

## 野马追的化学成分及其解热作用研究

褚纯隽, 任慧玲, 吴天威, 张健\*

苏州大学药学院, 苏州 215123

**摘要:**从野马追(*Eupatorium lindleyanum* DC.)中分离得到6个化合物,通过波谱数据分析,分别鉴定为:香草酸(1)、正二十八烷酸(2)、 $\beta$ -谷甾醇(3)、胡萝卜苷(4)、蒙花苷(5)、5,8,4'-三羟基-7,3'-二甲氧基黄酮(6),其中化合物2、5和6为首次从该植物中分离得到。采用UPLC/Q-TOF-MS法,分析野马追乙醇提取物的化学成分,并考察野马追对LPS诱导的大鼠发热模型的解热作用及其机制。腹腔注射脂多糖(100  $\mu$ g/kg)法建立大鼠发热模型,记录灌胃给药后0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8 h大鼠的体温变化,绘制体温曲线;测定8 h大鼠肝组织髓过氧化物酶活性和血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白介素-6含量。研究发现模型组大鼠体温呈明显三相热变化趋势,在造模后4 h出现升温峰值(1.97  $^{\circ}$ C),8 h后体温恢复正常;野马追醇提物显著地降低了大鼠体温峰值;同时有效地抑制了肝组织中髓过氧化物酶活性,降低了血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-6含量。

**关键词:**野马追;化学成分;UPLC/Q-TOF-MS;解热作用

中图分类号:Q284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.05.012

Chemical Constituents and Antipyretic Effect of *Eupatorium lindleyanum* DC.

CHU Chun-jun, REN Hui-ling, WU Tian-wei, ZHANG Jian\*

College of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

**Abstract:** In this study, chemical composition of the ethanol extract of *Eupatorium lindleyanum* DC. was analyzed by UPLC/Q-TOF-MS. Six compounds were isolated from *E. lindleyanum*. These compounds were identified as vanillic acid (1), *n*-octacosanoic acid (2),  $\beta$ -sitosterol (3), daucosterol (4), linarin (5), 5,8,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxy flavone (6). Compound 2, 5 and 6 were obtained from this plant for the first time. In addition, the antipyretic effect and mechanism of *E. lindleyanum* on LPS-induced febrile response in rats was observed and elucidated. After the LPS challenge, the temperature of rats was recorded every 30 min, it lasted for 6 h, and then 7 h, 8 h. Myeloperoxidase (MPO) activities in liver tissues was examined, the levels of inflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in serum were measured using ELISA. As a result, the rats of model group showed obvious three-phase fever and the heating peak value (1.97  $^{\circ}$ C) appeared at 4 h. The ethanol extract of *E. lindleyanum* (EUP-EtOH) significantly decreased the body temperature of rats, and at 8 h following LPS challenge effectively inhibited MPO activity in liver tissues, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in serum.

**Key words:** *Eupatorium lindleyanum* DC.; chemical components; UPLC/Q-TOF-MS; antipyretic effect

野马追是菊科泽兰属植物尖佩兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的全草;产于江苏、甘肃、山东、湖南等地;味苦、性平,归肝、脾经,具有清热解毒、化痰止咳、利尿消肿、降压等功效,常用于治疗感冒、咳嗽多痰、扁桃体炎、菌痢、支气管炎等;现代药理学研究表明,野马追具有抑菌、抗病毒、抗氧化、肺损伤保护、降血脂等作用<sup>[1]</sup>。本课题组自2012年开始对野马

追清热解毒药效物质基础研究,野马追主要含有倍半萜内酯、二萜和黄酮类化合物,从中分离的到了25个化合物<sup>[2-4]</sup>。在此基础上,本课题继续对野马追化学成分进行研究,共分离得到6个化合物,分别鉴定为:香草酸(1)、正二十八烷酸(2)、 $\beta$ -谷甾醇(3)、胡萝卜苷(4)、蒙花苷(5)、5,8,4'-三羟基-7,3'-二甲氧基黄酮(6),其中化合物2、5和6为首次从该植物中分离得到;采用UPLC/Q-TOF-MS法,分析野马追乙醇提取物的化学成分,利用脂多糖诱导大鼠发热模型,从抗炎的角度探讨野马追的解热作用及机制。

收稿日期:2014-07-22 接受日期:2015-01-06

基金项目:国家自然科学基金(81202882);江苏省自然科学基金(BK2011296)

\* 通讯作者 E-mail: jianzhang@suda.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 药材与试剂

药材采自于江苏省盱眙县王店乡,经复旦大学生药学研究室陈道峰教授鉴定为菊科泽兰属植物尖佩兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的盛花期干燥全草。脂多糖 LPS,批号:YY11156,规格:Escherichia coli 055:B5, Sigma-Aldrich;大孔树脂 AB-8,河北沧州宝恩吸附材料科技有限公司;阿司匹林肠溶片(南京白敬宇制药有限责任公司),批号:121015;小鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-6 ELISA 试剂盒批号:M1305226,上海船夫贸易有限公司;MPO 试剂盒批号:20130702,南京建成生物工程研究所。ACQUITY UPLC/Q-TOF MS 系统 Waters 公司,美国,采用电喷雾电离(ESI),二元高压泵,在线脱气装置,自动进样器,数据采集与处理采用 MassHunter 软件;所有试剂均为色谱纯(E. Merck, Darmstadt, Germany)或分析纯(中国医药集团上海化学试剂公司),水为超纯水系统制备得到 Millipore, Bedford, MA, USA。

### 1.2 实验动物

50 只 SD 大鼠(清洁级),雄性,10 周龄,平均体重  $203.15 \pm 14.85$  g,许可证号:SCXK(苏)2011-0003。大鼠自由饮食饮水,环境温度  $26 \pm 0.5$  °C,相对湿度 40%~80%。在实验前,适应性饲养 7 d。

### 1.3 主要仪器

N-1100 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社);Varian UNITY INOVA-400 型、Bruker AV III-500 型核磁共振仪;薄层层析硅胶和柱层析硅胶(200~300 目,青岛海洋化工厂);ODS 柱色谱填料(Daiso-gel 公司);凝胶 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20(GE healthcare Bio-science AB);Agilent Infinity 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);UV-2600PC 紫外分光光度计(日本岛津制作所);ME215P-OCE 电子天平(德国赛多利斯公司);CS150FNX 超速冷冻离心机(日本株式会社日立制作所);FSH-II 型高速电动匀浆器(江苏金坛市环宇科学仪器厂);ELx800 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);BT-A21 软头型电子体温计(深圳市福达康实业有限公司东莞分公司)。

### 1.4 提取与分离

野马追干燥全草 20 kg,以 80% 乙醇提取 2 次,提取液浓缩,得浸膏 2.5 kg,将其溶解在水中,经石油醚萃取脱脂,再分别以氯仿、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取,合并浓缩各萃取层,得乙酸乙酯部分约 70

g。乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱,用氯仿-甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱,得到 4 个部分 Fr. 1~Fr. 4。Fr. 1 经反复硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:1~1:1)为洗脱剂,梯度洗脱,并经过重结晶得到化合物 3(18.43 mg);Fr. 2 经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇(40:1~1:1)为洗脱剂,梯度洗脱,再通过重结晶得到化合物 1(15.41 mg)和 2(17.44 mg)。Fr. 3 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(40:1~1:1)为洗脱剂,梯度洗脱,经重结晶得到化合物 4(26.78 mg);Fr. 4 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(10:1~0:100)梯度洗脱,得到 2 个流分,Fr. 4-2 部分经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以甲醇水洗脱得到化合物 5(15.34 mg)和 6(21.32 mg)。

### 1.5 UPLC-Q-TOF/MS 分析

#### 1.5.1 样品和对照品制备

对照品纯度大于 98%,自制;eupalinolide H 37.4  $\mu\text{g/mL}$ ;eupalinolide F,40.4  $\mu\text{g/mL}$ ;eupalinolide K,38.4  $\mu\text{g/mL}$ ;eupalinolide I,39.0  $\mu\text{g/mL}$ ;eupalinolide G,38.4  $\mu\text{g/mL}$ ;野马追的 80% 乙醇提取物(EUP-EtOH),1 mg/mL。

#### 1.5.2 UPLC-Q-TOF/MS 方法与条件

色谱条件:Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH,UPLC C<sub>18</sub>分析柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )和 Waters Van Guard<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub>预柱(2.1 mm  $\times$  5 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)和 0.1% 甲酸乙腈(B);梯度洗脱,0~8 min,5%~25% B;8~18 min,25%~75% B;18~25 min,75%~100% B;体积流量 0.4 mL/min;柱温 20 °C;进样体积 1.0  $\mu\text{L}$ 。

质谱条件:Agilent 6540 accurate mass Q-TOF LC/MS(Agilent Technologies, USA)系统,配有电喷雾离子源(正离子模式)和 MassHunter 数据分析系统,雾化气温度为 300 °C,雾化气体积流量 8.0 L/min,脱溶剂气(N<sub>2</sub>)体积流量 8.0 L/min,毛细管电压为 3500 V(正离子模式),喷嘴电压为 500 V,扫描范围  $m/z$  100~1700。

### 1.6 解热实验

#### 1.6.1 脂多糖诱导大鼠发热模型

每天从 9:00 始,间隔 30 min 测量一次大鼠肛温,持续测量 10 h,连续三天,以 3 d 同时间点的体温平均值作为基础体温,筛选出体温介于 36.6~38.3 °C 之间且三次温差不超过 0.5 °C 的大鼠;给药前 12 h 禁食不禁水,以减少测温时粪便干扰的情况。每次测温时电子体温计探头涂上凡士林,插入

大鼠直肠 2 cm (在 2 cm 用胶布标记固定, 确保每次插入深度一致), 待读数稳定后记录。

1000 g 药材经 80% 乙醇回流提取 2 次, 合并, 减压浓缩干燥得野马追提取物 127 g (EUP-EtOH), 含有化合物 eupalinolide F 0.98%, eupalinolide K 10.62%, eupalinolide H 0.59%, eupalinolide G 7.67%, eupalinolide I 2.16%。将野马追的 80% 乙醇提取物溶于水中, 制得相应浓度的悬浊药液。将筛选后得的 50 只体温稳定的大鼠随机分为空白组、模型组 (LPS, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、野马追提取物组 (生药剂量: 305 mg/kg) 和阳性组 (阿司匹林, 200 mg/kg), 各组间体重经方差分析无显著差异。腹腔注射 LPS (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 的 0.9% 生理盐水溶液) 或 0.9% 生理盐水溶液 (与 LPS 同体积), 随后按剂量灌胃给药, 30 min 后测量第一次肛温, 在 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、7、8 h 分别测肛温一次。设定基础体温 (每个时间点) 值为 0, 给完药的时间点为 0, 绘制各组各时间点平均体温变化曲线, 观察最大升温幅度  $\Delta T$  (发热时体温和基础体温的差值) 的变化。8 h 后, 摘除眼球取血, 放血处死大鼠后, 摘取肝脏。

### 1.6.2 髓过氧化物酶 (MPO) 活性的测定

造模后 8 h, 放血法处死大鼠, 剖开腹腔摘取肝脏组织, 称取 50 mg 肝脏组织, 加入试剂二 950 mL 制成 5% 组织匀浆, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 1500  $\times$  g, 离心 10 min, 吸取上清液 0.9 mL 加入三号试剂 0.1 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min。其余操作按说明书严格进行, 测定 460 nm 下吸光度 (A)。MPO (U/g) = (测定管 A - 对照管 A)  $\div$  11.3  $\times$  取样量 (g)。

### 1.6.3 炎症因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的测定

造模后 8 h, 摘除大鼠眼球取血, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 1500  $\times$  g, 离心 20 min, 取血清, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平, 酶标仪上读取 OD<sub>450</sub>。

### 1.6.4 数据处理

所有数据用平均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  S. D.) 表示, 应用 SPSS 19 软件对数据进行单因素方差分析, 组间比较采用 Fisher's PLSD 法, 当  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 实验结果

### 2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色针晶 (甲醇), mp. 211 ~ 213

$^{\circ}\text{C}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 7.44 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6), 7.43 (1H, s, H-2), 6.85 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 3.80 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$ : 115.0 (C-2), 147.3 (C-3), 151.1 (C-4), 112.7 (C-5), 123.6 (C-6), 167.4 (-COOH), 55.6 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[5]</sup> 报到数据一致, 故化合物 1 为香草酸 (vanillic acid)。

化合物 2 白色粉末 (甲醇);  $^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 2.35 (2H, t,  $J = 7.1$  Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 1.63 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 1.25 (48H, brs, -(CH<sub>2</sub>)<sub>24</sub>-), 0.89 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, -CH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[6]</sup> 报到数据一致, 故化合物 2 为正二十八烷酸 (*n*-octacosanoic acid)。

化合物 3 白色针晶 (甲醇), mp. 137 ~ 138  $^{\circ}\text{C}$ , 易溶于氯仿等溶剂; 经与对照品  $\beta$ -谷甾醇共薄层层析, 3 种展开剂系统下 TLC 中  $R_f$  值及显色行为完全一致。确定化合物 3 为  $\beta$ -谷甾醇 ( $\beta$ -sitosterol)。

化合物 4 白色粉末 (甲醇), 难溶于一般有机溶剂, 能溶于氯仿-甲醇混合溶液, Liebermann-Burchard 反应阳性, Molish 反应阳性; 经与胡萝卜苷对照品比较, TLC 中  $R_f$  值及显色行为完全一致。确定化合物 4 为胡萝卜苷 (daucosterol)。

化合物 5 淡黄色粉末 (甲醇), 盐酸-镁粉反应呈阳性, Molish 反应呈阳性, 提示该化合物可能为黄酮苷类化合物;  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 12.92 (1H, s, 5-OH) 8.05 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 7.15 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.79 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz, H-8), 6.45 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6), 5.07 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.55 (1H, brs, H-1'''), 3.86 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 1.08 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-6''');  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$ : 163.9 (C-2), 103.8 (C-3), 182.0 (C-4), 161.1 (C-5), 99.6 (C-6), 162.9 (C-7), 94.8 (C-8), 157.0 (C-9), 105.5 (C-10), 122.7 (C-1'), 128.5 (C-2'), 114.7 (C-3'), 162.4 (C-4'), 114.7 (C-5'), 128.5 (C-6'), 99.9 (C-1''), 73.1 (C-2''), 76.2 (C-3''), 69.6 (C-4''), 75.6 (C-5''), 66.1 (C-6''), 100.5 (C-1'''), 70.3 (C-2'''), 70.7 (C-3'''), 72.1 (C-4'''), 68.3 (C-5'''), 17.8 (C-6'''), 55.6 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[7]</sup> 报到数据一致, 故化合物 5 为蒙花苷 (linarin)。

化合物 6 淡黄色粉末 (甲醇), 1% 三氯化铁溶液显色呈黄色, 10% 硫酸乙醇溶液显色呈黄色;  $^1\text{H}$

NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta$ : 13.08 (1H, s, 5-OH), 10.69 (1H, s, -OH), 9.96 (1H, s, -OH), 7.55 (2H, m, H-2', 6'), 6.90 (2H, m, H-3', 5'), 6.62 (1H, s, H-6), 3.75 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta$ : 164.0 (C-2), 103.0 (C-3), 182.4 (C-4), 157.5 (C-5), 94.6 (C-6), 152.7 (C-7), 131.6 (C-8), 153.0 (C-9), 104.3 (C-10), 121.8 (C-1'), 110.4 (C-2'), 151.0 (C-3'), 148.3 (C-4'), 116.0 (C-5'), 120.6 (C-6'). 以上数据与文献<sup>[8]</sup>报到数据一致,故化合物 6

为 5,8,4'-三羟基-7,3'-二甲氧基黄酮 (5,8,4'-trihydroxy-7,3'-dimethoxy flavone)。

## 2.2 野马追醇提取物 UPLC-Q-TOF/MS 分析

分析野马追醇提取物 (EUP-EtOH) 的正离子模式下色谱图 (图 1), 依据分子离子峰及碎片离子, 与对照品的保留时间和分子离子峰相比较, 参考相关文献<sup>[14]</sup>, 鉴定了 23 个化合物 (表 1), 峰 1、6、7、8、10、11、13、15、16、17、18、19 和 22 为萜类化合物, 峰 23 为黄酮类化合物。

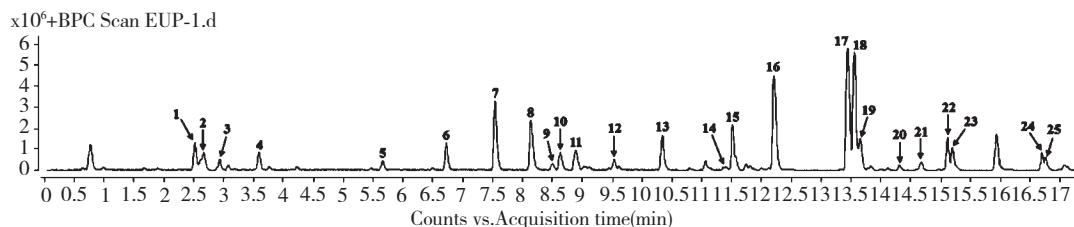


图 1 野马追乙醇提取物的 LC-MS 总离子流图

Fig. 1 LC-MS total ion chromatogram of EUP-EtOH

注:图中标出峰的序号请参见表 1

Note: the peak numbers referred to Table 1

表 1 野马追乙醇提取物的 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 1 Characteristics of chemical components of EUP-EtOH identified by UPLC-Q-TOF-MS

No.	保留时间 Retention time (min)	分子离子峰 Mass Ions ( $m/z$ )	分子式 Molecular Formula	化合物 Compound
1	2.567	300.1812 [M + 2Na] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	6,15 $\alpha$ -epoxy-1 $\beta$ ,4 $\beta$ -dihydroxyeudesmane
2	2.670	300.1812 [M + 2Na] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	6,15 $\alpha$ -epoxy-1 $\beta$ ,4 $\beta$ -dihydroxyeudesmane
3	2.899	316.1759 [M] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	7 $\alpha$ -angeloyloxy-1-oxo- $\alpha$ -longipinen
4	3.566	286.2016 [M + 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	7-oxo-12-hydroxy-6,11-dehydroageraphorone
5	5.655	453.3438 [M + H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	eupalinilide J
6	6.741	566.4277 [M + 2Na + 2H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>10</sub>	4'-desoxy-4"-hydroxyprovincialin
7	7.559	340.2595 [M - 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	8 $\beta$ -(4'-hydroxy-tigloyloxy)-3 $\beta$ ,14-dihydroxy-6 $\beta$ H, 7 $\alpha$ H-germacra-1(10)Z,4Z,11(13)-trien-6,12-olide
8	8.150	396.8026 [M] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>6</sub>	eupalinilide E
9	8.492	218.2116 [M - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	9 $\beta$ -hydroxy-ageraphorone
10	8.634	453.3448 [M + H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub>	eupalinilide J
11	8.892	438.2116 [M + H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	eupalinilide F
12	9.535	436.1959 [M + H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	3 $\beta$ -acetoxo-8 $\beta$ -(4'-oxo-tigloyloxy)-14-hydroxyl-costunolide
13	10.344	438.2118 [M + H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	eupalinilide H
14	11.420	421.2545 [M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>	3-(hydroxymethyl)-1,14,15-trihydroxy-7,11,15- trimethyl-2,6,10-hexadecatrien-13-acetate
15	11.588	463.1961 [M + H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	eupalinilide G
16	12.220	463.1965 [M + H] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	eupalinilide I
17	13.447	274.2770 [M] <sup>+</sup>	-	unknown
18	13.563	318.3031 [M + HCOONa] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	6 $\beta$ -hydroxy-7-oxo-ageraphorone

19	13. 647	362. 3272 [ M ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	eupalinolide K
20	14. 306	445. 2126 [ M + H ] <sup>+</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	8 $\beta$ -[4'-hydroxy-5'-tigloyloxytigloyloxy] costunolide
21	14. 664	460. 2696 [ M ] <sup>+</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	3 $\beta$ -acetoxy-8 $\beta$ -(4'-hydroxy-tigloyloxy)-14-hydroxy-costunolide
22	15. 115	302. 3063 [ M ] <sup>+</sup>	-	unknown
23	15. 198	346. 3320 [ M ] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	8 $\beta$ -tigloyloxy-3 $\beta$ ,14-dihydroxy-6 $\beta$ H,7 $\alpha$ H-germacra-1(10)Z,4E,11(13)-trien-6,12-olide
24	16. 691	330. 3342 [ M-H <sub>2</sub> O ] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	hiyodorilactone C acetate
25	16. 758	418. 3892 [ M ] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	3 $\beta$ -acetoxy-8 $\beta$ -(4'-oxo-tigloyloxy)-14-hydroxy-heliangolide

## 2.3 野马追醇提物解热作用及机制

### 2.3.1 解热作用

模型组大鼠腹腔注射 LPS 后,体温升高变化呈三相热曲线,分别在 1.5、4 和 6 h 出现峰值,最大升温幅度为 1.97 °C。野马追醇提物对大鼠的体温升高有明显的抑制作用,见图 2。

### 2.3.2 大鼠的肝组织 MPO 活性以及血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平

造模后 8 h,相对于空白组,模型组肝组织 MPO 活性以及血清中炎症因子水平明显升高 ( $P < 0.01$ ),野马追醇提物组的 MPO 活性以及血清中炎

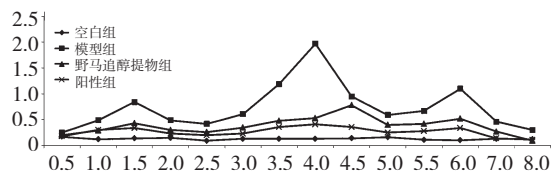


图 2 各组大鼠体温差  $\Delta T$  随时间的变化趋势比较 ( $n = 10$ )

Fig. 2 The trends of temperature difference to time ( $\Delta T-t$ ) of rats in each group ( $n = 10$ )

症因子水平都有不同程度的降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠的肝组织 MPO 活性以及血清炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of EUP-EtOH on MPO, TNF- $\alpha$  and IL-6 of febrile rat induced by LPS ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	$n$	MPO (U/g)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (ng/mL)
空白组 Control	-	8	0.70 $\pm$ 0.05	5.65 $\pm$ 1.40	0.13 $\pm$ 0.021
模型组 Model	-	9	1.70 $\pm$ 0.27 <sup>##</sup>	53.80 $\pm$ 10.30 <sup>##</sup>	0.50 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup>
EUP-EtOH	305	10	0.98 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup>	22.50 $\pm$ 2.96 <sup>**</sup>	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>
阳性组 Aspirin	200	9	0.67 $\pm$ 0.11 <sup>***</sup>	5.35 $\pm$ 1.73 <sup>***</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>***</sup>

注:与空白组比较,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with model group,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$ .

## 3 讨论

在本课题组前期研究基础上,继续野马追的化学成分研究,分离得到 6 个化合物,采用 UPLC/Q-TOF-MS 法,分析野马追乙醇提取物的化学成分,野马追主要含有萜类和黄酮类化合物。采用脂多糖诱导发热模型,其发热通常表现为双相热或三相热,并伴有寒颤和轻微腹泻症状,这与临床感染性炎症所致发热相似,是经典的炎性发热模型,且具有自限性和耐受性<sup>[9]</sup>。已有文献<sup>[10]</sup>及本课题预实验发现基础体温的选择对实验数据有较大的影响,故而首先建立更为全面的大鼠基础体温计算方法,以减少误差。模型组的大鼠在 100  $\mu$ g/kg LPS 腹腔注射后,体温变化呈三相热,峰值分别出现在 1.5、4 和 6 h,

其中 4 h 的体温上升最显著,最大幅度达 1.97 °C,同时多数大鼠出现精神萎靡和寒颤症状,少数出现严重腹泻症状,而,野马追醇提物组显著控制了体温的升高,大鼠无明显的异常情况。

肝脏是与发热反应密切相关的外周器官,LPS 经腹腔注射后,通过门静脉到达肝脏,引起肝脏组织中粒细胞浸润,进而诱发肝脏炎症反应。部分炎症介质如 PGE<sub>2</sub> 可与肝脏迷走神经上 PGE 受体 EP3 结合并向中枢传递发热信号,这可能是触发第一相发热的始动因素之一<sup>[11,12]</sup>。MPO 在 LPS 刺激的炎症反应中由活化的中性粒细胞、单核细胞和组织巨噬细胞分泌<sup>[13]</sup>,其水平可直观反映炎症浸润程度,以判断药物对中性粒细胞浸润的影响。实验中,模型组的大鼠肝脏组织 MPO 活性显著升高,野马追醇

提物组的大鼠肝脏 MPO 活性得到有效的抑制。由此推测,野马追可能通过抑制外周肝组织炎症反应而产生解热作用。

脂多糖作为内毒素在动物体内能引起强烈的炎症反应<sup>[14]</sup>,是导致发热的外源性致热源,其引起发热的机制主要是通过诱导白细胞浸润和激活炎性细胞释放 IL-1, IL-6 和 TNF- $\alpha$  等<sup>[15,16]</sup> 内源性致热源 (endogenous pyrogen, EP),进而直接或间接作用于体温调节中枢,导致下丘脑发热介质的释放,使体温调定点上移,产热增加、散热减少而发挥致热作用<sup>[11]</sup>。实验中,野马追醇提物组的大鼠血清中的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平较模型组显著降低,说明野马追可能通过抑制炎症因子的释放起到解热作用。

综上所述,野马追对脂多糖诱导的大鼠发热模型有良好的解热作用,并显著降低肝脏组织 MPO 活性以及血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平,此可能与抑制外周肝组织炎症反应和抑制血液中炎症因子的释放有关。

#### 参考文献

- 1 Wu SQ (吴双庆), Xia L (夏龙), Yao S (姚士), *et al.* Advances on chemical constituents and pharmacological effects of *Eupatorium lindleyanum*. *China Pharm* (中国药房), 2013, 24: 1426-1428.
- 2 Wu SQ, Xu NY, Sun Q, *et al.* Six new sesquiterpenes from *Eupatorium lindleyanum*. *Helv Chim Acta*, 2012, 95: 1637-1644.
- 3 Wu SQ, Xu NY, Zhang J, *et al.* Three new acyclic diterpenoids from *Eupatorium lindleyanum* DC. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14: 652-656.
- 4 Wu SQ (吴双庆), Sun Q (孙群), Chu CJ (褚纯隽), *et al.* chemical constituents of *Eupatorium lindleyanum*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 937-940.
- 5 Chen Q (陈泉), Wu LJ (吴立军), Ruan LJ (阮丽军), *et al.* Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn. (II). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2002, 19: 257-259.
- 6 Liu R (刘睿), Gu QQ (顾谦群), Cui CB (崔承彬), *et al.* Chemical constituents of *Schefflera venulosa* and their antitumor activities. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36: 328-332.
- 7 Jiang XL (蒋秀蕾), Fan CL (范春林), Ye WC (叶文才). Chemical constituents of *Cirsium japonicum*. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37: 510-512.
- 8 Su YF (苏艳芳), Chen L (陈磊), Luo Y (罗洋), *et al.* Chemical constituents and their antiulcerogenic studies on whole herb of *Conyza blinii* (I). *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 38: 332-334.
- 9 Hatzelmann T, Harden LM, Roth J, *et al.* Antipyretic effect of central [Pyr] apelin13 on LPS-induced fever in the rat. *Regul Pept*, 2013, 184C: 6-13.
- 10 Shu YC (束雅春), Qin KM (秦昆明), Chen YJ (陈亚军), *et al.* Study on the different decocting methods on Yin-qiao San decoction of anti-inflammatory and antipyretic effects. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2013, 28: 1413-1418.
- 11 Li ZH, Vit P, Carlos F, *et al.* Kupffer cell-generated PGE<sub>2</sub> triggers the febrile response of guinea pigs to intravenously injected LPS. *Am J Physiol-Regul Integr Compar Physiol*, 2006, 290: 1262-1270.
- 12 Lazarus M. The differential role of prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in regulation of fever. *Mole Nutri Food Res*, 2006, 50: 451-455.
- 13 Li XZ (李欣志), Zhong ZZ (仲兆忠), Xu QP (徐秋萍), *et al.* Inhibitory effect of triacetylshikimic acid on plasma contents of vasoactive substances and brain myeloperoxidase activity during focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Chin J Pharm Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2006, 20: 13-18.
- 14 Steiner AA, Ivanov AI, Serrats J, *et al.* Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol*, 2006, 4: e284.
- 15 Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem*, 2005, 51: 280-287.
- 16 Nilsberth C, Elander L, Hamzic N, *et al.* The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced fever by mechanisms independent of prostaglandin E2. *Endocrinology*, 2009, 150: 1850-1860.