

· 基础研究 ·

胡杨树树脂提取物抗炎活性筛选及化学成分分析[△]龚雪^{1a}, 李柱^{2a}, 张娜¹, 王杰¹, 韩奇亨¹, 任凯¹, 张春红^{1,3,4*}, 李旻辉^{1,3,4,5,6*}

- (1. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060; 2. 额济纳旗蒙医医院, 内蒙古 阿拉善盟 735400;
3. 内蒙古自治区特色药用植物培育与保护工程技术研究中心, 内蒙古 包头 014060;
4. 内蒙古自治区特色道地药材资源保护与利用重点实验室, 内蒙古 包头 014060;
5. 内蒙古自治区中医药研究所, 内蒙古 呼和浩特 010110;
6. 广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023)

[摘要] 目的: 探讨胡杨树树脂提取物对脂多糖(LPS)刺激小鼠单核巨噬白血细胞 RAW 264.7 细胞炎症保护作用及利用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术, 对胡杨树树脂化学成分进行识别和鉴定。方法: 用不同浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的胡杨树树脂提取物处理 RAW 264.7 细胞, MTT 法检测细胞增殖活性; 通过 LPS(1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)诱导 RAW 264.7 细胞建立炎症模型, 用不同浓度胡杨树树脂提取物处理炎症模型, MTT 法检测胡杨树树脂提取物对细胞的保护作用; 采用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术, 借助数据挖掘方法识别和鉴定胡杨树树脂中的化学成分, 对其高分辨一级和二级质谱数据进行解析, 并与数据库比对, 对胡杨树树脂化学成分的结构推测和确认。结果: 在实验浓度范围内, 胡杨树树脂提取物对细胞无细胞毒性作用; 与 LPS 模型组比较, 浓度为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胡杨树树脂提取物均能显著改善 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的炎症反应, 具有较好的浓度依赖性; 通过高分辨数据推测鉴定出 6 个化合物, 分别为棕榈油酸、邻苯二甲酸二丁酯、十六酰胺、油酸酰胺、硬脂酰胺、芥酸酰胺。结论: 该结果为胡杨树树脂的提取分离及抗炎活性作用研究奠定基础, 为进一步对胡杨树树脂的综合研究提供科学的依据。

[关键词] 胡杨树树脂; RAW 264.7 细胞; 抗炎; UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱

Anti-inflammatory Activity and Chemical Composition of Resin Extracts from *Populus diversifolia* Schrenk.GONG Xue^{1a}, LI Zhu^{2a}, ZHANG Na¹, WANG Jie¹, HAN Qi-heng¹, REN Kai¹, ZHANG Chun-hong^{1,3,4*}, LI Min-hui^{1,3,4,5,6*}

- (1. Baotou Medical College, Baotou 014060, China; 2. Ejina Banner Mongolian medicine Hospital, Ejina Banner 735400, China;
3. Inner Mongolia Research Center of Characteristic Medicinal Plants Cultivation and
Protection Engineering Technology, Baotou 014060, China;
4. Inner Mongolia Key Laboratory of Characteristic Traditional Chinese Medicinal Resources
Protection and utilize, Baotou 014060, China;
5. Inner Mongolia Autonomous Region Academy of Chinese Medicine, Hohhot 010110, China;
6. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical
Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of resin extracts from *Populus diversifolia* on the inflammation of mice mononuclear macrophage RAW 264.7 cells induced by lipopolysaccharide(LPS). An ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry(UPLC-hybrid quadrupole-orbitrap MS) method was developed to analyze and identify the chemical constituents from resin of *P. diversifolia*. **Methods:** The RAW 264.7 cells were treated with different concentrations(12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of resin extracts from *P. diversifolia*, and cell viability was determined by MTT method. The inflammation model which was established by LPS(1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)-induced RAW

[△] [基金项目] 阿拉善盟 2013 年应用技术研究及开发资金项目(2013-36); 包头医学院博士科研启动基金项目(BSJJ201610)

* [通信作者] 张春红, 教授, 研究方向: 中药资源保护与质量评价; Tel: (0472)7167795, Email: zchllh@126.com
李旻辉, 教授, 研究方向: 蒙药资源保护与利用; Email: li_minhui@aliyun.com

^a 龚雪与李柱为共同第一作者

264.7 cells were used to determine the resin extracts from *P. diversifolia*. The compounds were found and identified through the serious data mining, structural speculation on basis of the careful analysis of the MS and MS / MS data, and confirmed by comparison with the references and library. **Results:** The resin extracts from *P. diversifolia* had no cytotoxicity to RAW 264.7 cells in the experimental concentration range. Compared with model group, the resin extracts from *P. diversifolia* at the concentrations of 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly improve the inflammation of RAW 264.7 cells induced by LPS, and showed a well dose-dependent manner. A total of 6 compounds, including palmitoleic acid, dibutyl phthalate, hexadecanamide, oleamide, octadecanamide and erucylamide were identified. **Conclusion:** The results provide scientific evidence for further studying its chemical composition and pharmacological activity of the *P. diversifolia* comprehensively and objectively.

[**Keywords**] resin from *Populus diversifolia* Schrenk.; RAW 264.7 cells; anti-inflammatory; UPLC-hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180702001

胡杨 *Populus diversifolia* Schrenk. 为杨柳科杨属植物,产于我国内蒙古西部、新疆、甘肃、青海。国外分布在蒙古、苏联(中亚部分和高加索)、埃及、叙利亚、印度、伊朗、阿富汗、巴基斯坦等地^[1]。树脂入药,味苦、咸,性寒。具有清热解毒,制酸止痛的功效。用于咽喉肿痛,牙痛,淋巴结结核,胃、十二指肠溃疡,胃痛,胃酸过多;外用治中耳炎,痔疮^[2]。该传统应用表明其功效可能与抗炎作用有关。故本研究以脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 构建炎症细胞模型,采用胡杨树树脂提取物处理炎症模型,对胡杨树树脂提取物进行活性筛选,探讨胡杨树树脂提取物对细胞的抗炎效果。同时,本研究利用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪联用技术,对胡杨树树脂的化学成分快速识别和鉴定^[3-5]。以期为胡杨树树脂的抗炎活性及化学成分研究奠定基础,为胡杨树树脂的临床应用及综合开发提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

胡杨树树脂采于内蒙古阿拉善盟额济纳旗,经内蒙古科技大学包头医学院李旻辉教授鉴定为杨柳科植物胡杨 *Populus diversifolia* Schrenk. 的树脂。

小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库;DMEM 高糖培养基(Gibco 公司);四季青胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS, Sigma 公司);DMSO 和青霉素、链霉素(海克隆生物化学制品(北京)有限公司);噻唑蓝(MTT, sigma 公司)。

甲酸、乙腈、异丙醇(色谱纯,天津市永大化学试剂有限公司);超纯水(沈阳欣洁科技有限公司)。

1.2 仪器

Thermo 311 CO₂ 培养箱(Thermo 公司);SW-CJ 超净台(上海新苗医疗器械制造有限公司);XDS-1B 倒置显微镜(上海比目仪器厂);Thermo Scientific Multiskan FC 酶标仪(Thermo 公司);台式离心机(Thermo 公司)。

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Thermo 公司);Thermo Scientific Accucore aQ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm , Thermo 公司);BT125D 十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);DS2510DT 超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

胡杨树树脂提取物制备:称取胡杨树树脂粉末 250 g,采用超声提取法,用正丁醇超声提取 3 次(正丁醇用量为 2000 mL、2000 mL、1500 mL),合并提取液浓缩至干。残渣加水溶解,用正丁醇萃取,将萃取液浓缩至干,即得胡杨树树脂提取物。

胡杨树树脂提取物样品:细胞实验前,将胡杨树树脂提取物用超纯水配成 200 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,再用培养基稀释至所需浓度。

胡杨树树脂供试品:称取胡杨树树脂提取物 150 mg,加异丙醇 1 mL,超声 60 min,离心后取上清,过 0.45 μm 滤膜,供液质联用分析。

2.2 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 用含 10% 胎牛血清,100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素,100 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞用于后续实验^[6]。

2.3 胡杨树树脂提取物对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

RAW 264.7 细胞按每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的胡杨树树脂提取物样品。同时设空白对照(未加胡杨树树脂提取物),每组设置 5 个平行孔,培养 24 h 后,每孔加入新配制的 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,终止培养。吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min 后,用酶标仪测量各孔的吸光度值(OD 570 nm),根据公式(1)计算细胞存活率^[7-8]。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{药物孔 OD 值} - \text{本底对照孔 OD 值}}{\text{对照细胞孔 OD 值} - \text{本底对照孔 OD 值}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 胡杨树树脂提取物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症的保护作用

取对数生长期 RAW 264.7 细胞按 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的胡杨树树脂提取物样品,保护 4 h 后加入终浓度为 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS。设空白对照组、LPS 组, LPS + 胡杨树树脂提取物组,每组设置 5 个平行孔,培养 20 h 后,每孔加入新配制的 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,终止培养。吸去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 10 min 后,用酶标仪测量各孔的吸光度值(OD 570 nm)。

2.5 色谱及质谱检测条件

色谱条件: Thermo Scientific Accucore aQ (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9 μm) 色谱柱;流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A),乙腈(B),梯度洗脱见表 1;流速为 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 5 μL 。

表 1 梯度洗脱色谱条件

t/min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~2	95~95	5~5
2~42	95~5	5~95
42~46.9	5~5	95~95
46.9~47	5~95	95~5
47~50	95~95	5~5

质谱条件:离子源为 HESI 源,正离子检测模式,鞘气压力 206.84 kPa;辅助气体流量 15.22 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$;喷雾电压 3.5 kV;离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$;辅助气温度 350 $^{\circ}\text{C}$;扫描模式 Full MS/dd-MS², full MS 分辨率 70 000; dd-MS² 分辨率 17 500,扫描范围 m/z 100~1500。MS/MS 时,碰撞能 40 eV。

• 1496 •

3 结果

3.1 胡杨树树脂提取物对 RAW 264.7 细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测胡杨树树脂提取物对小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 细胞增殖活性的影响。结果显示,与空白组比较,胡杨树树脂提取物不同浓度(12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对 RAW 264.7 细胞的增殖作用无显著性差异($P > 0.05$)。实验结果表明,在实验浓度范围内胡杨树树脂提取物对细胞增殖无影响,无细胞毒性作用(图 1)。

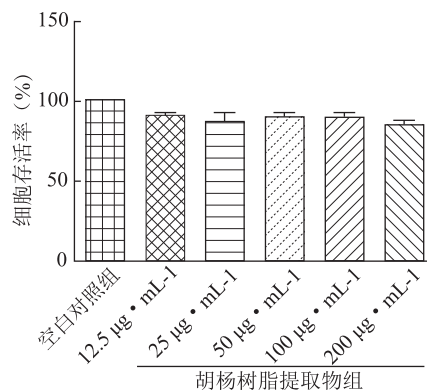
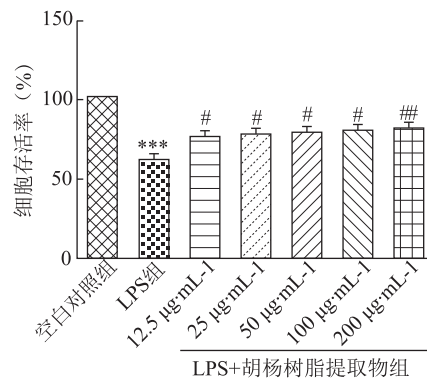


图 1 胡杨树树脂提取物对 RAW264.7 细胞增殖的影响

3.2 胡杨树树脂提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症的保护作用

与 LPS 模型组比较,浓度为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胡杨树树脂提取物能显著改善 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的炎症反应,具有较好的浓度依赖性($P < 0.05$),表明该浓度下的胡杨树树脂提取物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症具有较好的保护活性(图 2)。



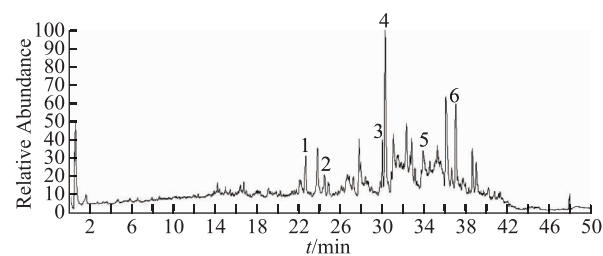
注:与空白对照组比较,***表示 $P < 0.001$;与 LPS 组比较,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$ 。

图 2 胡杨树树脂提取物对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症的保护作用

3.3 化合物质谱分析

供试品溶液按 2.1 项中质谱条件进行分析检测后, 利用 TraceFinder 软件完成数据采集与处理。将全扫描模式的高分辨质谱数据通过 MassFrontier 7.0 软件进行分析, 推导其可能的结构式。再将检测到的化合物的精确分子量试验值与理论值进行匹配, 在 Compound Discoverer 2.1 软件自带的数据库 mz-Cloud、中药成分数据库、Chemspider 及 Scifinder 等进行检索, 并结合化合物的一级、二级质谱及裂解规律进行分析和鉴定, 推测鉴定出 6 个化合物。胡杨树脂(+)ESI-MS 的质谱基峰离子流图见图 3, 已

推测鉴定的各化合物保留时间、质谱信息见表 2。



注: 1 棕榈油酸; 2 邻苯二甲酸二丁酯; 3 十六酰胺; 4 油酸酰胺; 5 硬脂酰胺; 6 芥酸酰胺。

图 3 胡杨树脂 UPLC-Q-Exactive MS 的正离子质谱基峰离子流图

表 2 胡杨树脂正离子扫描模式的 UPLC-Q-Exactive MS 分析结果

峰号	保留时间/min	准离子峰 [M + H] ⁺	分子式	二级碎片 (m/z)	化合物
1	22.68	255.23	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	327.22, 219.21, 167.14	棕榈油酸
2	24.49	279.15	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	205.08, 149.02	邻苯二甲酸二丁酯
3	30.00	256.26	C ₁₆ H ₃₃ NO	116.10, 88.07, 57.07	十六酰胺
4	30.28	282.27	C ₁₈ H ₃₅ NO	226.21, 170.15	油酸酰胺
5	33.92	284.29	C ₁₈ H ₃₇ NO	116.10, 102.09, 88.07, 74.06	硬脂酰胺
6	37.02	338.34	C ₂₂ H ₄₃ NO	282.27, 149.02	芥酸酰胺

3.4 棕榈油酸及十六酰胺结构解析

本实验主要对胡杨树脂中具有抗炎活性的化合物进行分析, 通过高分辨质谱及二级质谱的碎片离子推测化合物结构式^[3], 在此, 以化合物 1、3 举例进行结构解析。

化合物 1: 棕榈油酸。结合正离子模式下质谱的分子离子峰 m/z 255.23 $[M + H]^+$, 推断此化合物的分子式为 C₁₆H₃₀O₂, 再根据化合物分子式找出二级质谱, 发现谱图中有碎片离子 m/z 327.22、219.21、167.14, m/z 237.22 $[M + H - 18]^+$ 是母离子失去一分子水, m/z 219.21 $[M + H - 36]^+$ 是母离子失去两分子水, m/z 167.14 $[M + H - 88]^+$ 是母离子失去 C₅H₁₁O(图 4), 结合文献推测此化合物为棕榈油酸^[9-10]。

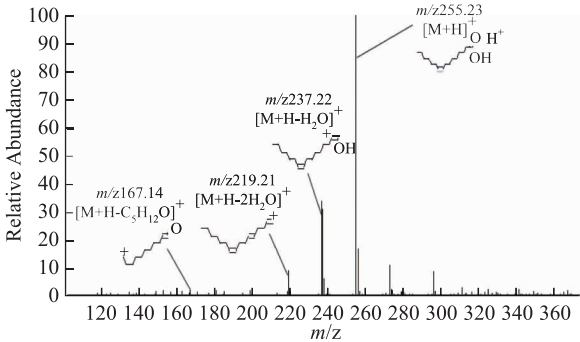


图 4 化合物 1 提取离子质谱图

化合物 3: 十六酰胺。结合正离子模式下质谱的分子离子峰 m/z 256.26 $[M + H]^+$, 推断此化合物的分子式为 C₁₆H₃₃NO, 再根据化合物分子式找出二级质谱, 发现谱图中有碎片离子 m/z 116.10、88.07、57.07, m/z 116.10 $[M + H - 140]^+$ 是母离子失去 C₁₀H₂₀, m/z 88.07 $[M + H - 168]^+$ 是母离子失去 C₁₂H₂₄, m/z 57.07 $[M + H - 199]^+$ 是母离子失去 C₁₂H₂₅NO(图 5), 结合数据库检索进行匹配, 推测此化合物为十六酰胺。

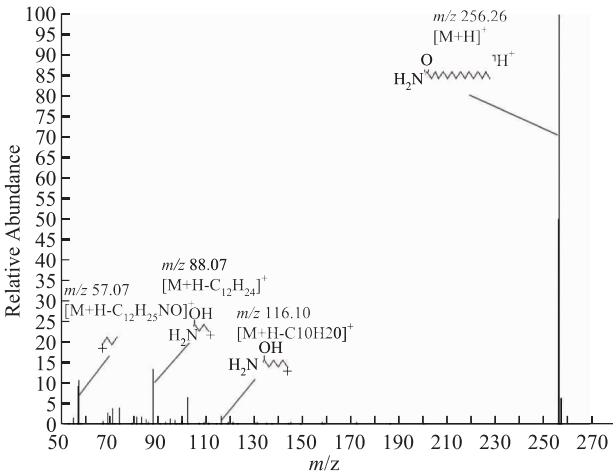


图 5 化合物 3 提取离子质谱图

4 讨论

胡杨树脂,又名胡杨泪、胡杨碱,为胡杨树干的分泌物。《本草纲目》载:“胡杨泪,胡杨树脂也,故名泪”。具有清热解毒,制酸止痛的功效。主治咽喉肿痛,牙痛,淋巴结结核,胃、十二指肠溃疡,胃痛,胃酸过多;外用治中耳炎,痔疮。但是,迄今为止其化学成分和药理活性的系统研究基本处于空白。因此,有必要对胡杨树脂进行系统研究,以充分利用胡杨的药用价值。

本研究基于胡杨树脂的传统功效,探讨其抗炎活性。利用LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW 264.7构建炎症模型,采用MTT法对胡杨树脂进行活性筛选,结果表明胡杨树脂在12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下具有显著改善LPS诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7的炎症反应的作用,且表现出较好的浓度依赖性。同时,本研究利用UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪联用技术,对胡杨树脂的化学成分快速识别和鉴定推测出6个化合物。其中的化合物1推测鉴定为棕榈油酸,棕榈油酸是一种 ω -7单不饱和脂肪酸,可以调节身体代谢,影响炎症标记物和PPAR代谢通路,对炎症有一定的治疗效果^[11-13];化合物3推测鉴定为十六酰胺,十六酰胺已被证明可与细胞核的一种受体(核受体)结合,对于多种慢性疼痛和炎症相关的生物学功能产生影响。此外,化合物4油酸酰胺及化合物6芥酸酰胺为不饱和脂肪酸酰胺类化合物,有研究通过采用DPPH-HPLC方法证明了油酸酰胺和芥酸酰胺具有抗氧化的生物活性^[14]。且有发明从圆锥铁线莲中分离得到一种酰胺类化合物金色酰胺醇酯,初步体外药理研究发现此酰胺类活性成分具有抗炎镇痛作用^[15]。故推测胡杨树脂的抗炎活性可能与以上成分有关。

本研究结果为胡杨树脂化学成分的分离提取及其药理作用奠定基础,为胡杨树脂的临床应用及综合开发提供参考资料。但对于胡杨树脂的生理活性、有效成分及相关作用机制等还需进行深入的研究与调查。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社,1961.
- [2] 魏庆莒. 胡杨[M]. 北京: 中国林业出版社,1990.
- [3] 王勇为. 确证定量分析新工具-Thermo Scientific Q Exactive 台式四极杆-轨道阱高分辨质谱仪[J]. 现代科学仪器,2011(5):138-140.
- [4] 于海川,赵杰,吴娇,等. 长春花生物碱类化合物液相色谱/四级杆-飞行时间质谱分析[J]. 中国现代中药,2015,17(8):801-804.
- [5] 黄嘉璐,刘秀斌,郑亚杰,等. 基于UHPLC-QTOF/MS的博落回花中生物碱类化学成分研究[J]. 中国现代中药,2017,19(10):1376-1381.
- [6] 周瑞,刘东,唐志书,等. 秦七风湿方水提液和醇提液对巨噬细胞功能的影响[J]. 中国现代中药,2017,19(6):779-783.
- [7] 石孟琼,覃慧林,张永峰,等. 木瓜三萜对脂多糖诱导下RAW264.7细胞炎症模型细胞因子的影响[J]. 中药药理与临床,2016,32(3):76-80.
- [8] 何子龙,方文娟,张方博,等. 疏风解毒胶囊肠吸收液对LPS诱导巨噬细胞释放细胞因子的影响[J]. 中国现代中药,2015,17(4):345-348.
- [9] 柯壮芳,韩京,朱腾高,等. 牛油果中化学成分的内部萃取电喷雾电离质谱检测[J]. 高等学校化学学报,2017,38(5):738-742.
- [10] 裴克,曹蔚,郭倩倩,等. 蛭螭脂溶性成分的气相色谱-质谱联用分析及抗炎、镇痛活性研究[J]. 中药材,2012,35(3):357-360.
- [11] 张泽生,高山,郭擎,等. 棕榈油酸的研究现状及展望[J]. 中国食品添加剂,2016(9):198-202.
- [12] 侯霄. 沙棘果油的检测分析[J]. 中国现代中药,2016,18(12):1602-1605.
- [13] 刘文琴,龚嘉华,王燕霞,等. 覆盆子活性部位化学成分分离与鉴定[J]. 中国现代中药,2014,16(5):372-373,379.
- [14] 周书娟. 褐藻羊栖菜等化学成分及其抗氧化活性的研究[D]. 温州:温州大学,2015.
- [15] Tian J K, Chen R Z, Zhang L, et al. Method for separating and purifying active component aurantiamide acetate from traditional Chinese medicine clematis terniflora: CN 102070485 B[P]. 2014.

(收稿日期 2018-07-02)