19.55
S11	77.46	S26	73.93	S41	26.14
S12	93.04	S27	38.02	S42	93.82
S13	84.35	S28	57.80	S43	54.23
S14	73.46	S29	53.13	S44	14.76
S15	48.50	S30	81.55		

0.389X₆ + 0.128X₇, 从方程中可以看出 X₁, X₂ 号色谱峰回归系数为负值, 说明该色谱峰与促细胞增殖作用呈负相关的关系; 而其余色谱峰回归系数均为正值, 其色谱峰与细胞增殖作用均呈正相关的关系; 研究结果表明, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇ 号色谱峰能促进 HUVECs 细胞的增殖, 其中 X₃, X₆, X₇ 号色谱峰回归系数较大, 说明该色谱峰代表成分对 HUVECs 细胞增殖作用较大。

3 讨论

回归分析是两个或多个变量之间的因果关系的统计方法。本实验在获得当归挥发油指纹图谱与药效学量化数据的基础上, 获得各色谱峰谱效线性回归系数和回归方程, 以便寻找色谱峰与药理效应之间的相关性关系。当归是临床常用的活血中药, 而当归-黄芪对体外造血干细胞似乎并无直接作用, 而是通过内皮细胞来发挥作用^[15]。

从结果可以看出, 正丁烯基苯酞, 2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯, Z-藁苯内酯, 匙叶桉油烯醇对 HUVECs 细胞增殖率的影响较大, 存在密切的正相关关系。由于不同产地当归挥发油中所含化学成分的组成和含量有所不同, 导致其促进 HUVECs 增殖的效应也存在相应的差异。本文建立的谱效关系能快速、有效地表征当归挥发油所含化学成分与药效指标之间的相关关系。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 133-134.

[2] 陈耀祖. 当归化学成分分析研究-毛细管气相色谱-质谱法鉴定当归挥发油成分[J]. 高等学校化学学报, 1984, 5(1): 124-148.

[3] 陈耀祖. 毛细管气相色谱-质谱联用分析甘肃岷县当归叶挥发油[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 1985, 21(3): 130-132.

[4] 董岩, 魏兴国, 崔庆新, 等. 当归挥发油化学成分分析[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(1): 43-45.

[5] YI L Z, DONG N P, LIU S, et al. Chemical features of Pericarpium Citri Reticulatae and Pericarpium Citri Reticulatae Viride revealed by GC-MS metabolomics analysis[J]. Food Chem, 2015, 186: 192-199.

[6] 闫升, 乔国芳, 刘志峰, 等. 当归油对大鼠离体子宫平滑肌收缩功能的影响[J]. 中草药, 2000, 31(8): 604-606.

[7] Bonnie J W, Trevor G, Janis M, et al. Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(15): 9188-9196.

[8] 肖军花, 于丽丽, 周健. 当归 A3 活性部位对心肌生理特性和动作电位的影响[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 1066-1068.

[9] 王志旺, 孙少伯, 王永辉, 等. 当归挥发油对哮喘大鼠的平喘作用及其对 IL-4, IFN-α 的影响[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(5): 391-394.

[10] 安方玉, 刘永琦, 骆亚莉, 等. 当归不同有效部位对高原低氧模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(2): 51-54.

[11] 王志旺, 魏舒畅, 冯祥瑞, 等. 不同提取工艺所得当归精油镇痛抗炎作用的对比研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 87-90.

[12] 戴瑞鸿, 李勇. 冠心病心肌缺血的治疗性血管生成与中医药[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 20(3): 163-164.

[13] 杜俊蓉, 白波, 余彦, 等. 当归挥发油研究新进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1400-1405.

[14] 杨鹏, 冯蓓, 杨苗, 等. 当归补血汤调控缺氧血管内皮细胞增殖及其分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 178-181.

[15] 吴岩, 祝彼得. 当归补血汤对内皮细胞增殖和黏附分子表达的影响[J]. 华西医科大学报, 2001, 32(4): 593-595.

[责任编辑 顾雪竹]