

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2210530144

芍药花提取物通过 MAPK 信号通路调节皮肤炎症及
修复的作用机制研究

Mechanism of action of *Paeonia lactiflora* Pall. flower
extract in regulating skin inflammation and repair
through MAPK signaling pathway

学 生 姓 名: _____ 陈远 _____

校 内 教 师: _____ 翟科峰 教授 _____

校 外 导 师: _____ 唐英武 副研究员 _____

专 业 类 别: _____ 生物与医药 _____

研 究 方 向: _____ 生物制药工程 _____

论文答辩日期: 2024 年 5 月 30 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学术论文作者签名：陈远

日期：2024年6月3日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在_____年解密后使用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒

学位论文作者签名：陈远

日期：2024年6月3日

指导教师签名：翟永峰

日期：2024年6月3日

芍药花提取物通过 MAPK 信号通路调节皮肤炎症及修复的作用机制研究

摘要

芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 是一种多年生的草本植物, 在我国用药历史悠久, 归肝经, 味苦。芍药花作为芍药生长发育过程中重要器官, 其中含有丰富的物质成分。然而芍药花资源却未被合理利用, 造成资源的浪费。皮肤病是人类非致命疾病的第四大常见疾病, 影响约全世界 1/3 的人口。皮肤病类型众多, 但皮肤病的发生和发展都伴随着炎症的发生。因此, 通过干预炎症对皮肤病的发生和发展具有重要意义。本研究主要通过研究芍药花的物质基础, 探究芍药花提取物对皮肤炎症的干预作用, 主要研究内容如下:

(1) 通过 UPLC-HRMS 技术定性分析芍药花提取液中的化学成分, 并结合 HPLC 对芍药花中主要成分进行定量, 分析出芍药花中的 36 个化学成分, 分别为其中氨基酸类 2 个 (酪氨酸、谷氨酸); 黄酮类 7 个 (儿茶素、槲皮素-3,7-二-O-葡萄糖苷、山奈酚-3,7-O-二葡萄糖、异鼠李素-3, 7-二-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、山奈酚-3-O- β -D-葡萄糖苷、山奈酚); 有机酸类 8 个 (对香豆酸、莽草酸、没食子酸甲酯、柠檬酸、 α -亚麻酸、没食子酸乙酯、菊苣酸、苯甲酸); 鞣质类 8 个 (奎宁酸、没食子苷、没食子苷、3-没食子酰基奎宁酸、没食子酰蔗糖、没食子酸、阿魏醛、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖、1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖); 萜类 6 个 (氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、牡丹皮苷 E、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷); 糖苷类 3 个 (芍药苷元酮、Dillenetin-5-glucoside-7-glucuronide、芍药苷元 B); 酯类 1 个 (对羟基苯甲酸异

丙酯)；醛类 1 个 (5-羟甲基糠醛)。定量分析了芍药花中 7 个物质成分，分别为没食子酸，氧化芍药苷，芍药内酯苷，芍药苷，芦丁，1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖。含量分别为 498.62 $\mu\text{g/mL}$ 、11.82 $\mu\text{g/mL}$ 、214.72 $\mu\text{g/mL}$ 、143.04 $\mu\text{g/mL}$ 、16.60 $\mu\text{g/mL}$ 、1566.94 $\mu\text{g/mL}$ 、59.87 $\mu\text{g/mL}$ 。为芍药花资源利用提供物质基础。

(2) 结合 UPCL-HRMS 和 HPLC 分析结果，利用网络药理学对芍药花治疗皮肤炎症的潜在作用机制进行研究，预测得到其潜在治疗皮肤炎症靶点 326 个。KEGG 富集相关的主要信号通路包括 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、癌症途径以及 cAMP 信号通路等。表明芍药花可以通过抑制皮肤炎症达到治疗皮肤损伤的作用。

(3) 以芍药花提取物为主要原料，探究芍药花对皮肤炎症的干预作用。建立由 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞体外炎症模型，探究芍药花提取物对炎症的干预作用。通过 DNFB 诱导大鼠皮肤炎症模型，并进行皮肤涂抹芍药花提取物进行干预。结果显示，芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞抑制的 $\text{IC}_{50}=14.7 \mu\text{g/mL}$ ，在 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 以下时，对细胞的毒性作用不明显。通过检测芍药花对体外细胞模型的炎症因子释放的影响，显示芍药花可以通过抑制细胞中炎症因子的释放、抑制细胞 ROS 的含量从而抑制细胞凋亡的发生，并抑制细胞中炎症细胞通路的激活。显示芍药花在体外显示出较好的抗炎作用。在体内研究芍药花对皮肤炎症的干预效果，显示芍药花提取物可以抑制皮肤肿胀，促进表皮结构完整，抑制肥大细胞活化，抑制炎症信号通路激活，治疗皮肤炎症的作用。

综上所述，本研究以芍药花为主要研究对象，探究芍药花对皮肤炎症的干预作用，从而为芍药花资源开发相关产品提供理论基础。

关键词：芍药花提取物，网络药理，皮肤炎症，MAPK 信号通路

MECHANISM OF ACTION OF *PAEONIA LACTIFLORA* PALL. FLOWER EXTRACT IN REGULATING SKIN INFLAMMATION AND REPAIR THROUGH MAPK SIGNALING PATHWAY

ABSTRACT

Paeonia lactiflora Pall. is a perennial herb with a long history of medicinal use in China, which meridian tropism in liver and has a bitter flavor. The flower is an important organ in the growth and development of *Paeonia lactiflora* Pall., which contains rich material components. However, the resources of *Paeonia lactiflora* Pall. flowers have not been rationally utilized, resulting in a waste of resources. Skin diseases are the fourth most common non-fatal human diseases, affecting about 1/3 of the world's population. There are numerous types of skin diseases, but the onset and progression of skin diseases are accompanied by inflammation. Therefore, it is important for the occurrence and development of skin diseases by interfering with inflammation. In this study, we mainly investigated the interventional effects of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on skin inflammation by studying the material basis of *Paeonia lactiflora* Pall. flower, and the main research contents are as follows:

(1) The chemical constituents in the *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract were qualitatively analyzed using UPLC-HRMS, and the major components were quantitatively determined using HPLC. A total of 36 chemical components were identified in the *Paeonia lactiflora* Pall. flowers, including 2 amino acids (L-Tyrosine and L-Glutamic acid); 7 flavonoids (Catechin, Quercetin-3,7-O-di-Glucoside, Kaempferol-3,7-O-

di-Glucoside, Isothamnetin-3,7-di-O-Glucoside, Kaempferol-3-O-Glucoside-7-O-rhamnoside, Kaempferol-3-O- β -D-Glucoside, and Kaempferol); 8 organic acids (p-Coumaric acid, Shikimic acid, Methyl gallate, Citric acid, α -Linolenic acid, Ethylgallate, Cichoric acid, and Benzoic acid); 8 tannins (Quinic acid, Glucogallin, Theogallin, Galloylsucrose, Gallic acid, Ferulaldehyde, 1,2,3,4,6-O-PentagalloylGlucose, 1,6-bis-O-galloyl- β -D-Glucose; 6 terpenoids (Oxypaeoniflorin, Albiflorin, Paeoniflorin, Mudanpioside E, Galloylpaeoniflorin, and Benzoylpaeoniflorin); 3 glycosides (Paeonilactone, Dillenetin-5-glucoside-7-glucuronide, and Paeonilactone B); 1 ester (Isopropyl 4-Hydroxybenzoate); 1 aldehyde (5-Hydroxymethylfurfural). The concentrations of 7 substance components in the *Paeonia lactiflora* Pall. flowers were quantitatively analyzed, including gallic acid, oxypaeoniflorin, paeoniflorin, peonin, rutin, 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose, which were 498.62 $\mu\text{g/mL}$, 11.82 $\mu\text{g/mL}$, 214.72 $\mu\text{g/mL}$, 143.04 $\mu\text{g/mL}$, 16.60 $\mu\text{g/mL}$, 1566.94 $\mu\text{g/mL}$, and 5.87 $\mu\text{g/mL}$, respectively, providing a material basis for the utilization of *Paeonia lactiflora* Pall. flower resources.

(2) By combining UPLC-HRMS and HPLC analysis results, and using network pharmacology, the potential mechanism of *Paeonia lactiflora* Pall. flower in treating skin inflammation was studied, predicting 326 potential targets for treating skin inflammation. KEGG enrichment analysis of the related signaling pathways included MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, cancer pathway, and cAMP signaling pathway, etc. It indicates that *Paeonia lactiflora* Pall. flowers can inhibit skin inflammation and treat skin injury.

(3) Using *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract as the main raw material, the intervention effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower on skin inflammation was investigated. An *in vitro* inflammatory model of RAW

264.7 cells induced by LPS was established to explore the intervention effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on inflammation. Through the induction of a rat skin inflammation model by DNFB and the intervention of skin application with *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract, the results showed that the IC_{50} of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract against RAW 264.7 cells was 14.7 $\mu\text{g/mL}$, and the toxic effect on cells was not significant at concentrations below 2.0 $\mu\text{g/mL}$. By detecting the effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on the release of inflammatory factors *in vitro* cell models, it was found that *Paeonia lactiflora* Pall. flowers can inhibit the release of inflammatory factors in cells, inhibit the content of ROS in cells, thereby inhibiting apoptosis and the activation of inflammatory cell pathways. This demonstrates that *Paeonia lactiflora* Pall. flowers exhibit a good anti-inflammatory effect *in vitro*. *In vivo* studies of the intervention effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on skin inflammation showed that *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract can inhibit skin swelling, promote epithelial structure integrity, inhibit mast cell activation, and inhibit the activation of inflammatory signaling pathways, indicating its therapeutic effect on skin inflammation.

In summary, the present study took *Paeonia lactiflora* Pall. flowers as the main research object to investigate the interventional effects of *Paeonia lactiflora* Pall. flowers on skin inflammation, so as to provide a theoretical basis for the development of related products from *Paeonia lactiflora* Pall. flowers resources.

KEYWORDS : *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract, Network Pharmacology, Skin Inflammation, MAPK signalling pathway

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
目 录.....	I
第 1 章 绪论.....	1
1.1 皮肤疾病研究进展	1
1.1.1 皮肤的结构.....	1
1.1.2 皮肤病的分类.....	1
1.1.3 皮肤病的治疗概述.....	2
1.1.4 中草药皮肤病治疗中的研究进展.....	3
1.2 芍药花概况	4
1.3 课题设计及研究内容	5
1.3.1 课题设计思路.....	5
1.3.2 课题研究内容.....	6
第 2 章 高效液相色谱-质谱联用法检测芍药花中物质成分	7
2.1 引言	7
2.2 实验材料和仪器	8
2.2.1 实验材料.....	8
2.2.2 实验主要仪器.....	8
2.3 实验方法	9
2.3.1 供试品溶液制备.....	9
2.3.2 液质联用色谱条件.....	9
2.3.3 液相色谱条件.....	10
2.4 实验结果	12
2.4.1 芍药花中化学成分的鉴定.....	12
2.4.2 HPLC 方法学评价.....	25
2.4.3 样品含量测定.....	27
2.5 本章小结	27
第 3 章 基于网络药理学分析芍药花提取物对皮肤 炎症的治疗机制.....	29
3.1 引言	29
3.2 实验材料	30
3.2.1 数据库.....	30
3.2.2 主要软件.....	30
3.3 实验方法	30

3.3.1 生物信息学分析	30
3.4 实验结果	31
3.4.1 网络药理学预测芍药花提取物干预皮肤损伤作用机制	31
3.4.2 成分-靶点-通路	34
3.5 本章小结	35
第 4 章 LPS 诱导的 RAW 246.7 细胞模型验证芍药花提取物对抑制炎症的作用机制	37
4.1 引言	37
4.2 实验材料和仪器	38
4.2.1 实验材料	38
4.2.2 实验主要仪器	38
4.3 实验方法	39
4.3.1 芍药花提取物的制备	39
4.3.2 细胞培养	39
4.3.3 芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞毒性的影响	40
4.3.4 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放量的影响	40
4.3.5 ELISA 检测细胞上清中 IL-2 和 TNF- α 的表达	40
4.3.6 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 中 ROS 影响	41
4.3.7 Hoechst 33342 检测芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 凋亡的影响	41
4.3.8 Western blot 法检测炎症信号通路相关蛋白的表达	42
4.3.9 数据处理	43
4.4 实验结果	43
4.4.1 芍药花提取物 RAW 264.7 细胞活性的影响	43
4.4.2 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响	44
4.4.3 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 炎症因子释放的影响	44
4.4.4 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 ROS 的影响	45
4.4.5 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞凋亡的影响	46
4.4.6 Western blot 法检测炎症信号通路相关蛋白的表达	46
4.5 本章小结	47
第 5 章 芍药花提取物抑制大鼠皮肤损伤机制研究	48
5.1 引言	48
5.2 实验材料和仪器	48
5.2.1 实验动物	48
5.2.2 实验试剂	49
5.2.3 实验主要仪器	49
5.3 实验方法	49

5.3.1 样品溶液的制备	49
5.3.2 动物造模	50
5.3.3 皮肤损伤观察	50
5.3.4 耳肿胀度与脾指数测定	50
5.3.5 皮肤组织病理切片观察	51
5.3.6 ELISA 检测免疫炎症因子	52
5.3.7 Western blot 法检测大鼠皮肤相关蛋白的表达	52
5.3.8 数据处理	52
5.4 结果	52
5.4.1 芍药花提取物对大鼠背部皮肤皮损状况的影响	52
5.4.2 芍药花提取物对耳肿胀度与脾指数的影响	53
5.4.3 芍药花提取物对大鼠皮肤的影响	54
5.4.4 芍药花提取物对大鼠体内炎症因子的影响	54
5.4.5 Western blot 法检测炎症信号通路相关蛋白的表达	55
5.5 本章小结	55
第 6 章 结论及展望	57
6.1 结论	57
6.2 展望	57
参考文献	59
攻读硕士学位期间研究成果	65
致谢	66

第1章 绪论

1.1 皮肤疾病研究进展

1.1.1 皮肤的结构

皮肤是身体的最外层，其表面积约为 18 m^2 ，是抵御多种外部病原体的第一道防线，由多种细胞及其基质组成^[1]。皮肤覆盖在人体表面，具有温度感觉等功能^[2]，通过防止体内水分流失来帮助维持体内平衡并负责与环境融合。皮肤病是人类非致命疾病的第四大常见疾病，影响约全世界三分之一的人口^[3]。皮肤主要由表皮层、中间层和皮下层组成^[4]。其中最上层是表皮，是一层层鳞状上皮，主要由角质形成细胞组成。层状上皮提供了一个与外界环境隔绝的水密屏障，防止体内过多的水分流失。表皮中的黑色素细胞合成黑色素为人体提供紫外线(UV)辐射的屏障；汗腺和皮脂腺能够分泌汗液和皮脂，保持皮肤的润滑和水分；表皮主要由下层的血管提供营养。第二层是真皮层，由胶原纤维和弹性纤维构成的结缔组织，含有丰富的毛细血管和神经末梢，主要为皮肤提供营养和感觉功能。除细胞外基质外，真皮层还包含毛细血管、静脉血管、动脉血管、毛细淋巴管、各种神经、汗腺和皮脂腺等结构。皮下组织位于真皮层的下方，主要含有丰富的脂肪结构，具有保温、缓冲、保护和存储能量的作用^[5]。

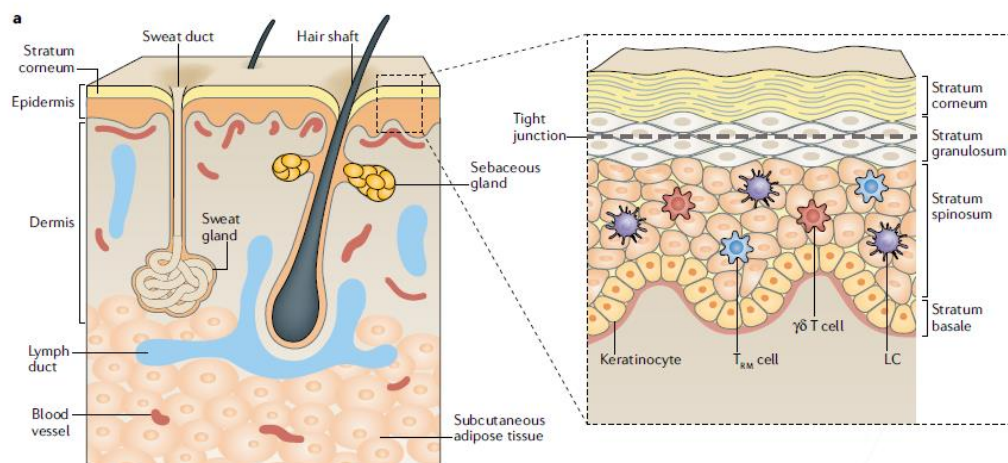


图 1-1 皮肤的基本结构^[1]

Figure 1-1 Basic structure of the skin

1.1.2 皮肤病的分类

由于暴露于机械损伤和温度波动、辐射、化学接触、过敏原感染，这些因

素与皮肤病的发生和发展密切相关^[6]。

皮肤易受到各种疾病的困扰，皮肤病由多种因素导致如性别、年龄、遗传、职业、季节、气候、地理位置以及其他因素导致。皮肤病种类繁多，根据不同的分类方式划分出不同类型。常见的有由病毒引起的皮肤病，真菌和细菌引起的各种皮肤癣，过敏原导致的过敏性皮肤病，外界损伤引起的物理性皮肤病以及自身免疫相关皮肤病等。

皮肤病按照病因进行分类，由真菌感染引起的，如手癣、足癣、体癣、股癣等；细菌感染引起的丹毒和麻风等；由病毒引起的水痘、疱疹等；还有由节肢动物引起的疥疮，及性传播疾病，如梅毒、淋病等。

皮肤病根据症状进行分类，由免疫系统引起的过敏性皮肤病，包括荨麻疹、湿疹、接触性皮炎等；物理性皮肤病，如晒斑、多型性日光疹等。由神经功能障碍引起的皮肤病，如瘙痒症、扁平苔藓等。

另外，还有一些特殊类型的皮肤病。银屑病、单纯的糠疹等，是一类常见的自身免疫性疾病。结缔组织疾病如红斑狼疮、硬皮病则是由免疫系统异常攻击自身组织引起的。疹性皮肤病如天疱疹、类天疱疹等，是由免疫系统异常破坏表皮细胞引起的。此外，还有色素障碍性皮肤病、皮脂、汗腺皮肤病等不同类型的皮肤病。

特应性皮炎(Atopic dermatitis, AD)是一种常见的皮肤病之一，其表现为面部、躯干四肢等反复发作的多形性皮损，常伴剧烈瘙痒，对患者及其家属的生活质量造成严重影响^[7]。其发病机制至今尚未完全明确。研究表明，特应性皮炎可能与遗传因素、免疫系统异常、环境因素等多种因素有关。遗传因素在特应性皮炎发病中起着重要作用，家族史中有特应性皮炎的患者的后代患病风险较高。免疫系统异常也被认为是特应性皮炎发病的重要因素，包括 T 细胞、B 细胞、树突状细胞等免疫细胞的异常活化可能导致皮肤炎症反应。

1.1.3 皮肤病的治疗概述

针对不同的皮肤病的治疗方法众多，但针对不同个体的治疗效果不同。对许多皮肤病患者来说，部分皮肤病仍然没有治愈的方法。其中一些也会导致严重的副作用。

目前主要的治疗方法有局部使用激素类药物，用于减轻皮肤炎症、瘙痒和

肿胀^[8]；局部使用抗生素和抗真菌药物，抑制由细菌或真菌引起的皮肤炎症；局部使用抗组胺类药物，用于减轻由过敏反应引起的皮肤炎症。同时，针对这些皮肤病还需要口服对应药物用于减轻体内的炎症和过敏反应^[9]。这些药物可以有效缓解症状、控制感染和减轻炎症，但可能带来一些副作用。激素类药物在治疗皮肤病时具有较强的抗炎和免疫抑制作用，但也伴随着严重的副作用，可能导致向心性肥胖、皮肤变薄、肌肉萎缩、骨质疏松、糖尿病、高血压、伤口愈合不良等。且儿童使用激素类药物可能会影响其正常生长和发育。抗生素主要用于治疗细菌性皮肤感染，但长期使用可能导致抗药性和副作用，会破坏肠道内的正常菌群，导致肠道问题，如腹泻、腹痛和恶心^[10]。此外，抗生素还可能引起过敏反应，从而引起皮疹、荨麻疹和过敏性休克^[11]。抗真菌药物用于治疗真菌性皮肤感染，如癣、念珠菌感染等，但抗真菌药物可能导致肝、肾功能受损，以及皮疹、瘙痒等过敏反应和真菌耐药性的产生^[12]。抗组胺类药物常用于治疗过敏性皮肤病，如荨麻疹、湿疹等，可以减轻变态症状，如瘙痒、红肿和喷嚏。然而，抗组胺药物可能导致嗜睡、口干、皮肤干燥，还可能引起头痛、皮疹和胃肠道不适等副作用^[13]。

在 AD 的治疗方面，传统的抗组胺药疗效不佳，糖皮质激素、免疫抑制剂、靶向单克隆抗体和小分子拮抗剂虽然能够缓解皮损，但依然未能解决皮损复发及瘙痒等问题。这些药物具有毒副作用大、反复使用容易产生耐药性和药物依赖性，治疗效果差等问题。因此开发寻找新的药物是目前亟需解决的问题。

由于新药批准数量的减少以及开发成本的上升，新药的发现正面临着严峻的挑战。且中草药中含有丰富化学物质，具有多种药理活性，从中草药中发现并制备新药物成为研究的新方向。

1.1.4 中草药皮肤病治疗中的研究进展

中草药是中医领域不可缺少的一部分，是人类文化结晶的瑰宝。中医药在研究和治疗皮肤疾病上有悠久的历史，在先秦时期的《五十二病方》中对皮肤病有记载^[9,14]。中草药作为一种传统药物治疗手段，含有丰富的药理活性物质，具有多种生物学功能和生理活性。具有独特的疗效和优势，被广泛运用于各种皮肤疾病的治疗和管理。

随着现代科学技术的发展，越来越多的研究关注于中草药对皮肤病的疗效

和安全性。研究表明，中草药具有抗炎^[15]、抗真菌^[16]、抗过敏、抗氧化^[17]和促进伤口愈合等多种作用^[18]，可有效缓解皮肤病症状，如湿疹^[19]、痤疮^[20]、银屑病^[21]等。

中草药含有丰富的抗炎活性物质成分^[22]，减轻皮肤炎症；研究显示，配方紫花地丁可以通过激活 JAK2/STAT3 信号通路促进皮肤中巨噬细胞极化，减轻皮肤炎症的产生从而减轻皮肤炎症的产生^[23]。黄芩苷通过抑制 TRPV3 活性，并抑制皮肤炎症反应^[24]。槲皮素通过降低小鼠皮肤炎症体内炎症因子的表达，显示槲皮素能够控制皮肤炎症的作用^[25]。中草药复方能有效减轻皮肤炎症患者的症状，并具有调节免疫功能、减少皮肤层厚度和促进角化细胞凋亡的作用^[26]。随着对中草药疗效和机制的不断深入研究，中草药在治疗皮肤病中的应用前景广阔。未来，中草药有望通过药物组合优化、靶向治疗等方式进一步提高治疗效果，并减少不良反应。同时，结合现代科技手段，对中草药活性成分的提取纯化、药效物质基础研究等，将有助于进一步揭示中草药治疗皮肤病的作用机制。

综上所述，中草药在皮肤病治疗方面具有广泛的应用前景。通过更深入研究其药理作用、临床应用情况以及潜在机制，将有望为发展中草药治疗皮肤病的新疗法和疗效评估提供更多的可能性，为促进中医药在皮肤病治疗中的应用奠定基础。

1.2 芍药花概况

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)作为中国传统名花之一，为毛茛科，芍药属植物。世界约 30 种，分布于北温带，大部分分布在亚洲，部分分布在欧洲南部和北美洲西部^[27,28]。中国有 11 种，主要分布西南、西北地区，其各种培植变种繁多^[29]。芍药在我国分布广泛，多生长于山川河谷地带或土丘陵墓之上，主产于浙江、安徽、四川、山东、贵州、河南、云南等地^[30]。有悠久的栽培历史，作为观赏植物栽培，最早见于晋代崔豹的《古今注》中，被列为中国六大名花之一^[31]。

《神农本草经》记载芍药性苦、酸，微寒，归肝，脾经^[32,33]。芍药作为药物应用历史悠久，早在先秦时期就已经作为药物应用，距今已有 1000 年历史。中医显示芍药具有活血化瘀、养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳等功

效^[27]。我国民间用于治疗胸腹肋疼痛、泻痢腹痛、自汗盗汗、阴虚发热、月经不调、崩漏、带下等症。

芍药含有丰富的化学成分，主要包括单萜苷类^[28]、三萜及其苷类、挥发油类^[34]、多糖类、黄酮类、鞣质类、生物碱、甾醇和氨基酸等多种化学成分^[29,35]。研究表明，芍药具有抗菌、抑菌^[36]、抗炎、抗氧化^[35,37]、镇痛镇静、抗惊厥、保护神经元^[28,38]、降血脂等药理作用。此外，芍药提取物能从多途径抑制自身免疫反应。主要用于自身免疫性疾病的干预，以及急、慢性肝炎、肝硬化等疾病的治疗^[39]。

芍药花作为芍药生长发育的器官，含有丰富的化合物，包括多种氨基酸、萜苷类、挥发油类^[40]、多糖类、鞣质类、黄酮类和甾醇等多种化学成分^[41,42]。具有丰富的生物活性。且芍药花无毒故可食用，可作为药食同源植物^[43]。在种植芍药的过程中却被完全忽视，任由其花开花谢，造成巨大的资源浪费。目前，国内外对于芍药花的研究有限，因此，基于芍药花开发功能产品可以满足人们对于健康的需求，前景广阔。研究开发相关产品，实现芍药花资源的充分利用，对芍药花的综合开发具有重要意义。

1.3 课题设计及研究内容

1.3.1 课题设计思路

皮肤是身体的最外层，其表面积约为 18 m²，是抵御外部病原体的第一道防线，由多种细胞及其基质组成，全球约有 1/3 的人被皮肤问题困扰。皮肤疾病成为影响人类生活生产的重要因素之一。然而，目前针对特应性皮肤问题的干预和治疗手段有限。临床使用的药物多为抗生素、激素类和免疫抑制类药物。这些药物虽然对皮肤问题有一定的治疗作用，但其毒副作用却极大的影响患者的身心健康。

因此，为了解决以上问题，本研究以中草药芍药的花为主要研究对象，研究芍药花提取物在皮肤炎症方面的作用。首先对芍药花中物质成分进行解析研究，利用超高效液相色谱联合质谱分析芍药花中的物质成分，从而为芍药花应用奠定物质基础。同时，结合质谱解析结果，利用高效液相色谱法对芍药花中的主要物质成分进行研究分析。针对分析结果与网络药理学结合，分析预测芍药花对皮肤炎症的干预的潜在作用机制。结合所得结果进行细胞和动物验证，

从而为芍药花在皮肤炎症方面提供理论和实践基础。

1.3.2 课题研究内容

本研究以芍药花为对象，研究芍药花物质基础的同时探究芍药花在皮肤炎症方面的治疗作用，为芍药花资源利用和产品开发提供理论和实践基础。具体研究内容如下：

（1）利用 UPLC-HRMS 和 HPLC 分析芍药花中物质成分，分析芍药花中物质成分不仅可以为芍药资源的开发提供物质基础，还能芍药花资源利用提供实践指导，从而为芍药资源的开发和功能研究提供理论依据；

（2）利用网络药理学结合质谱分析结果，分析预测芍药花对皮肤炎症潜在治疗作用，预测芍药花对皮肤炎症治疗的分子机制。从而为阐明芍药花治疗皮肤炎症的分子机制提供研究思路；

（3）结合网络药理学预测结果，体外构建炎症细胞模型，研究芍药花对体外炎症的干预作用，探究其在细胞水平上对炎症的干预作用；体内构建动物皮肤炎症模型，探究芍药花对皮肤炎症的治疗的分子机制并验证芍药花对皮肤炎症的治疗效果，从而为芍药花开发相关产品提供思路。

第2章 高效液相色谱-质谱联用法检测芍药花中物质成分

2.1引言

芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 别名将离、婪尾春、余容、犁食, 为毛茛科植物^[44]。具有镇痛、抗炎、抗氧化、抗抑郁、抗动脉硬化及抗肿瘤等作用。有平肝止痛、养精调血、敛阴止汗的功能。主要分布于我国东北、华北及甘肃南部等地。民间用于治疗胸腹肋肋疼痛、泻痢腹痛、自汗盗汗、阴虚发热、月经不调、崩漏、带下等症。

芍药花作为芍药生长发育过程中重要器官, 在我国拥有悠久的种植和栽培历史, 具有较高的观赏价值^[45]。芍药花中含有丰富的化学成分, 主要包含精油^[37,46]、萜类^[41]以及丰富的多酚^[47]、黄酮类^[48]等物质。研究表明, 芍药花中含有丰富活性物质, 具有抗炎及抗氧化等药理作用^[41,49]。芍药花提取物对细菌以及酵母菌具有较强的抑制作用^[36]。因芍药花无毒^[50], 具有较高的食用价值^[51]。在芍药种植过程中, 为了减少芍药养分的流失, 不能让其过分集中地吸收养分, 从而促进根的生长在^[52]。

中药成分复杂多样, 将中药的特色与现代化技术相结合, 快速、有效的研究中药中的成分, 阐明中药的药效物质基础及其作用机制十分有意义。液质联用技术 (LC-MS) 是现代研究常用的分析方法, 其将液相色谱的优越的分离特性与质谱高选择性、高灵敏度和提供结构信息的性能结合起来。LC-MS 高灵敏度、高专属性等特点和样品制备简单、分析速度快等优势, 已成为中药化学成分表征的主要技术之一^[53]。该方法是进行常规化合物鉴定和复杂成分分析的有效手段, 能够在保证预测化合物分子式的准确性的同时更全面的鉴定芍药花中的化学成分, 具有更高质量精度和更全面鉴定的特点。

因此, 本章利用 UPLC-HRMS 技术结合母离子列表的方法可以快速筛选芍药花中的化学成分, 并结合 HPLC 分析定量芍药花中主要活性成分为的资源利用提供研究基础。

2.2 实验材料和仪器

2.2.1 实验材料

芍药花采自宿州当地芍药种植地，经宿州学院翟科峰教授鉴定为芍药（*Paeonia lactiflora* Pall.）的花干燥后，收集备用。

表 2-1 实验试剂

Table 2-1 Experimental reagents

实验试剂	厂家
甲醇（色谱纯）	赛默飞世尔科技有限公司
乙腈（色谱纯）	赛默飞世尔科技有限公司
甲酸（分析纯）	西陇科学股份有限公司
冰醋酸（分析纯）	西陇科学股份有限公司
氧化芍药苷标准品	南京源植生物科技有限公司
芍药内酯苷标准品	南京源植生物科技有限公司
芍药苷标准品	南京源植生物科技有限公司
苯甲酰芍药苷标准品	南京源植生物科技有限公司
没食子酸标准品	上海源叶生物科技有限公司
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖标准品	上海源叶生物科技有限公司
芦丁标准品	上海源叶生物科技有限公司

2.2.2 实验主要仪器

表 2-2 实验主要仪器

Table 2-2 Main instruments of the experiment

仪器设备	厂家
LTQ-Orbitrap XL	赛默飞世尔科技有限公司
Ultimate 3000	赛默飞世尔科技有限公司
十万分之一电子分析天秤	美国 OHAUS 公司
Thermo Hypersil Gold 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)	赛默飞世尔科技有限公司
超纯水系统	Millipore 公司
抽滤装置	天津市津腾实验设备有限公司
电加热器	天津市津腾实验设备有限公司
Shim-pack C18 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),	岛津公司
高效液相色谱仪 SIL-20A	岛津公司

2.3 实验方法

2.3.1 供试品溶液制备

2.3.1.1 供试品溶液

将采集到的芍药鲜花，去枝，去叶，去茎，留下鲜花的花瓣，于烘箱进行干燥处理。精密称取上述干燥的鲜花样品5 g于圆底烧瓶中。按料液比1 g: 20 mL的比例加入100 mL浓度为30% (v/v) 乙醇溶液，微沸热回流提取3 h，静置冷却、恒重后，过滤。将所得滤液，经0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品检测溶液。

2.3.1.2 储备液的制备

精密称取适量的没食子酸标准品粉末、氧化芍药苷标准品粉末、芍药内酯苷标准品粉末、芍药苷标准品粉末、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖标准品粉末、芦丁标准品粉末、苯甲酰芍药苷标准品粉末分别置于容量瓶中，以甲醇为溶剂溶解并稀释至刻度，得到浓度分别为1.34、1.48、3.55、1.84、3.35、4.14、1.61 mg/mL的单一标准品储备液。

2.3.1.3 标准品溶液的制备

取上述标准品储备液适量分别置于容量瓶中，以甲醇稀释至刻度，得到浓度为134 $\mu\text{g/mL}$ 没食子酸标准品溶液、148 $\mu\text{g/mL}$ 氧化芍药苷标准品溶液、355 $\mu\text{g/mL}$ 芍药内酯苷标准品溶液、184 $\mu\text{g/mL}$ 芍药苷标准品溶液、335 $\mu\text{g/mL}$ 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖标准品溶液、414 $\mu\text{g/mL}$ 芦丁标准品溶液、161 $\mu\text{g/mL}$ 苯甲酰芍药苷标准品溶液。将所得标准品溶液过0.22 μm 微孔滤膜，即得标准品检测液。

2.3.1.4 混合对照品溶液制备

取上述7种对照品储备液，于10 mL容量瓶中混和均匀，以甲醇为溶剂稀释至刻度得到混合标准品溶液。将所得溶液过0.22 μm 微孔滤膜即得混合标准品检测液。

2.3.2 液质联用色谱条件

2.3.2.1 UPLC 色谱条件

采用 Thermo Hypersil Gold (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱，以乙腈(A)-0.075% 甲酸水(B)为流动相，设置柱温30 $^{\circ}\text{C}$ ，调整总流速为0.3

mL/min; 梯度洗脱程序见表 2-3。

表 2-3 液质联用梯度洗脱时间程序
Table 2-3 LC-MS gradient elution time program

时间(min)	乙腈(%)	0.075%甲酸水(%)
0	5	95
5	14	86
6.5	15	85
15	22	78
16	31	69
18	95	5
20	95	5
22	5	95
26	Stop	

质谱条件:

ESI 离子源温度 350 °C, 电离源电压 4 KV, 毛细管电压: 35 V, 管透镜电压: 110 V, 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (纯度>99.99%), 鞘气流速: 45 arb, 辅助气流流速: 15 arb; 傅里叶高分辨扫描范围 m/z: 100~1200; 一级扫描分辨率: 70000; 数据采用傅里叶变换高分辨全扫方式, 数据依赖性 ddMS² 和 ddMS³。

2.3.3 液相色谱条件

采用 Shim-pack C18 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A) -0.5%醋酸水溶液 (B) 为流动相, 设置柱温 30 °C, 调整总流速为 0.8 mL/min; 检测波长设置为 230 nm; 进样量 20 μL。洗脱时间程序见表 2-4。对目标成分分离效果见图 2-1 混合标准品 HPLC 色谱图, 图 2-2 芍药花提取物样品, 各峰分离度较好, 表明该色谱条件对样品及标准品具有较好的分离效果。

表 2-4 梯度洗脱时间程序
Table 2-4 Gradient elution time program

时间 (min)	乙腈 (%)	0.5%醋酸水 (%)
0	10	90
10	10	90
15	12	88
20	14	86
25	17	83
35	20	80
40	22	78
50	23	77
60	60	40
65	Stop	

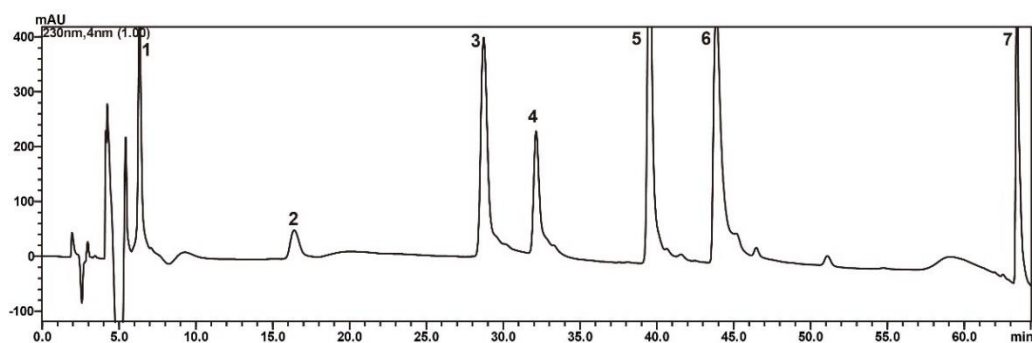


图 2-1 混合标准品 HPLC 色谱图 (1.没食子酸、2.氧化芍药苷、3.芍药内酯苷、4.芍药苷、5.芦丁、6.五没食子酰葡萄糖、7.苯甲酰芍药苷)

Figure 2-1 HPLC chromatogram of mixed standards (1. Gallic acid, 2. Oxypaeoniflora, 3. Albiflorin, 4. Paeoniflorin, 5. Rutin, 6. 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose, 7. Benzoylpaeoniflorin)

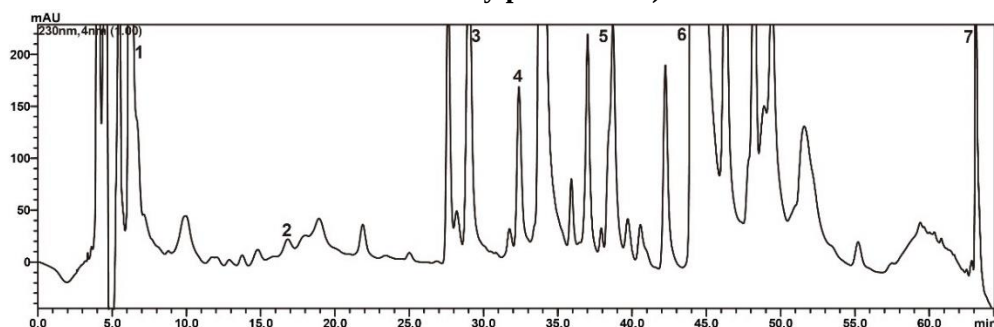


图 2-2 芍药花样品 HPLC 色谱图

Figure 2-2 HPLC chromatogram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower sample

2.4 实验结果

2.4.1 芍药花中化学成分的鉴定

在 2.3.2 所述条件下,对芍药花提取物中物质进行测定,其总离子流图(TIC)见图 2-3。对芍药花中物质化合物中通过母离子列表法分析,使用 Xcalibur 4.2 SP1 软件对质谱数据进行分析,通过高分辨率质谱信息包括一二级质谱、碎片离子和准分子离子峰等信息推导其可能的分子式,质谱偏差范围 $\delta \leq 5$ ppm。由化学专业数据库和相关文献检索结合正负离子模式下全扫图谱中离子丰度 $\geq 2 \times 10^4$ 确定母离子列表,通过化学专业数据库和相关文献检索进行指认和确证。结合化合物的质谱及裂解规律进行分析和鉴别,共推测、鉴定出 36 个化合物。36 个化合物的离子碎片信息数据见表 2-5。

结合相关文献和离子碎片发现结构相似的物质裂解途径具有相似性,断裂发生的位置也有一定的规律,芍药花中部分物质成分的裂解途径见图 2-4。

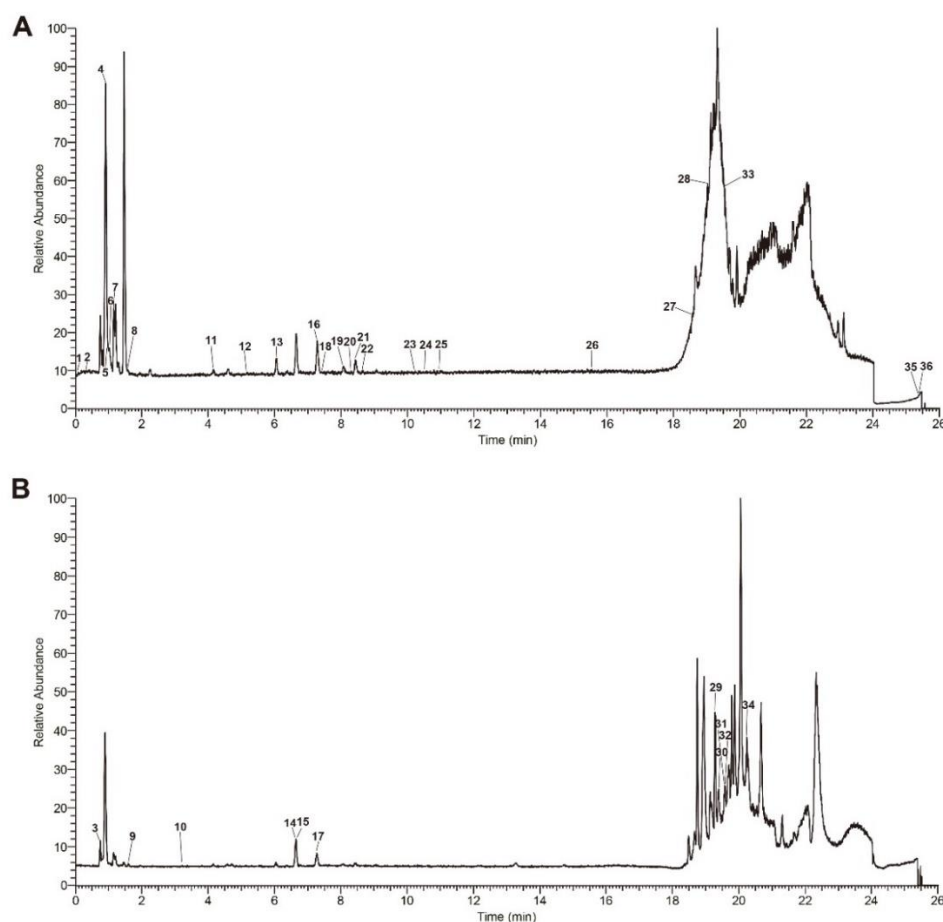


图 2-3 芍药花总离子流图 (TIC) (A.为芍药花阴离子流图; B.为芍药花阳离子流图)

Figure 2-3 Total ion flow (TIC) diagram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower (A. Negative ion flow diagram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower; B. positive ion flow diagram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower)

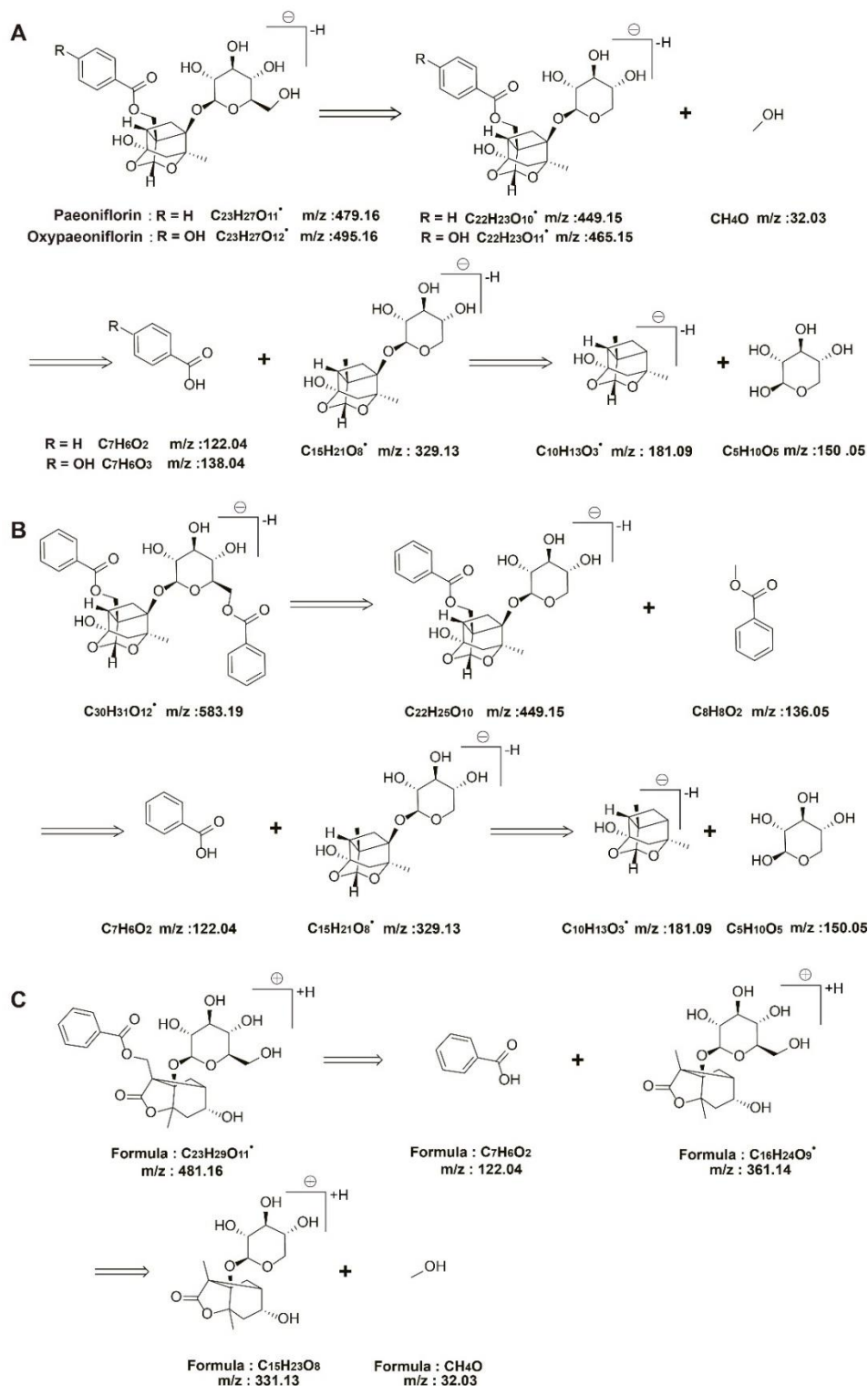


图 2-4 芍药花中部分物质的碎裂途径 (A. 芍药苷和氧化芍药苷; B. 苯甲酰芍药苷; C. 芍药内酯苷)

Figure 2-4 Fragmentation pathways of some substances in *Paeonia lactiflora* Pall. flower (A. Paeoniflorin and Oxypaeoniflorin; B. Benzoylpaeoniflorin; C. Albiflorin)

表 2-5 芍药花化学成分质谱鉴定结果

Table 2-5 Results of mass spectrometry identification of chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. flower

No.	离子模式	t _R (min)	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	偏差 (ppm)	二级碎片离子信息	分子式	化合物
1	-	0.05	182.0811	182.0812	0.58	136.98、112.99、92.99、61.99	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸 L-Tyrosine
2	-	0.32	163.039	163.0393	1.95	145.02、119.05	C ₉ H ₈ O ₃	对香豆素 p-Coumaric acid
3	+	0.75	289.0702	289.0712	3.67	245.08、179.03	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素 Catechin
4	-	0.9	191.0546	191.0551	2.77	173.05、127.04、109.03、85.03	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸 Quinic acid
5	-	0.96	173.0442	173.0451	5.51	155.03、137.02、129.02、111.05、93.03、83.05	C ₇ H ₁₀ O ₅	莽草酸 Shikimic acid
6	-	1	331.065	331.0633	-5.44	169.01、125.02	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	没食子酰葡萄糖 Glucogallin
7	-	1.13	343.066	343.0661	0.31	169.01、191.06、125.02、97.03	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	3-没食子酰奎宁酸 Theogallin
8	-	1.52	493.117	493.1183	2.79	331.06、169.01、125.03	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	没食子酰蔗糖 Galloylsucrose
9	+	1.58	169.013	169.0139	5.64	125.02、97.03	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸 Gallic acid
10	+	3.17	183.0286	183.0294	4.63	168.01、124.02	C ₈ H ₈ O ₅	没食子酸甲酯 Methyl gallate
11	-	4.13	495.1482	495.1498	3.43	465.14、332.98、165.06、137.01	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	氧化芍药苷 Oxypaeoniflorin
12	-	5.15	625.1378	625.1391	2.2	462.08、301.03、179.00、151.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	槲皮素-3, 7-二-O-葡萄糖苷 Quercetin-3,7-O-di-Glucoside
13	-	6.01	609.143	609.1445	2.61	447.09、285.04、151.00	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	山奈酚-3,7-O-二葡萄糖 Kaempferol-3, 7-O-diGlucoside
14	+	6.62	481.169	481.1703	2.86	449.24、357.14、326.93、282.83、121.02	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药内酯苷 Albiflorin
15	+	6.63	319.117	319.1174	1.33	121.03	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	芍药苷元酮 Paeoniflorigenone

16	-	7.25	479.1534	479.1547	2.88	449.23、431.16、357.54、327.12、165.06、121.03	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷 Paeoniflorin
17	+	7.29	179.0702	179.0701	-0.59	105.07、133.06、151.08	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	阿魏醛 Ferulaldehyde
18	-	7.38	525.1681	525.1683	0.4	165.06、121.03	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	牡丹皮苷 E Mudanpioside E
19	-	8.04	639.1534	639.1552	2.99	315.05、300.03、271.02、243.03	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	异鼠李素-3,7-二-O-葡萄糖苷 Isothamnetin-3,7-di-O-Glucoside
20	-	8.27	146.0447	146.0455	5.81	102.95、61.99	C ₅ H ₉ NO ₄	谷氨酸 L-Glutamic acid
21	-	8.39	668.1583	668.1553	-4.76	344.05、329.03、301.03、286.01	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₈	Dillenetin 5-glucoside-7-glucuronide
22	-	8.64	593.1482	593.1497	2.68	431.10、285.04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山奈酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷 Kaempferol-3-O-Glucoside-7-O-rhamnoside
23	-	10.26	631.1638	631.1663	4.2	613.15、491.13、313.05	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	没食子酰芍药苷 Galloylpaeoniflorin
24	-	10.49	939.1066	939.1114	5.42	787.10、617.08、465.07	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	1, 2, 3, 4, 6-O-五没食子酰葡萄糖 1,2,3,4,6-PentagalloylGlucose
25	-	10.97	447.091	447.0908	-0.47	318.98、154.99、384.98	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山奈酚-3-O-β-D-葡萄糖苷 Kaempferol-3-O-β-D-Glucoside
26	-	15.51	583.1794	583.1802	1.45	121.03、165.04	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	苯甲酰芍药苷 Benzoylpaeoniflorin
27	-	18.51	191.0182	191.0188	3.33	173.01、129.02、102.95、87.93	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸 Citric acid
28	-	19	285.039	285.04	3.72	257.02、243.11、239.01、228.93、199.04、184.92	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山奈酚 Kaempferol
29	+	19.33	181.0858	181.0859	0.59	116.97、139.99	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	苯甲酸异丙酯 Isopropyl 4-Hydroxybenzoate
30	+	19.44	279.2314	279.2316	0.76	67.05、81.07、219.17	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	α-亚麻酸 α-Linolenic acid
31	+	19.54	197.0806	197.0807	0.54	179.14、151.05、121.06、105.07	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	芍药苷元 B Paeonilactone B
32	+	19.54	197.0442	197.0452	5.38	168.07、123.12	C ₉ H ₁₀ O ₅	没食子酸乙酯 Ethyl gallate
33	-	19.55	473.0702	473.072	4.03	117.00、314.99、364.98	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	菊苣酸 Cichoric acid

34	+	20.23	485.091	485.0921	2.4	331.06、169.01、125.03	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖 1,6-di-O-galloyl-β-D-Glucose
35	-	25.38	125.0234	125.0242	6.78	69.03、81.03、97.03	C ₆ H ₆ O ₃	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural
36	-	25.41	122.0362	121.0288	1.75	103.03、87.99	C ₇ H ₆ O ₂	苯甲酸 Benzoic acid

2.4.1.1 氨基酸类

化合物 1 ($t_R=0.05$ min)

化合物 1 在正离子模式下推断该化合物二级特征碎片为丢失 CH_2O_2 形成的 m/z : 136.98 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_2]^+$, 继续丢失一分子二氧化碳后形成的 m/z : 92.99 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_2-\text{CO}_2]^+$ 。推导该化合物的分子质量为 182.0812, 分子式为 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 。根据高分辨精确分子量, 及质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对, 推测化合物 1 为酪氨酸^[54]。

化合物 20 ($t_R=8.27$ min)

化合物 20 在阴离子模式产生的 m/z : 102.95、 m/z : 81.59、 m/z : 61.99 等离子碎片。推导该化合物的分子质量为 146.0457, 分子式为 $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$, 根据化合物的碎片裂解规律推测化合物 20 为谷氨酸^[54]。

2.4.1.2 黄酮类

化合物 3 ($t_R=0.75$ min)

化合物 3 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 289.0712 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。其二级特征碎片为丢失一分子二氧化碳后形成的 m/z : 245.08 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$, 丢失 B 环形成的 m/z : 179.03 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2]^-$, 根据碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 3 为儿茶素^[55]。

化合物 12 ($t_R=5.15$ min)

化合物 12 根据谱图上的准分子离子峰 m/z : 625.1391 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 根据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$ 。其二级特征碎片为丢失一分子葡萄糖基生成的 m/z : 462.08 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glu}]^-$, 继续丢失一分子的葡萄糖残基形成的 m/z : 301.03 $[\text{M}-\text{H}-2\text{Glu}]^-$, 是槲皮素的母核结构。其中 m/z : 179.00 是丢失 B 环产生的, m/z : 151.00 $[\text{M}-\text{H}-2\text{Glu}-\text{CO}_2]^-$ 是发生 RDA 裂解规律产生的, 故推测化合物 12 为槲皮素-3,7-二-O-葡萄糖苷^[56]。

化合物 13 ($t_R=6.01$ min)

化合物 13 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 609.1445 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 根据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ 。其二级离子碎片丢失一分子葡萄糖基形成的 m/z : 447.09 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glu}]^-$, 又丢失一分子的葡萄糖基形成的 m/z :

285.04 [M-H-2Glu]⁻，以及黄酮类化合物母核发生 RDA 裂解规律产生的特征碎片 m/z : 151.00。根据高分辨精确分子量和质谱信息，碎片裂解规律，进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 13 为山奈酚-3,7-O-二葡萄糖^[57]。

化合物 19 ($t_R=8.04$ min)

化合物 19 在负离子模式下的准分子离子峰 m/z : 639.1552[M-H]⁻，根据元素组成结合数据库分析，推断该化合物的分子式为 $C_{28}H_{32}O_{17}$ 。其二级特征碎片为丢失一分子葡萄糖和一分子 H_2O 后形成的 m/z : 477.10 [M-H-Glu- H_2O]⁻，继续丢失一分子葡萄糖基后形成的 m/z : 315.05 [M-H-2Glu]⁻以及再丢失一分子 CH_3 ，HCO，CO 后分别产生的 m/z : 300.03 [M-H-2Glu- CH_3]⁻， m/z : 271.02 [M-H-2Glu- CH_3 -HCO]⁻， m/z : 243.03 [M-H-2Glu- CH_3 -HCO-CO]⁻，是典型的异鼠李糖苷碎片峰。根据高分辨精确分子量和质谱信息，碎片裂解规律，进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 19 为异鼠李素-3,7-二-O-葡萄糖苷^[58]。

化合物 22 ($t_R=8.64$ min)

化合物 22 在负离子模式下准分子离子峰 m/z : 609.1445 [M-H]⁻，根据元素组成结合数据库分析，推断该化合物的分子式 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。其二级离子碎片有，丢失一分子葡萄糖基形成的 m/z : 447.09 [M-H-Glu]⁻，又丢失一分子的葡萄糖基形成的 m/z : 285.04 [M-H-2Glu]⁻，以及黄酮类化合物母核发生 RDA 裂解规律产生的特征碎片 m/z : 151.00。根据高分辨精确分子量和质谱信息，碎片裂解规律，进行数据库比对推测化合物 22 为山奈酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷^[59]。

化合物 25 ($t_R=10.97$ min)

化合物 25 在负离子模式下，其准分子离子峰 m/z : 447.0908 [M-H]⁻。同时，结合数据库分析和元素组成，推断该化合物的分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。其二级特征碎片为丢失一分子葡萄糖基形成 m/z : 285.04[M-H-Glu]⁻，以及发生 RDA 裂解形成的 m/z : 255.03，227.03，151.00 与山奈酚裂解规律类似，是山奈酚的衍生物，推测其为山奈酚-3-O- β -D-葡萄糖苷^[60]。

化合物 28 ($t_R=19.00$ min)

化合物 28 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 285.0400 [M-H]⁻，同时，结合数据库分析和元素组成，推断该化合物的分子式 $C_{15}H_{10}O_6$ 。其二级特征离子碎片为丢失一分子 CO 形成的 m/z : 257.02 [M-H-CO]⁻，分别脱去一分子 H_2O 和一分子

子 CO 形成的 m/z : 239.01 $[M-H-CO-H_2O]^-$ 和 m/z : 228.93 $[M-H-2CO]^-$ 以及继续丢失一分子 CO_2 产生的 m/z : 184.92 $[M-H-2CO-CO_2]^-$, 另外由于碳键断裂导致的丢失 C_2H_2O 而形成的离子 m/z : 243.11 $[M-H-C_2H_2O]^-$ 后, 继续丢失一分子 CO_2 形成的 m/z : 199.04 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ 。根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献^[61]推测化合物 28 为山奈酚。

2.4.1.3 有机酸类

化合物 2 ($t_R=0.32$ min)

化合物 2 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 163.0393 $[M-H]^-$, 同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_9H_8O_3$ 。其二级特征碎片为丢失一分子水形成的 m/z : 145.02 $[M-H-H_2O]^-$ 后, 继续丢失一分子 CO_2 形成的 m/z : 119.05 $[M-H-CO_2]^-$ 。根据高分辨精确分子量、质谱信息和碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 2 为对香豆酸^[62]。

化合物 5 ($t_R=0.96$ min)

化合物 5 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 173.0451 $[M-H]^-$, 同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_7H_{10}O_5$ 。其特征碎片为丢失一分子水形成的 m/z : 155.03 $[M-H-H_2O]^-$, 继续丢失一分子 COO 形成的 m/z : 111.05 $[M-H-H_2O-COO]^-$ 和再丢失一分子 CO 的 m/z : 83.05 $[M-H-H_2O-COO-CO]^-$; 丢失两分子水后形成的 m/z : 137.02 $[M-H-2H_2O]^-$ 和再丢失一分子羧基形成的 m/z : 93.03 $[M-H-2H_2O-COOH]^-$, 丢失一分子羧基形成的 m/z : 129.02 $[M-H-COOH]^-$ 等。根据高分辨精确分子量、质谱信息和碎片裂解规律, 进行数据库比对并参考有关文献推测化合物 5 为莽草酸^[63]。

化合物 7 ($t_R=1.13$ min)

化合物 7 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 343.0661 $[M-H]^-$, 同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_{14}H_{16}O_{10}$ 。其特征碎片为丢失一分子葡萄糖残基后形成的 m/z : 169.01 $[M-H-Glu]^-$, 剩余的没食子酸母核裂解丢失一分子 CO_2 后形成 m/z : 125.02 $[M-H-Glu-CO_2]^-$, 剩余的碎片继续丢失一分子 CO 形成 m/z : 97.03 $[M-H-Glu-CO_2-CO]^-$ 。根据高分辨精确分子量、质谱信息、碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 7 为 3-没食子酰奎宁酸^[64]。

化合物 10 ($t_R=3.17$ min)

化合物 10 根据质谱上的准分子离子峰 $m/z:183.0294$ $[M+H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_8H_8O_5$ 。其特征碎片为丢失一分子甲基形成的 $m/z: 168.01$ $[M+H-CH_3]^+$, 而二级质谱图中 $m/z: 124.02$ 则为为羰基 α 裂解产生的三羟基苯离子, 根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 10 为没食子酸甲酯^[65]。

化合物 27 ($t_R=18.51$ min)

化合物 27 根据质谱上的准分子离子峰 $m/z: 191.0188$ $[M-H]^-$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_6H_8O_7$ 。其二级特征碎片有 $m/z: 173.01$ $[M-H-H_2O]^-$, $m/z: 129.02$ $[M-H-H_2O-CO_2]^-$, $m/z: 111.01$ $[M-H-H_2O-CO_2-H_2O]^-$, $m/z: 102.95$ $[M-H-2CO_2]^-$, $m/z: 87.93$ $[M-H-H_2O-CO_2-C_2H_2O]^-$, 根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对推测化合物 27 为柠檬酸^[66]。

化合物 30 ($t_R=19.44$ min)

化合物 30 在负离子模式下, 推断该化合物的产生的 $m/z: 67.05$ 、 $m/z: 97.06$ 、 $m/z: 219.17$ 等离子碎片有, 推导该化合物的分子质量为 279.2316, 分子式为 $C_{18}H_{30}O_2$ 根据元素组成结合数据库分析推断该化合物的分子式为 $C_{18}H_{30}O_2$, 推测化合物 30 为 α -亚麻酸^[67]。

化合物 32 ($t_R=19.54$ min)

化合物 32 根据质谱上的准分子离子峰由化合物 21 准分子离子峰 $m/z: 197.0452$ $[M+H]^+$, 分子式为 $C_9H_{10}O_5$ 比没食子酸甲酯多 CH_2 , 产生的主要碎片离子有 $m/z: 168.07$ 、 $m/z: 123.12$ 与甲酯类似, 因此推测化合物 32 为没食子酸乙酯^[68]。

化合物 33 ($t_R=19.55$ min)

化合物 33 在负离子模式下准分子离子峰 $m/z: 473.0720$ $[M-H]^-$, 产生的主要碎片离子有 $m/z: 61.99$ 、 $m/z: 93.00$ 、 $m/z: 276.99$ 、 $m/z: 364.98$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成推断该化合物的分子式为 $C_{22}H_{18}O_{12}$, 推测化合物 33 为菊苣酸^[69]。

化合物 36 ($t_R=25.41$ min)

化合物 36 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 121.0288 $[M-H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_7H_6O_2$ 。其特征碎片为丢失一分子 H_2O 后形成的 m/z : 103.03 $[M-H-H_2O]^+$ 。并继续丢失一分子 CH_3 后生成 m/z : 87.99 $[M-H-H_2O-CH_3]^+$, 根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 36 为苯甲酸^[62]。

2.4.1.4 萜类

化合物 11 ($t_R=4.13$ min)

化合物 11 的准分子离子峰 m/z : 495.1498 $[M-H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推测其分子式 $C_{23}H_{28}O_{12}$, 其特征离子碎片是丢失一分子甲醛形成 m/z : 465.23 $[M-H-CH_2O]^+$ 。并继续丢失一分子葡萄糖残基后形成的 m/z : 332.98 $[M-H-Glu]^+$, m/z : 165.04 和 137.01 分别是萜烷基本结构骨架以及裂解下来的对羟基苯甲酸, 故推测化合物 11 为氧化芍药苷^[62]。

化合物 14 ($t_R=6.62$ min)

化合物 14 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 481.169 $[M-H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式 $C_{23}H_{28}O_{11}$ 。据推测, 应是芍药苷的同分异构体, m/z : 449.24, 326.93, 357.14, 121.02 等碎片离子和芍药苷的形成方式相同, m/z : 435.21 $[M-H-CO_2]^+$ 以及通过葡萄糖基团和苯甲酸酯基的六元环转换形成 m/z : 282.83 等碎片离子, 可以推测化合物 14 是芍药内酯苷^[62]。

化合物 16 ($t_R=7.25$ min)

化合物 16 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 479.1547 $[M-H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式 $C_{23}H_{28}O_{11}$ 。其二级特征碎片为丢失葡萄糖 6 号位的一分子甲醛形成的 m/z : 449.23 $[M-H-CH_2O]^+$ 及继续丢失一分子水形成的 m/z : 431.16 $[M-H-CH_2O-H_2O]^+$, 母离子丢失一分子甲醛和一分子苯甲酸得到碎片离子 m/z : 327.12 $[M-H-CH_2O-C_7H_6O_2]^+$, m/z : 165.06 是其萜烷基本骨架结构的碎片。 m/z : 121.03 和 m/z : 357.54 是连接在萜烷上的苯甲酰取代基及剩余部分的碎片离子, 推测化合物 16 为芍药苷^[70]。

化合物 18 ($t_R=7.38$ min)

化合物 18 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 525.1603 $[M-H]^+$, 推断该化合物

的分子式 $C_{24}H_{30}O_{13}$ 。其特征碎片为丢失 1 分子葡萄糖形成的 m/z : 263.56 $[M-H-Glu]^-$ 。 m/z : 165.06 和 m/z : 121.03 分别是蒽烷基本结构骨架和连接在蒽烷上的苯甲酰取代基。根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对推测化合物牡丹皮苷 $E^{[71]}$ 。

化合物 23 ($t_R=10.26$ min)

化合物 23 的准分子离子峰为 m/z : 631.1663 $[M-H]^-$ 。其特征谱图中含有 m/z : 165.04 和 m/z : 121.03 等特征碎片离子, 还有失去一分子水 m/z : 613.16 $[M-H_2O]^-$, 再失去一分子水和苯甲酸产生的 m/z : 491.13 $[M-2H_2O-C_7H_6O_2]^-$ 以及继续失去一分子 $C_{10}H_9O_3$ 产生的 m/z : 313.06 $[M-2H_2O-C_7H_6O_2-C_{10}H_9O_3]^-$ 离子等, 推测其为没食子酰芍药苷^[68]。

化合物 26 ($t_R=15.51$ min)

化合物 26 负离子模式下的准分子离子峰为 m/z : 583.1810 $[M-H]^-$, 其质谱中同样产生了产生碎片离子 m/z : 121.03 的苯甲酰基碎片离子和 m/z : 165.04 的蒽烷骨架结构, 故推测化合物 26 为苯甲酰芍药苷^[68]。

2.4.1.5 鞣质类

化合物 4 ($t_R=0.90$ min)

化合物 4 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 191.0551 $[M-H]^-$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_7H_{12}O_6$ 。其二级特征碎片为丢失一分子水后形成的 m/z : 173.05 $[M-H-H_2O]^-$, 继续丢失 $C_3H_5O_3$ 后形成的 m/z : 85.03 $[M-H-H_2O-C_3H_5O_3]^-$; 脱去 CH_4O_3 形成的 m/z : 127.04 $[M-H-H_2O-CH_4O_3]^-$ 继续丢失一分子 H_2O 形成的 m/z : 109.03 $[M-H-CH_4O_3-H_2O]^-$ 。根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 4 为奎宁酸^[72]。

化合物 6 ($t_R=1.00$ min)

化合物 6 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 331.0633 $[M-H]^-$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_{13}H_{16}O_{10}$ 。其特征碎片为丢失一分子葡萄糖残基后形成的 m/z : 169.01 $[M-H-Glu]^-$, 剩余的没食子酸母核裂解丢失一分子 CO_2 后形成 m/z : 125.02 $[M-H-Glu-CO_2]^-$, 根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合

物 6 为没食子糖苷^[71]。

化合物 8 ($t_R=1.52$ min)

化合物 8 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 493.1183 $[M-H]^-$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_{19}H_{26}O_{15}$ 。母离子丢失一分子葡萄糖基后形成的 m/z : 331.06 $[M-H-Glu]^-$, 丢失两分子葡萄糖可得到 m/z : 169.01 $[M-H-2Glu]^-$ 与 m/z : 125.02 是没食子酸的特征碎片离子。故推断化合物 8 是没食子酰蔗糖^[71]。

化合物 9 ($t_R=1.58$ min)

化合物 9 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 169.0139 $[M+H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_7H_6O_5$ 。其二级特征碎片为丢失一分子 CO_2 后形成的 m/z : 125.02 $[M+H-CO_2]^+$ 和继续丢失一分子 CO 后形成的 m/z : 97.03 $[M+H-CO_2-CO]^+$ 。根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献推测化合物 9 为没食子酸^[68]。

化合物 17 ($t_R=7.29$ min)

化合物 17 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 179.0708 $[M+H]^+$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断该化合物的分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$ 。其二级特征碎片为丢失一分子 CO 后形成的 m/z : 151.08 $[M+H-CO]^+$, 继续丢失一分子 CH_3 后生成 m/z : 136.02 $[M+H-CO-CH_3]^+$, 根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对和参考有关文献^[73]推测化合物 17 为阿魏醛。

化合物 24 ($t_R=10.49$ min)

化合物 24 负离子模式下的准分子离子峰为 m/z : 939.1114 $[M-H]^-$, 失去 1 分子没食子酰基 ($C_7H_5O_4$) 得到 m/z : 787.10, 再失去 1 分子没食子酸 ($C_7H_5O_6$) 得到 m/z : 617.08, 继续丢失一分子没食子酰基 ($C_7H_5O_4$) 得到 m/z : 465.07, m/z : 447.06。以上数据与 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖对照品的保时间和裂解规律相同, 与文献报道一致, 故推测化合物 24 为 1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖^[65]。

化合物 34 ($t_R=20.23$ min)

化合物 34 根据质谱上的准分子离子峰 m/z : 485.0921 $[M+H]^+$, 根据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式为 $C_{20}H_{20}O_{14}$ 。主要碎片有丢失一分子没食子酰基得到的 m/z : 331.06 $[M+H-C_7H_5O_4]^+$, 继续丢失 1 分子葡萄糖基碎片

得到的 m/z : 169.01 $[M+H-C_7H_5O_4-Glu]^+$, 剩下的没食子酸母核裂解失去一分子 CO_2 得到 m/z : 125.03 $[M+H-C_7H_5O_4-Glu-CO_2]^+$, 参照文献推测化合物 34 为 1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖^[74]。

2.4.1.6 糖苷类

化合物 15 ($t_R=6.63$ min)

化合物 15 的准分子离子峰为 m/z : 319.1174 $[M+H]^+$, 推断该化合物的分子式 $C_{17}H_{18}O_6$ 。其二级质谱中检测出 m/z : 121.03 的离子碎片, 与芍药苷裂解规律类似, 故推测其为芍药苷元酮^[65]。

化合物 21 ($t_R=8.39$ min)

化合物 21 准分子离子峰 m/z : 669.1653 $[M-H]^-$ 。同时, 结合数据库分析和元素组成, 推断分子式为 $C_{29}H_{32}O_{18}$ 。其二级特征碎片为丢失 1 分子葡萄糖形成的 m/z : 489.11 $[M-H-C_6H_{12}O_6]^-$ 。失去葡萄糖醛酸上的 1 分子水后又丢失一分子葡萄糖苷和葡萄糖酸后形成的 m/z : 329.03 $[M-H-H_2O-162-160]^-$, 再丢失一分子 CO 后形成的 m/z : 301.03 $[M-H-18-162-160-28]^-$, 继续丢失一分子 CH_3 最后形成 m/z : 286.01 $[M-H-CH_3-H_2O-CH_3]^-$ 。根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 进行数据库比对推测化合物为 Dillenetin 5-glucoside-7-glucuronide^[75]。

化合物 31 ($t_R=19.54$ min)

化合物 31 的准分子离子峰 m/z : 197.0807 $[M+H]^+$, 根据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式 $C_{10}H_{12}O_4$ 。依据丢失一分子水形成的 m/z : 179.14 $[M+H-H_2O]^+$, 继续丢失 CO 后形成的 m/z : 151.05 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 以及 m/z : 121.06, 105.07 等根据高分辨精确分子量, 一、二级质谱信息, 碎片裂解规律, 推测化合物 31 为芍药苷元 B^[65]。

2.4.1.7 醛类

化合物 35 ($t_R=19.54$ min)

化合物 35 准分子离子峰 m/z : 125.0242 $[M-H]^-$, 产生的主要离子碎片有 m/z : 67.03、 m/z : 98.02、 m/z : 125.04。根据元素组成结合数据库分析, 推断该化合物的分子式为 $C_6H_6O_3$, 推测化合物 35 为 5-羟甲基糠醛^[76]。

2.4.1.8 酯类

化合物 29 ($t_R=19.33$ min)

化合物 29 准分子离子峰 m/z : 181.0859 [M-H]⁻, 精确相对分子质量可推测其最可能的分子式为 $C_{10}H_{12}O_3$, 在二级质谱中出现了 m/z : 92.99、 m/z : 61.99, 因此推测化合物 29 为对羟基苯甲酸异丙酯^[77]。

2.4.2 HPLC方法学评价

2.4.2.1 线性关系的考察

分别量取“2.3.1.4”制备的混合标准品溶液, 以甲醇为溶剂配制系列浓度的对照品混合溶液, 进行测定。按“2.3.3”所述色谱条件每个浓度重复进样 3 次, 记录各标准品的出峰时间统计各物质的峰面积, 设置标准品的浓度(x)为横坐标, 设置峰面积(y)为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示, 色谱峰面积与浓度在一定范围内具有良好的线性关系。结果见图 2-5 和表 2-6。

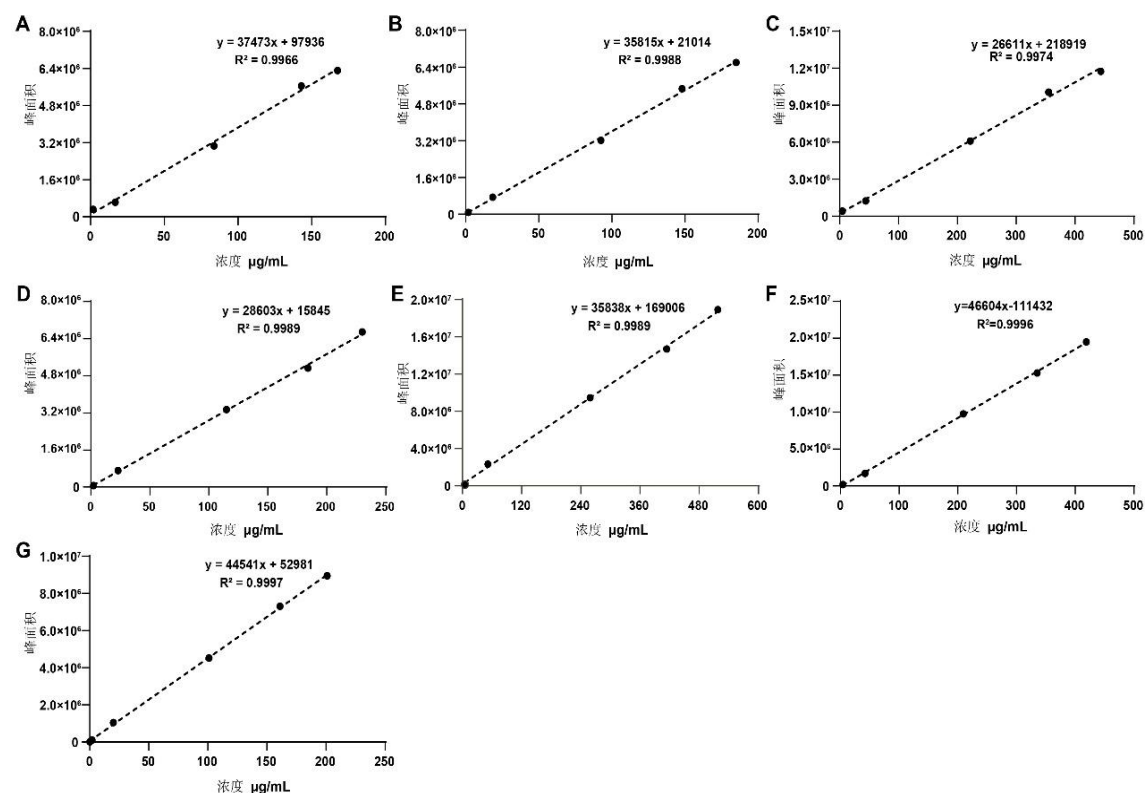


图 2-5 各标准品线性关系 (A.没食子酸、B.氧化芍药苷、C.芍药内酯苷、D.芍药苷、E.芦丁、F.1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、G.苯甲酰芍药苷)

Figure 2-5 Linearity of each standard (A. Gallic acid, B. Oxypaeoniflora, C. Albiflorin, D. Paeoniflorin, E. Rutin, F. 1,2,3,4,6-Pentagalloylglucose, G. Benzoylpaeoniflorin)

表 2-6 线性关系考察
Table 2-6 Examination of linear relationships

成分	回归方程	相关系数 R^2	线性范围 $\mu\text{g/mL}$
没食子酸	$y=37473x+97936$	0.9966	1.68-167.50
氧化芍药苷	$y=35815x+21014$	0.9988	1.85-185.21
芍药内酯苷	$y=26611x+218919$	0.9974	4.50-443.75
芍药苷	$y=28603x+15845$	0.9989	2.32-230.25
芦丁	$y=35838x+169006$	0.9989	2.18-517.20
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	$y=46604x-111432$	0.9996	4.19-418.75
苯甲酰芍药苷	$y=44541x+52981$	0.9997	2.12-200.23

2.4.2.2 精密度考察

精密吸取“2.3.1.3”项下制备的对照品 20 μL ，按“2.3.3”项所述的色谱条件进样，重复 6 次，并记录出峰时间和峰面积。结果测得 1~7 峰面积的 RSD 分别为 0.7%、1.5%、0.6%、0.7%、0.9%、1.2%、1.5%。结果表明，仪器精密度良好。

2.4.2.3 重复性考察

精确称取同一批芍药花样品 6 份，按“2.3.1.1”项所述方法制备芍药花提取液，按照“2.3.3”项条件进样 20 μL ，记录个样品中各成分的峰面积，并计算各成分含量。测得上述样品的平均含量的 RSD 分别为 1.2%、1.3%、1.5%、2.1%、1.9%、1.1%、1.6%。表明该方法重复性良好。

2.4.2.4 稳定性试验

取适量的芍药花样品，按照“2.3.1.1”项下方法制备供试品溶液，分别在时间为 0、2、4、8、12、24 h 的条件下按照在上述的色谱条件下进样 20 μL 进行分析，记录各标准品的出峰时间和峰面积。没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、芦丁、1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖、苯甲酰芍药苷峰面积的 RSD ($n=8$) 分别为 0.2%、0.6%、0.9%、1.2%、0.9%、1.5%，1.7%。结果表明，供试品溶液中 7 个化合物在 24 h 内稳定性良好。

2.4.2.5 加样回收率实验

取上述已知含量的芍药花样品 5 份。依次加入适量已知浓度的对照品储备

液，按照“2.3.1.2”项方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项所述色谱条件下进行测定，计算回收率。结果芍药花中上述各种有效成分的平均回收率（ $n=5$ ）分别为 98.3%、105.3%、106.2%、98.4%、97.6%、103.8%、97.9%；RSD 分别为 1.3%、2.4%、1.9%、1.2%、1.4%、2.1%、1.1%。

2.4.3 样品含量测定

取“2.3.1.1”项下方法制备的供试品溶液，按“2.3.3”所述色谱条件进样并检测，重复 3 次，记录出峰的时间及峰面积，并通过上述目的样品的线性关系，计算各成分含量，结果见表 2-7。

表 2-7 样品中各成分含量测定

Table 2-7 Determination of the content of each component in the samples

	样品含量($\mu\text{g/mL}$)			平均含量 $\bar{x}(n=3)$ ($\mu\text{g/mL}$)
没食子酸	497.59	499.03	499.24	498.62
氧化芍药苷	12.74	11.49	11.23	11.82
芍药内酯苷	214.93	214.83	214.43	214.72
芍药苷	142.96	144.21	141.95	143.04
芦丁	17.61	16.01	16.18	16.60
1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖	1565.29	1567.03	1568.50	1566.94
苯甲酰芍药苷	59.64	60.12	59.85	59.87

2.5 本章小结

本章主要采用 UPLC-HRMS 技术定性分析芍药花提取液中的化学成分，定性分析芍药花提取液中的化学成分，初步推断出芍药花中的 36 个化学成分，分别为其中氨基酸类 2 个，分别为酪氨酸和谷氨酸；黄酮类 7 个分别为儿茶素、槲皮素-3,7-二-O-葡萄糖苷、山奈酚-3,7-O-二葡萄糖、异异鼠李素-3、7-二-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷、山奈酚-3-O- β -D-葡萄糖苷、山奈酚；有机酸类 8 个分别为对香豆酸、莽草酸、没食子酸甲酯、柠檬酸、 α -亚麻酸、没食子酸乙酯、菊苣酸、苯甲酸；鞣质类 8 个分别为奎宁酸、没食子苷、没食子苷、3-没食子酰基奎宁酸、没食子酰蔗糖、没食子酸、阿魏醛、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖、1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖；萜类 6 个分别为氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、牡丹皮苷 E、没食子酰芍药苷、苯甲酰芍药苷；糖苷类 3 个分别为芍药苷元酮、Dillenetin 5-glucoside-7-glucuronide、芍

药昔元 B；酯类 1 个为对羟基苯甲酸异丙酯；醛类 1 个为 5-羟甲基糠醛。通过高效液相色谱法（HPLC）以芍药花为研究对象，以 30%（v:v）乙醇为提取溶剂，按照料液比 1:20，热回流提取 3 h，能够快速实现对芍药中 7 种成分进行定量分析。本章研究明晰芍药花中物质成分，为芍药花资源开发提供理论基础。

第3章 基于网络药理学分析芍药花提取物对皮肤炎症的治疗机制

3.1 引言

随着现代社会的快节奏生活 and 环境污染的加剧，皮肤疾病在人群中的发病率逐渐增加。由于皮肤暴露在机械损伤、温度变化、辐射、化学接触、过敏原等外界因素，从而直接或间接导致皮肤病的发生与发展。然而，大部分皮肤病的发生和发展中伴随着炎症的发生。因此，从抑制炎症角度研究治疗皮肤病的方法成为可能。

随着现代科学技术的发展，越来越多的研究关注于中草药对皮肤病的疗效和安全性。传统中草药治疗皮肤疾病在中国已有数千年的历史，其疗效在临床实践中得到了广泛验证和认可。中草药治疗皮肤疾病是一种绿色、天然、安全、有效的治疗方法，具有独特的优势和潜力。

网络药理学是近年来兴起的一门新兴交叉学科，它运用系统生物学的理论和方法，通过对生物系统的整体性分析，来研究药物的作用机制、进行药物分子的多靶点设计。网络药理学的发展为药物研究提供了全新的视角和方法，尤其是在中药研究中表现出巨大的优势。

网络药理学研究对象是药物与生物系统之间的相互作用关系，其研究内容包括药物的作用机制、靶点预测、药物相互作用、药物毒性等方面的研究。网络药理学研究方法主要包括化合物筛选、靶点预测和网络构建等步骤。首先，通过各种数据库和分析工具，筛选出可能与疾病相关的化合物；然后，利用生物信息学方法预测这些化合物的潜在靶点；最后，构建药物—靶点—疾病之间的网络模型，分析药物的作用机制和可能的副作用。

网络药理学在药物研发和临床应用中具有重要的应用价值。通过对药物的作用机制进行深入研究，可以更好地理解药物的疗效和副作用，为药物的优化和改良提供理论依据。同时，网络药理学也可以为新药的研发提供新的思路和方法，帮助开发更加安全有效的药物。

本章旨在结合网络药理学探讨芍药花提取物对皮肤炎症的潜在治疗作用，

从而为研究芍药花治疗皮肤炎症提供理论依据。

3.2 实验材料

3.2.1 数据库

表 3-1 主要数据库
Table 3-1 Main Databases

数据库	网址
PubChem 数据库	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
UniProt 数据库	https://www.uniprot.org/
SwissTargetPrediction 数据库	http://swisstargetprediction.ch/
STRING 数据库	https://cn.string-db.org/
基因名片数据库 (Gene Cards)	https://www.genecards.org/
微生信	https://www.bioinformatics.com.cn/

3.2.2 主要软件

表 3-2 主要软件
Table 3-2 Main Software

软件	网址
ChemDraw 20	http://www.chemdraw.net.cn/
Cytoscape	https://cytoscape.org/

3.3 实验方法

3.3.1 生物信息学分析

3.3.1.1 芍药花提取物与皮肤炎症靶点的筛选

基于 UPLC-HRMS 和 HPLC 分析获得的成分信息，将获得成分导入到 PubChem 数据库中得到成分信息，并将所得结果导入到 SwissTargetPrediction 数据库预测活性成分的作用靶点。通过基因名片数据库以“Dermatitis”为关键词，搜索相关疾病潜在靶点，得到与皮肤炎症相关的疾病靶点。将获得的芍药花成分信息获得的靶点信息与皮肤炎症相关靶点进行匹配，运用 Draw Venn Dia-gram 在线绘图网站绘制 Venn 图。

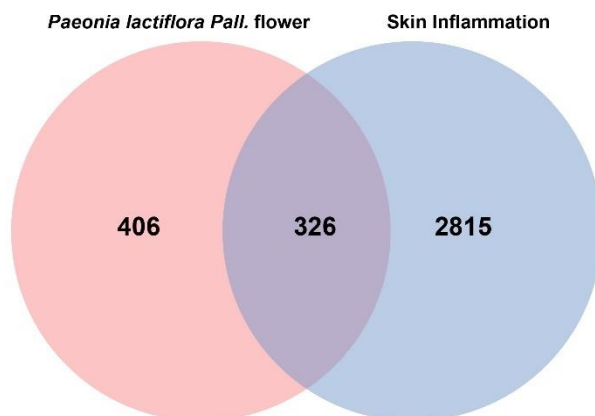


图 3-2 芍药花与皮肤炎症靶点的韦恩图

Figure 3-2 Venny diagram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower and skin inflammatory targets

3.4.1.2 药物疾病靶点间蛋白互作网络(PPI)

利用 Cytoscape 3.8.2 软件建立了芍药花提取物与皮肤炎症的 PPI 互作网络图，结果见图 3-3。结果显示，芍药花提取物与皮肤炎症相关的潜在靶点包括：TP53、EGFR、TNF、AKT1、IL-6、SRC、STAT3、IL-1 β 、HSP90AA1、BCL2、JUN、GAPDH、MAPK3、STAT1。

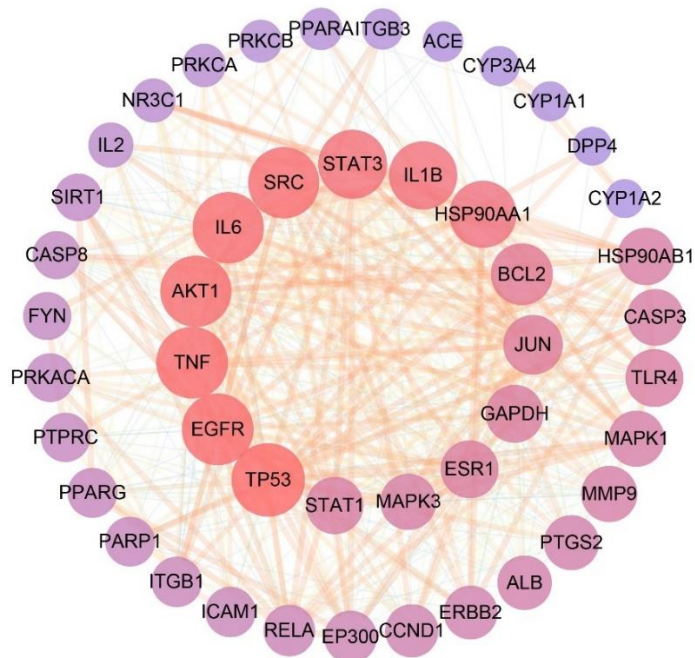


图 3-3 芍药花-靶点-皮肤炎症疾病网络

Figure 3-3 *Paeonia lactiflora* Pall. flower -target-skin inflammatory disease network

3.4.1.3 基因本体（GO）功能富集分析

将所得结果导入到 DAVID 数据库对获得的 326 个共同靶点进行 GO 富集分析。结果显示，有 1013 个生物过程（Biological Process, BP）条目为对脂多糖的反应、对缺氧的反应、血管生成的正向调节、对外来刺激的反应、细胞对脂多糖的反应、正向调节 ERK1 和 ERK2 级联、炎症反应、蛋白磷酸化、凋亡过程负向调控、基因表达的正向调控等。119 个细胞组成（Cellular Component, CC）条目，包括：突触前膜、膜筏、顶质膜、细胞表面、细胞质核周区、质膜的组成部分、细胞外泌体、质膜、细胞液、细胞质等。240 个分子功能（Molecular Function, MF）条目为 RNA 聚合酶 II 转录因子活性，配体激活序列特异性 DNA 结合、内多肽酶活性、支架蛋白结合、整合素结合、酶结合、丝氨酸-型内肽酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性、锌离子结合、相同的蛋白质结合，结果见图 3-4。

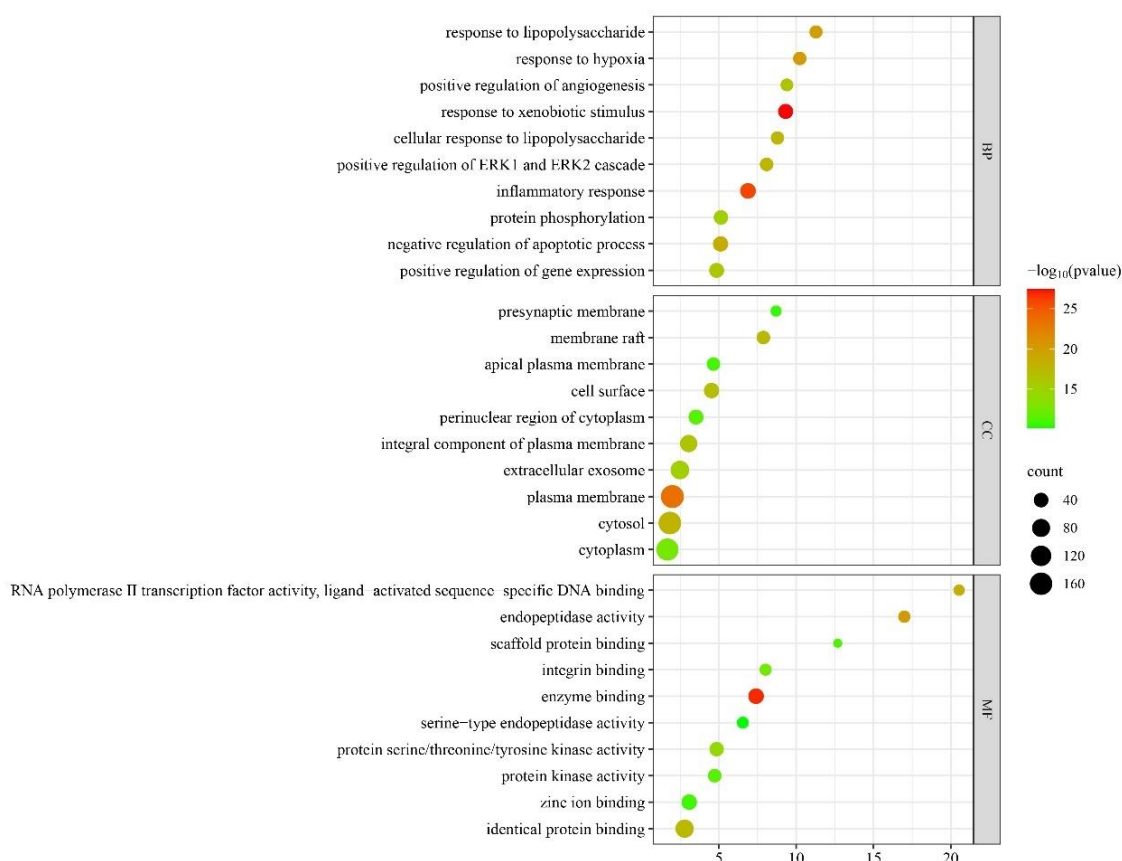


图 3-4 芍药花治疗皮肤炎症靶点 GO 分析结果

Figure 3-4 Results of GO analysis of targets of *Paeonia lactiflora* Pall. flower for the treatment of skin inflammation

3.4.1.4 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对芍药花与皮肤炎症相关的 326 个共同靶点进行 KEGG 通路富集分析。富集得到 KEGG 信号通路共 187 条，通过设定 $P < 0.05$, $FDR < 0.05$, 排名前 20 条目如图 3-5 所示。结果显示，芍药花主要与代谢途径、癌症途径、脂质和动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路、化学致癌-受体激活、癌症中的蛋白聚糖、人巨细胞病毒感染、阿尔茨海默病、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、化学致癌-活性氧、冠状病毒病-COVID-19、人乳头瘤病毒感染、乙型肝炎、MAPK 信号通路、癌症中的 microRNA、流体剪切应力与动脉粥样硬化、神经活性配体-受体相互作用、AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用、cAMP 信号通路、神经退行性疾病的通路-多种疾病等有关。

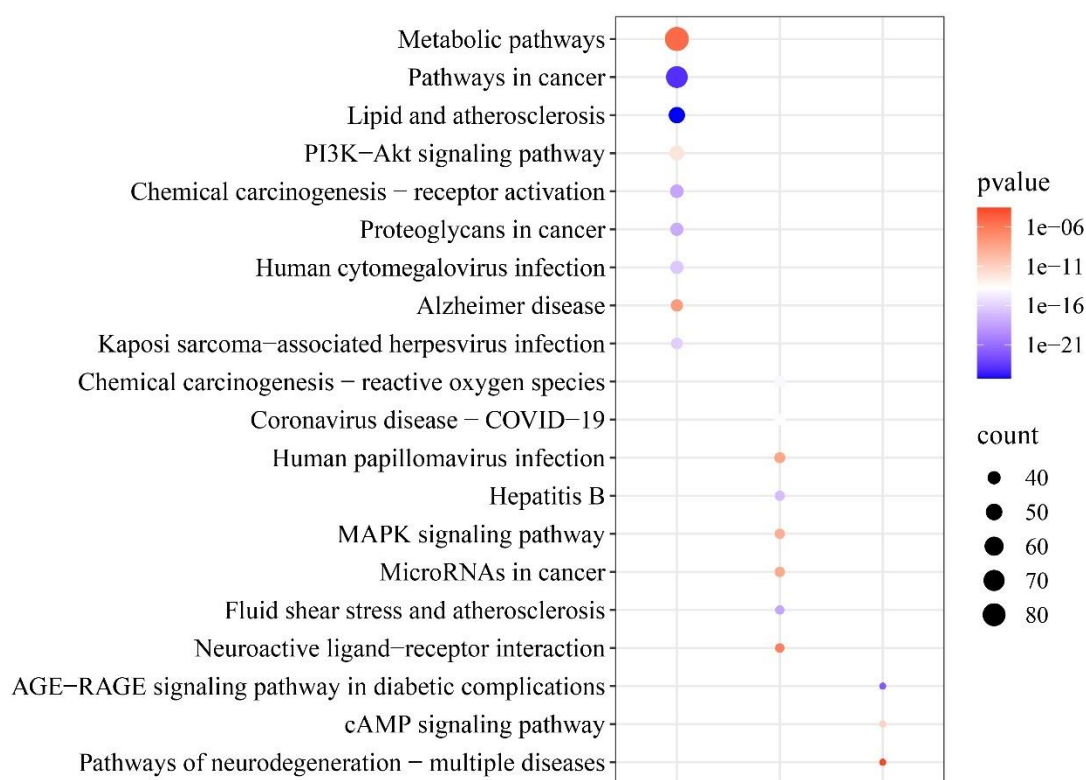


图 3-5 芍药花治疗皮肤炎症靶点 KEGG 富集分析

Figure 3-5 Structure of KEGG analysis of *Paeonia lactiflora* Pall. flower in the treatment of skin inflammation

3.4.2 成分-靶点-通路

经过 KEGG 通路分析结果，将通路中的靶点映射到化合物中，并利用 Cytoscape 3.8.2 构建“成分-靶点-通路”网络图。结果显示，该网络包括 33 个

活性化合物、239 个靶点和 20 个信号通路。其中表明，芍药花可以通过多种化合物、多个靶点作用于多种途径，从而达到治疗皮肤炎症的效果，如图 3-6 所示。

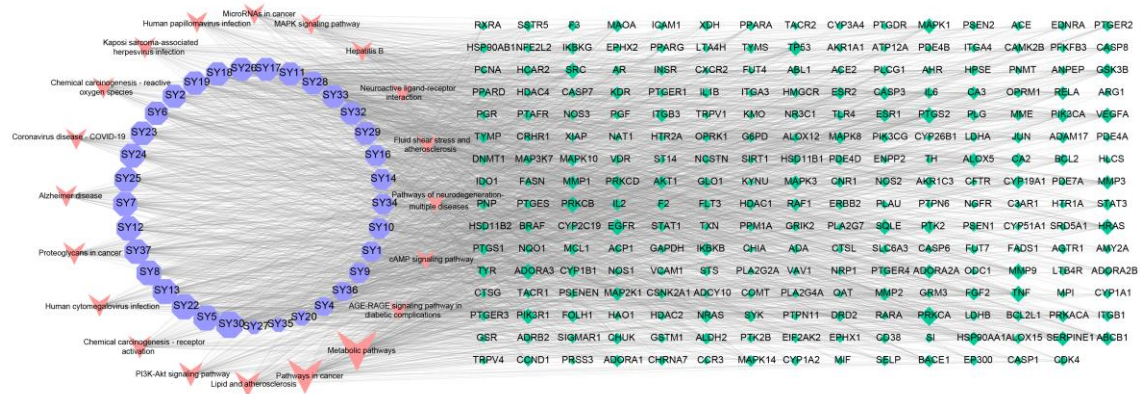


图 3-6 芍药花治疗皮肤炎症的“成分-靶点-通路”网络图（紫色圆形代表活性成分，蓝色正方形代表靶点，红色 V 形代表通路）

Figure 3-6 Ingredient-target-pathway network diagram of *Paeonia lactiflora* Pall. flower for the treatment of skin inflammation (purple circles represent the active ingredient, blue squares represent the target, and red V-shape represents the pathway)

3.5 本章小结

本研究结合前期物质基础，将化合物成分靶点与皮肤炎症相关靶点进行对比，获得芍药花与皮肤炎症的潜在作用靶点，并通过构建蛋白互作网络获得抗皮肤炎症的作用靶点，包括 P53、EGFR、TNF、AKT1、IL-6、SRC、STAT3、IL-1β、HSP90AA1、BCL2、JUN、GAPDH、MAPK3、STAT1。从而在皮肤炎症中起着重要的作用。TNF 和 IL2 参与皮肤炎症的发生与发展，TNF 和 IL2 可激活 Janus 激酶(JAK)-STAT，细胞外信号调节激酶(ERK)和磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)通路^[78]。在皮肤修复过程中，巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞同时进入创面分泌血管内皮生长因子(VEGF)，最终促进血管生成^[79]。表皮生长因子受体(EGFR)促进角化细胞的增殖、迁移和血管生成以及介导炎症来促进伤口的再上皮化，促进皮肤愈合^[80]。综上，阐明了本研究所筛选的相关靶点与皮肤炎症的发生发展密切相关。

根据网络药理学分析结果，结合 KEGG 通路分析表明芍药花可能通过 TNF、VEGFA、EGFR、MAPK3、IL2 等与炎症、分化和免疫相关的信号通路而发挥

对抑制皮肤炎症，促进皮肤修复的作用。其中与 MAPK 信号通路关系密切。且有研究表明，JNK 与皮肤炎症密切相关，具有调控皮肤细胞周期，促进细胞凋亡等作用^[81]。JINLIAN L^[82]等人的研究发现，在太阳紫外线辐射诱导的皮肤炎症中 p38 诱导转录因子激活，这些转录因子协调阻滞细胞周期、DNA 修复抑制和凋亡。因此，芍药花对可以通过作用炎症信号通路对皮肤炎症具有潜在治疗作用。

第4章 LPS诱导的RAW 246.7细胞模型验证芍药花提取物对抑制炎症的作用机制

4.1 引言

皮肤炎症是指皮肤因各种原因引起的一种炎性反应。炎症是皮肤疾病发生和发展的重要因素之一，它在多种皮肤病的病理过程中都起着关键的作用。在皮肤疾病的发生和发展中占据着极其重要的地位。作为一种基本的生物反应，炎症是机体对于各种内外因素引起的细胞损伤的应答，这种应答既是生理性的，也是病理性的。在皮肤病学领域，炎症反应的异常可以导致一系列的皮肤病变，影响患者的身心健康。当皮肤屏障功能受损，如受到细菌、病毒、真菌等微生物的侵袭时，炎症反应便被触发，以尽可能地清除病原体修复受损组织。然而，如果炎症反应过于强烈或者持续时间过长，就可能导致慢性炎症，进而引发皮肤疾病。

芍药在我国具有悠久的种植和栽培历史，药用历史悠久^[83]，芍药花中含有没食子酸，芍药苷，芍药内酯苷，氧化芍药苷，苯甲酰芍药苷，1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖和芦丁等物质。研究表明，没食子酸具有抗癌^[84]、抗过敏^[85]等作用；黄酮类成分具有抗氧化、抑菌、保肝等作用。芍药萜类物质具有抗肿瘤、抗炎、抑制糖尿病^[86]等作用。芍药苷是一种萜烷单萜苷，具有神经保护^[87]和抗癌作用，芍药苷可以通过抑制 Notch231 途径抑制人乳腺癌细胞系 MDA-MB-7 和 MCF-1 的增殖和侵袭^[88]；芍药苷对急性肝损伤具有保护作用，通过 SIRT1/FOXO1a/SOD2 信号通路抑制氧化应激和炎症，改善脂多糖诱导的急性肝损伤^[89]。没食子酸具有抗癌^[84]、抗过敏^[85]等作用，可通过调控 Akt 和 AMPK 信号通路提高胰岛素敏感性，抑制 caspase-9 相关的细胞凋亡来改善 β 细胞的功能^[86,90]。研究表明，芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷和氧化芍药苷具有抗炎、抑制滑膜细胞的异常增殖和促炎介质的产生等作用^[91]。

随着生活节奏的加快以及环境和生活压力等多方面影响，皮肤问题逐渐凸显。皮炎是指由各种因素导致的感染或非感染性皮肤炎症性的一个泛称，其病因和临床表现复杂多样，且反复发作，治疗困难。然而，目前对于皮炎主要为

非特异性治疗，主要以激素类药物进行治疗^[92]。由于激素类药物的特性，导致这些药物不能长期使用，且副作用明显^[93]。因此，开发一种天然且毒副作用小的具有治疗皮肤炎症的药物具有重要意义。基于网络药理学预测结果，揭示芍药花对皮肤炎症具有潜在的治疗作用。因此，本章以体外细胞炎症模型，探究芍药花对炎症的抑制作用，以探究芍药花的抗炎作用。

4.2 实验材料和仪器

4.2.1 实验材料

表 4-1 实验试剂

Table 4-1 Experimental reagents

实验试剂	厂家
DMEM培养液	Hyclony
胎牛血清	上海逍鹏生物科技有限公司
青霉素-链霉素双抗试剂	苏州新赛美生物科技有限公司
二甲基亚砷（DMSO）	国药集团化学试剂有限公司
MTT	上海麦克林生化科技有限公司
细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司
LPS	索莱宝生物科技有限公司

4.2.2 实验主要仪器

表 4-2 主要仪器

Table 4-2 Main instruments

仪器设备	厂家
NIB900倒置荧光显微镜	宁波永新光学股份有限公司
Infinite200酶标仪	瑞士Tecan公司
ZEAL WAY高压灭菌锅	致微仪器有限公司
HH-2恒温水浴锅	江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司
e-blot接触式蛋白成像系统	易亨特公司
JIMBIO iCytal细胞计数仪	江苏卓微生物科技有限公司

4.3 实验方法

4.3.1 芍药花提取物的制备

取芍药花干花 1 kg, 按照 2.3.1.1 所述的方法提取物芍药花提取液, 提取结束后, 冷却至室温。低温减压浓缩并冷冻干燥, 将所得固体研磨得芍药花提取物。

4.3.2 细胞培养

4.3.2.1 细胞复苏

从-80 °C中取出装有 RAW 264.7 细胞株的冻存管, 快速转移到 37 °C水浴锅中融化后, 向冻存管中加入含配制的 DMEM 完全培养基混匀后, 于 1100 rpm 离心 3 min 后弃上清。向沉淀中加入 1 mL 新鲜的完全培养基轻轻吹打混匀后, 将混悬液转移到 10 cm 细胞培养皿中摇匀, 置于在 37 °C和 5% CO₂条件下培养箱中培养。

4.3.2.2 细胞传代

将 RAW 264.7 细胞培养在含有 10%胎牛血清和双抗的 DMEM 完全培养基中培养, 在 37 °C和 5% CO₂条件下在培养箱中培养, 待细胞铺满培养皿中 80%时, 进行传代。加入含有 0.25% EDTA 的胰酶溶液于 37 °C消化处理 2 min, 向其中加入等量的完全培养基终止消化后, 收集到离心管中, 1100 rpm, 离心 3 min, 弃上清, 加入 1 mL 新鲜培养基用移液枪轻轻吹匀细胞进行传代 (1:3)。

4.3.2.3 细胞冻存

取对数生长期 RAW 264.7 细胞, PBS 清洗 2 次, 去除残留的培养基。加入 1 mL 0.25%的胰酶消化 2 min, 收集细胞, 1100 rpm, 离心 3 min 后, 弃上清, 向细胞沉淀中加入 1 mL 无血清冻存液, 轻轻吹打混匀。分装于冻存管中, 做好标记后转移到-80 °C冰箱中保存。

4.3.2.4 实验分组

将细胞随机分组。以 DMEM 培养基培养, 未经任何处理的作为空白组; 经 1 µg/mL LPS 诱导以无血清 DMEM 培养基培养作为模型组; 给药处理组: 将由 1 µg/mL LPS 诱导以, 加入含有 0.5 µg/mL、1.0 µg/mL、2.0 µg/mL 的芍药花提取物和 10 µg/mL 的地塞米松的无血清 DMEM 培养基培养细胞作为给药组。于细胞培养箱内无菌培养 24 h 后进行后续研究。

4.3.2.5 建立 LPS 诱导 RAW 264.7 炎症细胞模型

RAW 264.7 细胞用 DMEM 完全培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。1 µg/mL 的 LPS 诱导 24 h 后诱细胞炎症的发生。

4.3.3 芍药花提取物对RAW 264.7细胞毒性的影响

取长至 90% 的 RAW 264.7 细胞，计数并调整细胞浓度，按每孔 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，于 37 °C，5%CO₂ 中培养 24 h 后，弃上清，使用含有不同浓度的芍药花提取物的培养基培养。使药物浓度为 0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 µg/mL，重复 6 个孔。培养 24 h 后，每孔加入 20 µL 5 mg/mL MTT，继续培养 4h 后，小心弃上清，每孔加入 150 µL 的 DMSO，置摇床上摇晃 8 min，在酶标仪上于 490 nm 处检测吸光度，按照公式 4-1 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{A_{\text{给药组}} - A_{\text{调零}}}{A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零}}} \times 100\% \quad (4-1)$$

4.3.4 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7细胞NO释放量的影响

按照 4.3.3 所述的方法将细胞接种于 96 孔板中，培养 24 h 后，弃去上清，除空白组外每组给予 1 µg/mL LPS 诱导细胞炎症后，使用对应浓度的药物给药培养 24h 后，收集上清液，采用 Griess 法按照试剂盒所述方法测定 NO 含量。取出 Griess Reagent I 和 II 室温放置 20 min。收集细胞上清，离心取上清，按 50 µL/孔，在 96 孔板中加入标准品及样品。向每孔中分别加入 50 µL Griess Reagent 后，继续添加 Griess Reagent II，于水平摇床上混匀。于 540 nm 测定吸光度。

4.3.5 ELISA检测细胞上清中IL-2和TNF-α的表达

将细胞按 4.3.2.4 实验分组处理，每组 3 个复孔，孵育 24 h。实验采用翼飞雪生物科技有限公司的 ELISA 试剂盒检测细胞上清中 IL-2 和 TNF-α 表达水平，具体方法如下：

- (1) 按照说明书所述方法在 96 孔板中加入逐级稀释标准品溶液。
- (2) 在 96 孔板中先加入 40 µL 的样品稀释液后，再加入 10 µL 待测样品溶液，并于水平摇床上缓慢摇动。
- (3) 将混合好的 96 孔板用封膜封口后，转移到 37 °C 孵育箱中静置 30 分钟。
- (4) 按说明书说所述方法，将洗涤液稀释备用。

(5) 待孵育完成后, 弃去上层液体, 甩干, 用洗涤液洗涤 96 孔板重复 5 次, 最后一次拍干;

(6) 除空白孔外, 每孔加入带有 HRP 标记的酶标试剂 50 μL 。

(7) 将混合好的 96 孔板用封膜封口后, 转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中静置 30 分钟。

(8) 重复洗涤操作, 并拍干。

(9) 先向每孔加入显色剂 A 50 μL , 再加入显色剂 B 50 μL , 于水平摇床上缓慢摇动, 转移到 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。

(10) 向每孔加 50 μL 终止液, 终止反应。

(11) 于 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 并结合标准曲线计算结果。

4.3.6 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7中ROS影响

DMEM完全培养基培养RAW 264.7细胞。调整细胞密度, 按每孔 3×10^5 个/孔接种于24孔板中, 培养24 h后, 加入LPS诱导细胞炎症后, 弃上清加入对应浓度的药物继续培养24 h后。采用原位装载探针法, 参照说明书具体实验方法如下:

(1) 取培养好的细胞, 弃上清, 用预热好的PBS洗涤2遍。

(2) 按照 1:1000 用 DMEM 基础培养基稀释了 DCFH-DA, 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

(3) 弃去细胞上清, 加入适量稀释好的 DCFH-DA, 轻轻摇晃使含有 DCFH-DA 探针的培养液均匀覆盖在细胞表面。

(4) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内避光培养 20 min。用 DMEM 基础培养基洗涤细胞三次, 以充分去除游离的 DCFH-DA, 吸弃上清。

(5) 于倒置荧光显微镜观察细胞荧光, 并拍照记录。

4.3.7 Hoechst 33342检测芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7凋亡的影响

DMEM完全培养基培养RAW 264.7细胞。调整细胞密度, 按每孔 3×10^5 个/孔接种于24孔板中, 培养24 h后, 加入LPS诱导细胞炎症后, 弃上清加入对应浓度的药物继续培养24 h后。采用Hoechst 33342染色法, 检测细胞凋亡, 具体实验方法如下:

- (1) 取培养好的细胞，弃上清，用预热好的PBS洗涤2遍。
- (2) 加入适量细胞固定液，室温固定20 min。
- (3) 小心去除细胞表面液体，用适量PBS洗涤3次，每次3 min。
- (4) 加入500 μ L Hoechst 33342染色液，染色5 min。
- (5) 去除染色液，用PBS洗涤3次，每次5 min。
- (6) 取200 μ L抗荧光淬灭封片液于孔中，轻轻摇晃使细胞浸润，于倒置荧光显微镜下拍照。

4.3.8 Western blot法检测炎症信号通路相关蛋白的表达

(1) 细胞总蛋白的提取：按“4.3.2.4”分组，并培养细胞，加入 1 mL PBS 清洗，加入适量体积的细胞裂解液，于冰上裂解 10 min 后，置于冰上裂解，收集细胞混悬液，4 $^{\circ}$ C冰箱静置 40 min，裂解过程中间断轻轻摇晃，低温冷冻离心机 12000 rpm 离心 10 min，弃沉淀，仔细收集上清液，定量，根据蛋白体积，加入 6 $\times$ Loading buffer 混匀，于 100 $^{\circ}$ C加热 7 min 后，所得即为蛋白提取物。

(2) 制胶：将制备好的 10%的分离胶缓慢加入组装好的玻璃板中，至玻璃板顶端 1 cm 处，在液面上小心注入蒸馏水封闭，静置 45 min。堆积胶：用滤纸条小心吸干分离胶上面的蒸馏水，将配置好的堆积胶缓慢加入玻璃板中至满溢，小心快速插入梳子，不要产生气泡，静置 45 min，将板放置于电泳缓冲液中，拔去梳子。

(3) 上样：电泳槽中加入电泳缓冲液；将蛋白样品分别连续的加入泳道，并且加入的蛋白样品前后泳道分别加入 2 μ L，1.8 μ L 的 Marker。

(4) 跑胶：选择 80 V 恒压进行电泳；待两端 Marker 清晰分层后，转用 120 V 恒压，至溴酚蓝条带至玻璃板末端 1 cm 处停止电泳。

(5) 转膜：结合目标蛋白的分子量，根据 Marker 做好标记；先加 Transfer，小心撬开玻璃板，切下目标蛋白所在的胶上位置；按照胶条的尺寸裁剪滤纸与 PVDF 膜。用甲醇活化 5 min 后浸泡 Transfer 中；从负极到正极按滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸制备“三明治”。

(6) 转膜槽中加满转膜液，于 4 $^{\circ}$ C环境中，设置 200 mA 恒流转膜，观察目标蛋白的相对分子质量确定转膜的时间。

(7) 封闭：用 TBST 液洗涤 PVDF 膜 3 次，每次 8 min；放入 5% BSA 中，室温下摇床震荡 2 h。孵育结束后，TBST 洗膜 3 遍，每次 8 min。

(8) 一抗孵育：用通用型抗体稀释液稀释一抗 p38、P-p38、JNK、P-JNK、NF- κ B、IKK、P-IKK、 β -actin。在封膜的 PVDF 中加入稀释过的一抗，4 °C 过夜；隔天翻膜，检查膜正面是否有气泡，同时为了使一抗结合的效果更好：取出，室温下放置 15 min 后，回收一抗：一抗回收后 PVDF 膜用 TBST 洗 3 遍，每次 8 min。

(9) 配制二抗兔抗和鼠抗，将 PVDF 膜浸泡入二抗中，室温摇床缓慢震荡 2 h，孵育结束后，回收二抗，用冷的 TBST 洗涤 3 遍，每遍 8 min。

(10) 显影：ECL 显色 1:1 混合 A 液 B 液配制显色液，均匀滴加到 PVDF 膜上，在凝胶成像系统中观察并记录。

(11) 结果分析：用 Image J 分析软件将目的蛋白条带及内参蛋白条带灰度数字化，比较蛋白的表达。

4.3.9 数据处理

将数据导入 GraphPad Prism 8.0.2 中计算进行处理，以 *t*-student 检验或 ANOVA 分析检测数据的显著性，结果以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$) 方式表现。模型组与空白组相比较， $^{\#}P<0.05$ 表示差异具有统计学意义， $^{\#\#}P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义；模型组与给药组相比较 $^*P<0.05$ 表示差异具有统计学意义， $^{**}P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

4.4 实验结果

4.4.1 芍药花提取物RAW 264.7细胞活性的影响

用不同浓度的芍药花提取物干预 RAW 264.7 细胞，筛选药物浓度，MTT 法检测不同质量浓度芍药花提取物对细胞活力的影响。结果发现，与空白组相比，芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞抑制的 $\text{IC}_{50}=14.3\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，在 $2.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下时，对细胞的毒性作用不明显，进一步提高药物浓度后，对细胞具有显著的抑制效果 ($P<0.05$)。

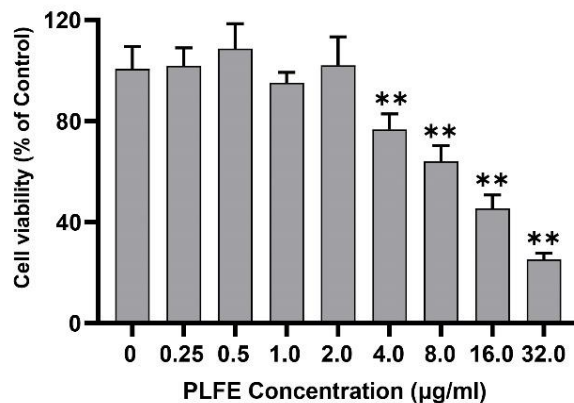


图 4-1 芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响

Figure 4-1 Effects of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on RAW 264.7 cell viability

4.4.2 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7细胞NO释放的影响

一氧化氮（NO）是细胞炎症反应过程中的炎症介质之一，是细胞炎症反应的重要指标之一。如图 4-2 所示，采用 Griess 检测法检测由 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞中的 NO 水平，反应芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞的炎症水平。结果显示，与空白组相比，LPS 诱导组的 NO 水平显著提高（ $P<0.01$ ），提示 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症的产生；与模型组相比，给药组能显著抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 的产生，且不同剂量的芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 水平显著降低（ $P<0.05$ ）。

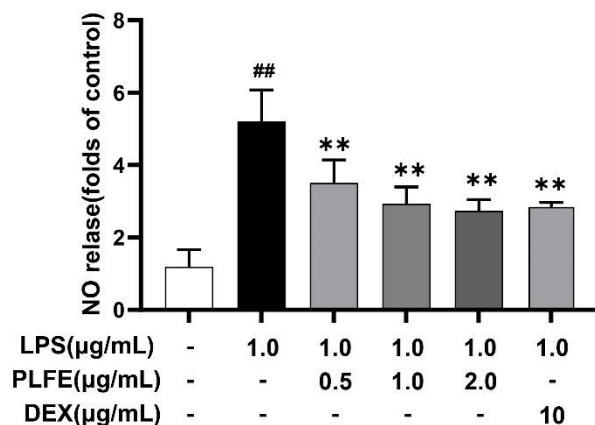


图 4-2 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 NO 释放的影响

Figure 4-2 Effect of *Paeonia Paeonia* Pall. extract on NO release from RAW 264.7 cells induced by LPS

4.4.3 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7炎症因子释放的影响

炎症因子水平的变化能够反应炎症水平的变化，反应芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7细胞炎症的干预作用。如图 4-3所示，用ELISA法检测细胞上

清液中炎性因子IL-2和TNF- α 的水平。与空白组相比，LPS诱导组的IL-2和TNF- α 水平显著升高（ $P<0.01$ ），与模型组相比，给药组能显著抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞中IL-2和TNF- α 的产生，不同剂量的芍药花提取物能显著降低LPS诱导的RAW 264.7细胞中炎性介质的水平（ $P<0.05$ ）。上述结果表明，芍药花提取物能够通过调节细胞中炎性因子的释放来抑制细胞炎症反应的发生，这可能是其发挥抗炎活性的原因之一。

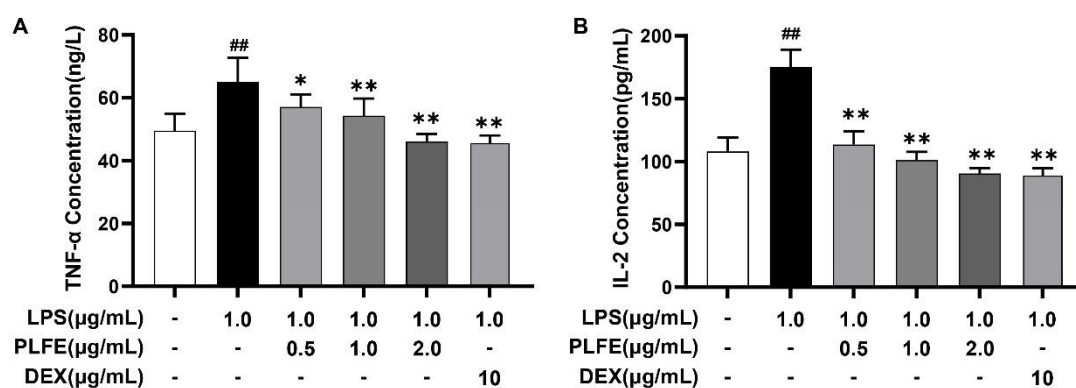


图 4-3 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症因子释放的影响。(A. 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 IL-2 的影响; B. 和芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 TNF- α 的影响)

Figure 4-3 Effect of *Paeonia lactiflora* pall. flower extract on LPS-induced inflammatory factor release in RAW 264.7 cells. (Effects of extracts for *Paeonia lactiflora* Pall. on IL-2 (A) and TNF- α (B) in LPS-induced RAW 264.7 cells)

4.4.4 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7细胞中ROS的影响

细胞在受到外界刺激时会产生活性氧（ROS）。过量产生 ROS 会导致脂质、蛋白质和 DNA 氧化损伤。这种损伤会促使循环巨噬细胞和中性粒细胞渗入损伤部位。活化和浸润的免疫细胞共同分离出肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）和白细胞介导的炎症反应。过量的 ROS 被认为在继发损伤的级联损伤中起着关键作用。LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞会产生过量的 ROS，而过量的 ROS 会导致细胞损伤。因此，研究芍药花提取物对细胞炎症的 ROS 抑制作用非常重要。如图 4-4 所示，LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生大量 ROS，随着芍药花提取物浓度的增加，细胞中的 ROS 逐渐减少，结果表明芍药花提取物能够抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中的 ROS。

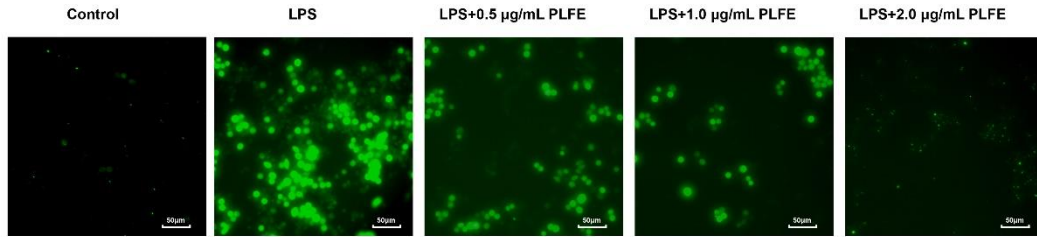


图 4-4 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞 ROS 的影响

Figure 4-4 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on ROS in RAW 264.7 cells induced by LPS

4.4.5 芍药花提取物对LPS诱导的RAW 264.7细胞凋亡的影响

细胞中过量的ROS会促进细胞炎症的产生，进而促进细胞凋亡。通过研究芍药花提取物对LPS诱导的细胞凋亡的影响，探讨了芍药花提取物对细胞的保护作用。结果如图 4-5所示，与空白组相比，LPS能够诱导RAW 264.7细胞产生凋亡并促进凋亡的发生。与模型组相比，芍药花提取物组能够显著抑制细胞凋亡的发生。

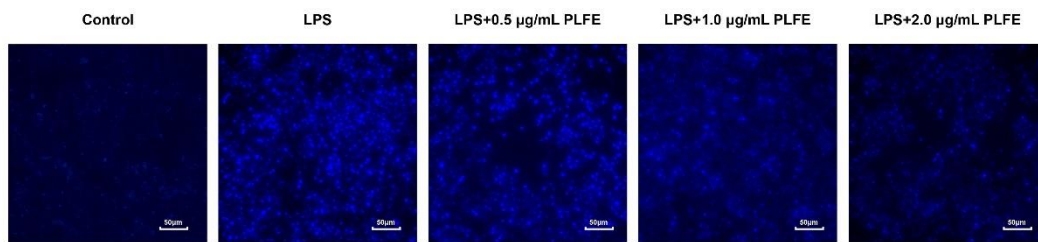


图 4-5 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞凋亡的影响

Figure 4-5 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on LPS-induced apoptosis in RAW 264.7 cells

4.4.6 Western blot法检测炎症信号通路相关蛋白的表达

结果如图 4-6 所示，与空白组相比，模型组中 P-IKK、NF- κ B、P-JNK、P-p38 蛋白表达显著升高($^{##}p<0.01$)；与模型组相比，芍药花提取物可显著降低 P-p38、P-JNK 和 NF- κ B 蛋白的表达 ($^{**}p<0.01$)。结果表明，芍药花提取物能够通过抑制炎症信号通路相关蛋白的表达从而抑制通路激活。

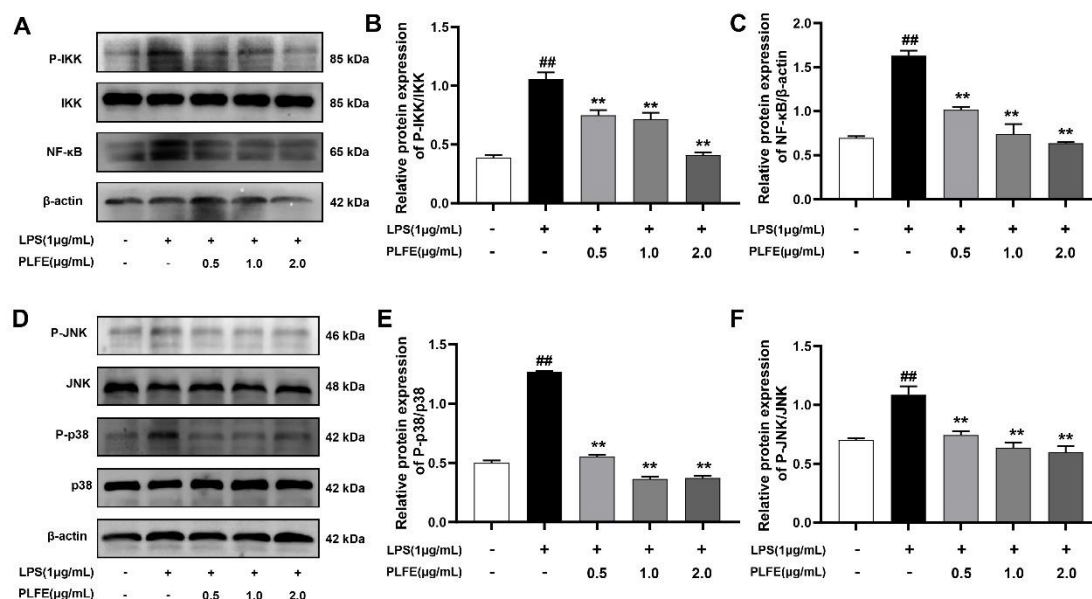


图 4-6 芍药花提取物对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症信号通路蛋白表达水平的影响
Figure 4-6 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on protein expression levels of inflammatory signaling pathway in LPS-induced RAW 264.7 cells

4.5 本章小结

本章研究主要结合网络药理学预测结果体外验证芍药花对皮肤炎症的干预作用的分子机制。利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞构建体外炎症模型，以芍药花提取物干预。结果显示，芍药花提取物对 RAW 264.7 细胞抑制的 $IC_{50}=14.3 \mu\text{g/mL}$ ，在 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 以下时，对细胞的毒性作用不明显，进一步提高药物浓度后，对细胞具有显著的抑制效果。芍药花能有效抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO、IL-2 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的释放。利用试剂盒检测芍药花对促炎因子 NO 和细胞炎症因子的干预作用抑制细胞炎症反应的发生，这可能是其发挥抗炎活性的原因之一。且芍药花还能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 ROS 的生成以及凋亡的发生，通过 Western Blot 结果显示芍药花能够抑制细胞中炎症信号通路的激活。综上所述，芍药花能够抑制细胞炎性物质的产生，抑制细胞炎症通路的激活以及 ROS 的生成和抑制凋亡的发生，展现出芍药花对细胞炎症具有显著的治疗作用。

第5章 芍药花提取物抑制大鼠皮肤损伤机制研究

5.1 引言

皮肤炎症，也称为皮肤病，是指皮肤因各种原因引起的一种炎性反应。皮肤炎症是由皮肤受到损伤后，伴随产生的一种生理反应。它可以由感染、过敏、创伤、自身免疫因素等引起，表现为皮肤发红、肿胀、发热、疼痛等症状。此外，皮肤炎症还可能伴有瘙痒、灼热感、鳞屑等症状。

皮肤炎症的发病机制尚不明确。研究显示，皮肤炎症的发生与炎症因子和炎症相关信号通路的激活密切相关。因此，从抑制炎症角度治疗皮肤炎症是目前主要的治疗手段。

目前治疗皮肤炎症的手段主要是通过糖皮质激素抑制皮肤炎症中信号通路的激活，然而激素类药物由于其本身的毒副作用大，耐药性等问题导致其在治疗相关疾病中难以应用。因此开发毒副作用小的药物成为目前发展的主流。

芍药花中含有丰富的化学成分。研究表明，芍药苷具有显著的抗炎活性。且因芍药花无毒，具有较高的食用价值，因此以芍药花为主要原料的抗炎药物具有重要的应用价值。

因芍药花对皮肤抗炎的研究鲜有报道，故为了充分挖掘芍药花的药用价值。本研究通过采用二硝基氟苯（DNFB）对皮肤表面刺激的方法建立大鼠炎症模型。在组织和分子的水平分别探究芍药花提取物对大鼠皮肤抗炎治疗作用，为进一步深入研究芍药花提取物对皮肤炎症的治疗效果和制备效果显著的成品药以及有效的采取合理临床用药的方式等提供实验依据。

5.2 实验材料和仪器

5.2.1 实验动物

实验用SPF级SD雌性大鼠，8周龄， 250 ± 40 g，购自常州卡文斯实验动物有限公司，动物许可证号：SCXK（苏）2021-0013。动物生活环境：12 h/12 h循环光照，室温 25 ± 2 °C，湿度55%~65%。自由饮食和饮水，一周更换2次清洁动物盒和垫料，一周更换3次动物饮用水。

5.2.2 实验试剂

表 5-1 实验试剂

Table 5-1 Experimental reagents

实验试剂	厂家
通用型抗体稀释液	苏州新赛美基因科技有限公司
HE 染色液	碧云天生物技术有限公司
甲苯胺蓝染色试剂盒	翼飞雪生物科技有限公司
TNF- α 试剂盒	翼飞雪生物科技有限公司
IL-1 β 试剂盒	翼飞雪生物科技有限公司

5.2.3 实验主要仪器

表 5-2 实验仪器

Table 5-2 Experimental Instruments

仪器设备	厂家
冷冻台式离心机	德国 Sartorius 公司
荧光正置生物显微镜	德国 Leica 公司
冰冻切片机	德国 Leica 公司
超纯水仪	德国 Sartorius 公司
立式超低温冰箱电泳仪	Bio-Rad 公司
水平摇床	沃德生物医学仪器公司
多功能酶标仪	TECAN

5.3 实验方法

5.3.1 样品溶液的制备

5.3.1.1 芍药花提取液的制备

方法同第 4 章 4.3.1 制备芍药花提取物。

5.3.1.2 凝胶的制备

取 0.2 g CMC-Na，加入 5 g 甘油研磨。待研磨充分后，根据分组不同，投入不同的芍药花提取物。空白组：加入纯水 20 mL；低剂量组则加入芍药花提取物 0.2 g 以及 20 mL 纯水；中剂量组加入芍药花提取物 0.3 g 以及 20 mL 纯水；

高剂量组加入芍药花提取物 0.4 g 和 20 mL 纯水。加入原料后再继续向一个方向研磨，直至其研磨成凝胶状，则可取出装瓶。

5.3.2 动物造模

5.3.2.1 分组

适应性饲养 7 天后。随机分为空白组、模型组、阳性药(地塞米松)对照组，低剂量组、中剂量组以及高剂量组，共六组，每组为八只。

5.3.2.2 刺激皮肤炎症

用剃刀将所有大鼠背部皮毛剔除干净，并将脱毛膏均匀涂抹于脱毛区域进行脱毛处理，脱毛区域约 3×3 cm。在脱毛后适应性喂养 1 d 进行首次致敏，使用 0.5% DNFB，对大鼠背部皮肤抹刺激。首次刺激 3 d 后进行第二次刺激，在大鼠皮肤和右耳，涂抹 0.2% DNFB 刺激。按照上述方法每周三次。以 SD 大鼠背部皮肤出现红肿、表皮脱落、鳞屑覆盖等表现为造模成功，其余时间正常饲养。

5.3.2.3 给药

激发 7 天后皮肤炎症模型稳定，开始进行给药，将制备的芍药花提取物均匀涂抹于致敏区域。空白组和模型组在背部涂抹空白基质；给药组分别在背部涂抹对应剂量的芍药花提取物制备的凝胶；阳性药组给予市售的地塞米松软膏进行干预。

5.3.2.4 样本采集及处理

给药 21 天后，取 SD 大鼠的背部致敏皮肤以及左右耳片称重。同时眼眶取血，室温静置析出血清后，于 4 °C，3500 rpm 离心 15 min。取上清置于 -80 °C 保存。打开腹腔摘取得到完整脾组织，并用生理盐水漂洗后置于，-80 °C 冷冻保存。

5.3.3 皮肤损伤观察

给药 21 天后，观察大鼠背部损伤情况。红斑、局部水肿、鳞屑状以及皮肤剥脱情况，进行观察和记录。

5.3.4 耳肿胀度与脾指数测定

大鼠麻醉后进行眼眶取血并脱颈处死，先根据耳廓基线取下大鼠的左右耳，再以 9 mm 打孔器在大鼠左右耳相同部位打下的耳片，将左右耳片进行统计称

量，并按照公式 5-1 计算耳肿胀度。

$$\text{耳肿胀度}(\%) = \frac{\text{右耳质量}(\text{g}) - \text{左耳质量}(\text{g})}{\text{左耳质量}(\text{g})} \times 100\% \quad (5-1)$$

同时，称取大鼠体重，并称取各组大鼠的脾脏质量，按照公式 5-2 计算免疫脏器指数。

$$\text{脾指数}(\%) = \frac{\text{脾脏质量}(\text{mg})}{\text{体重}(\text{g})} \times 100\% \quad (5-2)$$

5.3.5 皮肤组织病理切片观察

5.3.5.1 皮肤组织切片

取上述收集的大鼠背部皮肤组织制作冰冻切片。

(1) 提前打开切片机，预冷。

(2) 从-80℃冰箱取出大鼠皮肤组织。截取皮肤约 3×3 mm 大小的皮肤组织后，PBS 漂洗 2 遍，去除残留血渍。

(3) 在样品托上放置一层 OCT 包埋胶，放入速冻架中冷冻，制作样品冷冻底座。

(4) 将组织竖直放在已经做好的样品冷冻底座上，并覆盖 OCT 包埋胶直至组织完全包埋，放入速冻架速冻成型。

(5) 调整冰冻切片机切片厚度至 8 μm。

(6) 将包埋好样品的样品托固定在冰冻切片机上，开始对刀修片，直至切到组织样本后，停止切片，放下防卷板，开始切片。

(7) 利用手轮开始修片，直至接近刀口，停止修片，放下放卷板进行切片，贴片，并在显微镜下观察形态。

(8) 将切好的切片放入切片盒，最后放入-80℃冰箱，保存备用。

5.3.5.2 HE 染色

取上述切好的冰冻切片，按照以下方法进行 HE 染色。具体方法如下：

(1) 取出切好的皮肤组织切片，用 PBS 洗涤 3 次，每次 3min，去除组织表面包埋胶。

(2) 用 4%的多聚甲醛固定 20 min。

(3) 用蒸馏水洗涤 2 遍。

(4) 用苏木素染液覆盖皮肤组织，染色 3 min.

(5) 用蒸馏水洗涤 2 遍，去除表面多余染料。

(6) 用伊红染液覆盖皮肤组织，染色 1 min。

(7) 梯度脱水：首先浸入 55%酒精 15 秒，转移到 75%酒精 15 秒，转入 95%酒精 15 秒后，无水乙醇浸泡 15 秒后滴加中性树脂封片，后拍照。

5.3.5.3 甲苯胺蓝染色

取上述切好的冰冻切片，按照以下方法进行甲苯胺蓝染色。具体方法如下：

(1) 取出切好的皮肤组织切片，用 PBS 洗涤 3 次，每次 3min，去除组织表面包埋胶。

(2) 用甲苯胺蓝染液覆盖皮肤组织，染色 15 min.

(3) 用蒸馏水洗涤 2 min，去除表面多余染料。

(4) 梯度脱水：首先浸入 55%酒精 15 秒，转移到 75%酒精 15 秒，转入 95%酒精 15 秒后，无水乙醇浸泡 15 秒后滴加中性树脂封片，后拍照。

5.3.6 ELISA检测免疫炎症因子

检测方法同“4.3.5”所述检测方法，对大鼠血清进行检测。

5.3.7 Western blot法检测大鼠皮肤相关蛋白的表达

实验方法同“4.3.8”所述检测方法，对大鼠皮肤蛋白进行检测。

5.3.8 数据处理

统计学方法同“4.3.9”。

5.4 结果

5.4.1 芍药花提取物对大鼠背部皮肤皮损状况的影响

2,4-二硝基氟苯（DNFB）在动物造模中被用于动物皮肤炎症和过敏模型中。如图 5-1 所示，空白组大鼠背部皮肤呈淡红色，润滑光泽，富有弹性，且并未出现红斑和水肿。模型组大鼠背部造模区，皮肤粗糙，干燥，脱屑，有大块红斑出现。与空白组相比，模型组皮肤状况显著下降，提示皮肤炎症造模完成。给药组与模型组相比，大鼠背部皮损情况改善效果显著，脱屑、红斑、局部水肿、结痂等症状大幅下降，观察到大鼠背部皮损状况明显减轻。芍药花提取物含量越低，皮肤炎症损伤程度越严重，显示芍药花提取物对大鼠背部皮肤皮损状况

的影响呈剂量依赖性。

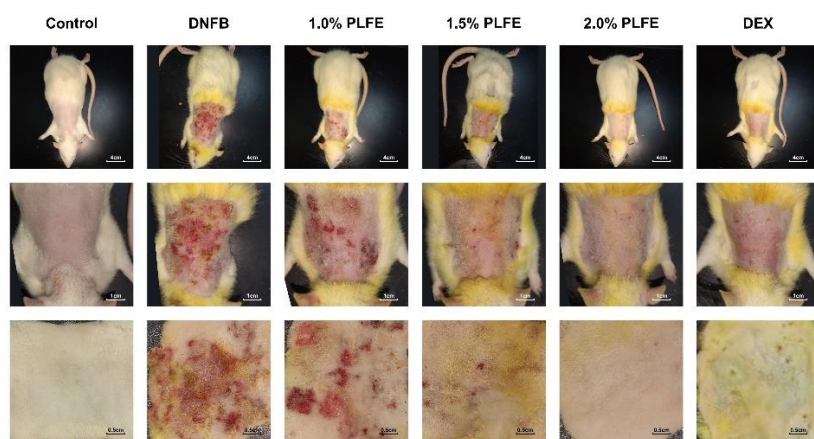


图 5-1 大鼠背部皮肤损伤情况

Figure 5-1 Skin damage on the back of rats

5.4.2 芍药花提取物对耳肿胀度与脾指数的影响

免疫脏器的指数在一定程度可反映机体免疫功能的强弱，以此可对芍药花提取物对大鼠皮肤炎症的治疗作用进行比较。如图 5-2 A 所示，与空白组相比，模型组大鼠的脾脏指数明显升高；给药组与模型组相比，可发现各给药组均可有效减少大鼠皮肤炎症模型的脾指数。芍药花提取物改善由 DNFB 引起的大鼠皮肤炎症的免疫反应。

耳肿胀度在一定程度上能够反应刺激性药物对皮肤的损伤反应。以此可直观反应芍药花提取物对大鼠皮肤炎症的干预作用。结果如图 5-2 B 所示，空白组与模型组相比，DNFB 能够显著诱导大鼠皮肤水肿，促进皮肤炎症的产生。而芍药花提取物能够显著抑制大鼠皮肤的进一步水肿。提示芍药花提取物能够改善大鼠皮肤炎症引发的皮肤水肿。

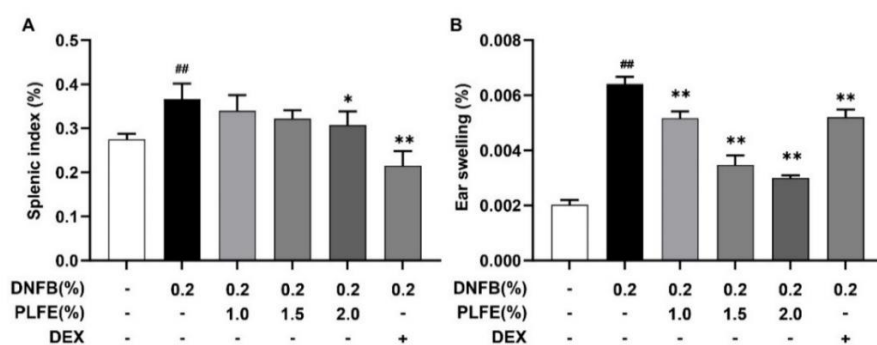


图 5-2 芍药花提取物对大鼠脾脏指数和耳肿胀度的影响。(A.芍药花提取物对大鼠脾指数影响；B.芍药花提取物对大鼠耳肿胀度的影响。)

Figure 5-2 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on splenic index and ear swelling in rats. (A. Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on splenic index in rats; B. Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. flower extract on ear swelling in rats.)

5.4.3 芍药花提取物对大鼠皮肤的影响

为了观察 DNFB 和芍药花提取物对大鼠皮肤的影响,采用 HE 染色观察大鼠皮肤结构。结果如图 5-3 所示,空白组大鼠皮肤结构完整,结构分界清晰,模型组大鼠皮肤角质层明显增生,有角化异常,表皮萎缩且有部分缺损,有结痂现象,可发现表皮上皮层的细胞明显变厚,炎性细胞的浸润也发生在皮下组织中。芍药花提取物低、中、高剂量组与阳性药组背部皮肤病变在显微镜下病变比较一致。但 DEX 组,可以观察到皮肤层次结构较为完整,表皮增厚不明显,未见明显角化不全以及角化过度也未见大量炎性细胞的浸润。

肥大细胞在皮肤炎症反应中具有重要意义,当皮肤受到损伤后,肥大细胞被激活并脱粒,进而释放组胺等物质,促进皮肤炎症和损伤的进一步发生。因此,通过甲苯胺蓝染色观察炎症皮肤中肥大细胞活化和脱粒情况。结果如图 5-4 所示,空白组大鼠皮肤中皮肤结构正常,甲苯胺蓝染色中未见肥大细胞。模型组中表皮角质增厚,皮肤结构紊乱,染色结果显示大鼠皮肤中有大量肥大细胞活化。与模型组相比,芍药花提取物能显著抑制皮肤炎症中肥大细胞的活化。其中低剂量组和中剂量组中可见少量肥大细胞激活,而高剂量组未见肥大细胞激活。结果提示,芍药花提取物能够抑制肥大细胞的活化和脱粒,从而抑制皮肤炎症的发展。

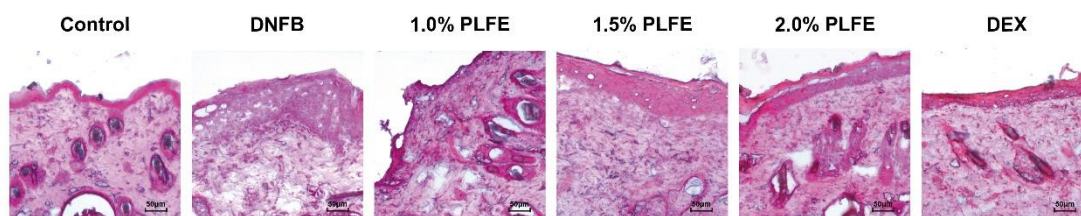


图 5-3 大鼠皮肤 HE 染色(200x)

Figure 5-3 Hematoxylin-eosin staining of rat skin(200x)

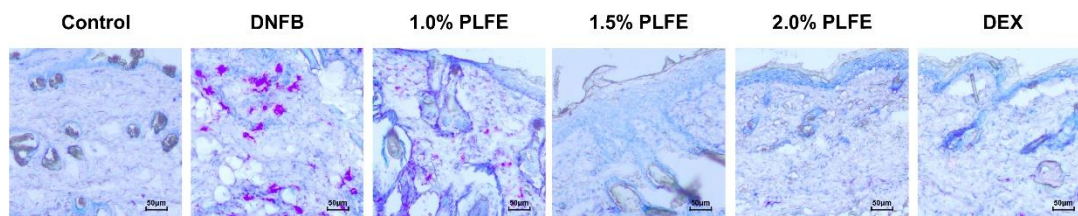


图 5-4 大鼠皮肤组织甲苯胺蓝染色(200x)

Figure 5-4 Toluidine blue staining of rat skin tissue(200x)

5.4.4 芍药花提取物对大鼠体内炎症因子的影响

结果如图 5-5,结果显示 DNFB 能够显著提高动物体内炎症因子水平。与空白

对照组相比, DNFB 组大鼠血清中炎症因子白介素 1β (IL- 1β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平大幅升高 ($^{##}P<0.01$); DNFB 组相比, 给药组大鼠血清中 IL- 1β 和 TNF- α 水平大幅下降 ($^{**}P<0.01$); 显示芍药花提取物能够通过调节大鼠体内炎症反应治疗大鼠皮肤炎症的发生和发展。

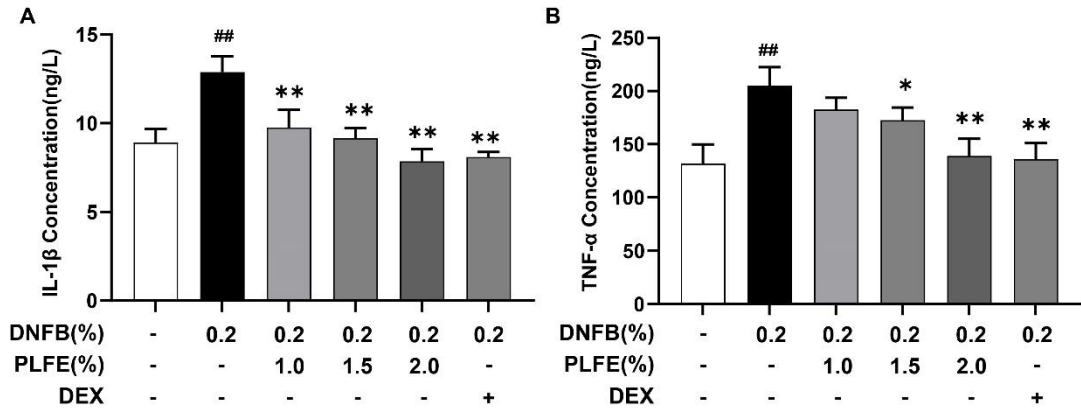


图 5-5 芍药花提取物对大鼠血清中炎症因子的影响。(A. 芍药花提取对大鼠血清中 IL- 1β 的影响; B. 芍药花提取对大鼠血清中 TNF- α 的影响。)

Figure 5-5 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on inflammatory factors in rat serum. (A. Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on IL- 1β in rat serum; B. Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on TNF- α in rat serum.)

5.4.5 Western blot法检测炎症信号通路相关蛋白的表达

与空白组相比较, 皮肤炎症模型组皮肤组织中的 P-p38、P-JNK 蛋白表达显著升高 ($^{##}p<0.01$); 与皮肤炎症模型组相比, 中剂量组和高剂量组芍药花提取物可显著降低 P-p38 和 P-JNK 蛋白的表达 ($^{**}p<0.01$)。结果表明, 芍药花提取物能够通过抑制 MAPK 信号通路相关蛋白的磷酸化从而抑制通路激活。

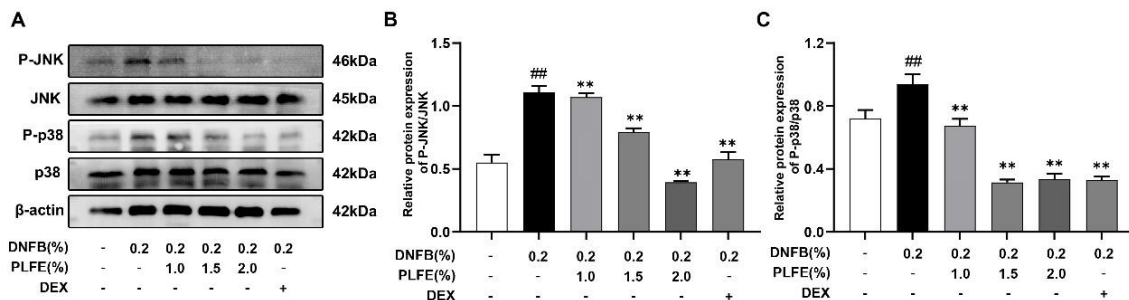


图 5-6 芍药花提取物对大鼠皮肤 MAPK 信号通路蛋白表达水平的影响

Figure 5-6 Effect of *Paeonia lactiflora* Pall. extract on the protein expression level of MAPK signaling pathway in rat skin

5.5 本章小结

在本研究中, 采用 DNFB 作为致敏剂, 建立大鼠皮肤炎症模型。以地塞米松

作为阳性药对照组，并选用芍药花提取物 1.0%、1.5%、2.0%三种浓度的给药组，对芍药花提取物抗皮肤炎症作用进行初步的探究。皮肤炎症模型大鼠在芍药花提取物作用下，其皮损状况明显改善、脾指数和耳肿胀率明显降低。与 DNFB 诱导组相比较，其表皮结构损伤明显改善，能够抑制肥大细胞激活，且随着芍药花提取物浓度的增加，显示出剂量依赖性改善效果。同时芍药花能够抑制大鼠血清中炎症因子的表达，并抑制 MAPK 信号通路的激活。这些结果表明芍药花提取物可以抑制皮肤水肿，减轻皮肤炎症大鼠的炎症反应达到治疗皮肤炎症的作用。

第6章 结论及展望

6.1 结论

本研究以芍药花为主要研究对象，研究生芍药花对皮肤炎症的干预作用。首先，以液质联用技术和高效液相分析检测芍药花中的物质成分，为芍药花资源开发提供物质基础。结合芍药花物质基础，以网络药理分析为手段，分析芍药花对皮肤炎症的潜在作用机制，同时利用体内外实验验证芍药花对皮肤炎症的干预作用。结果显示，芍药花中含有丰富的生物活性物质，利用质谱解析分析出 36 个物质成分，利用 HPLC 对其中 7 个主要物质成分进行定量。同时利用网络药理学分析芍药花活性成分与皮肤炎症的潜在作用机制。结果显示，芍药花与 TNF、AKT1、IL-6、STAT3、IL-1 β 、JUN、MAPK3、STAT1 等靶点密切相关，与 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、cAMP 信号通路等密切相关。体外细胞研究结果显示芍药花能够通过抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 NO、IL-2 和 TNF- α 的释放，且芍药花还能剂量依赖性的抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞的 ROS 以及凋亡的发生，通过 Western Blot 结果显示芍药花能够抑制细胞中炎症信号通路的激活，展现出芍药花对细胞炎症具有显著的治疗作用。体内研究结果显示芍药花能够抑制皮肤炎症模型大鼠在芍药花提取物作用下，其皮损状况明显改善、脾指数和耳肿胀率明显降低。能够抑制皮肤中肥大细胞激活，且随着芍药花提取物浓度的增加，显示出剂量依赖性改善效果。同时芍药花能够抑制大鼠血清中炎症因子的表达，并抑制 MAPK 信号通路的激活。这些结果表明芍药花提取物可以抑制皮肤水肿，减轻皮肤炎症大鼠的炎症反应达到治疗皮肤炎症的作用。

6.2 展望

基于芍药花开发中草药制剂，为皮肤炎症开发毒副作用小的制剂。它不仅可以促进芍药花资源开发，而且还能为皮肤炎症的治疗提供新的治疗方案。

芍药是一种常见的中草药，被广泛用于中医药治疗各种疾病。其中，芍药花具有抗炎、抗菌、抗氧化等多种药理作用，可用于治疗皮肤炎症等皮肤疾病。随着人们对健康生活方式和自然疗法的重视，植物药物治疗将成为一种重要的

趋势。芍药花作为一种天然草药，无毒副作用，对皮肤炎症患者来说是一种安全有效的治疗选择。通过外用途径，芍药花能够帮助患者改善皮肤炎症症状，提高生活质量。未来芍药花在治疗皮肤炎症方面的应用前景广阔，将成为一种重要的天然疗法手段。通过深入研究其活性成分及药理作用机制，加强与现代医学的结合，芍药花具有重要的发展前景。

参考文献

- [1] Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, et al. The immunological anatomy of the skin[J]. Nature Reviews Immunology, 2019, 19(1): 19-30.
- [2] Grice E A, Segre J A. The skin microbiome[J]. Nature reviews. Microbiology, 2011, 9(4): 244-253.
- [3] Flohr C, Hay R. Putting the burden of skin diseases on the global map[J]. British Journal of Dermatology, 2021, 184(2): 189-190.
- [4] Wong R, Geyer S, Weninger W, et al. The dynamic anatomy and patterning of skin[J]. Experimental Dermatology, 2016, 25(2): 92-98.
- [5] Chen Y, Feng X, Meng S. Site-specific drug delivery in the skin for the localized treatment of skin diseases[J]. Expert Opinion on Drug Delivery, 2019, 16(8): 847-867.
- [6] Shutova M S, Boehncke W-H. Mechanotransduction in Skin Inflammation[J]. Cells, 2022, 11(13): 2026.
- [7] Styrzewska M, Zuk M, Boba A, et al. Use of Natural Components Derived from Oil Seed Plants for Treatment of Inflammatory Skin Diseases[J]. Current Pharmaceutical Design, 2019, 25.
- [8] 向浩瑜. 文氏皮炎酊治疗局限型神经性皮炎（风湿蕴肤证）的疗效观察[D]. 成都: 成都中医药大学, 2022.
- [9] 李思漫, 王谊, 任孟月. 中药复方外用治疗皮肤病的研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(1): 127-132+142.
- [10] 洪关婷, 梁磊, 王一琼, 等. 中药调节肠道微生态治疗抗生素相关性腹泻的研究进展[J]. 中国肛肠病杂志, 2023, 43(11): 76-80.
- [11] 邓昕, 王丽, 周淑娟. 抗菌药不良反应及不合理用药因素分析[J]. 中国合理用药探索, 2021, 18(3): 21-25.
- [12] 徐君, 俞蕙. 儿科抗真菌药物的合理使用[J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37(6): 436-444.
- [13] 李邻峰. 抗组胺药治疗皮炎湿疹类皮肤病临床应用专家共识[J]. 中华全科医学, 2021, 19(5): 709-712.
- [14] 付璐, 朱彦, 王哲, 等. 中医皮肤病经典古籍源流梳理与文本分析[J]. 中医学报, 2020, 35(2): 429-432.
- [15] 叶佳慧, 张悦, 黄梦婷, 等. 抗炎活性单方中草药的免疫活性研究现状[J]. 海峡药学, 2021, 33(2): 40-45.
- [16] 李金鸽, 胡丞丞, 付培蕾, 等. 21 种中药提取物体外抗菌活性研究[J]. 工业微生物, 2024, 54(1): 63-66.
- [17] 雷杰豪, 许爱娥. 中草药黄酮类提取物对白癜风抗氧化应激作用机制的研究进展[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2018, 17(3): 281-284.
- [18] 李思漫, 王谊, 任孟月. 中药复方外用治疗皮肤病的研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2024, 40(1): 127-132+142.
- [19] 李周阳, 吴威, 李威莹, 等. 中药治疗湿疹的现代研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(11): 1564-1576.

- [20] 任璐, 刘彬. 基于网络药理学探讨中药金银花治疗痤疮的作用机制[J]. 中医临床研究, 2022, 14(32): 118-122.
- [21] 成佳蓉, 史丙俊, 毛涵, 等. 中医外治法治疗银屑病的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44(8): 98-102.
- [22] 苏圆圆, 王雪艳, 李成林, 等. 中药中黄酮类化合物的药理药效研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(6): 42-46.
- [23] Zeng H, Zhao B, Zhang D, et al. *Viola yedoensis* Makino formula alleviates DNCB-induced atopic dermatitis by activating JAK2/STAT3 signaling pathway and promoting M2 macrophages polarization[J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154228.
- [24] Wang Y, Tan L, Jiao K, et al. Scutellarein attenuates atopic dermatitis by selectively inhibiting transient receptor potential vanilloid 3 channels[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2022, 179(20): 4792-4808.
- [25] Hou D-D, Zhang W, Gao Y-L, et al. Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 74: 105676.
- [26] 汤玉, 王起成, 毛文倩, 等. 丹参在银屑病中的临床应用及机制研究进展[J]. 江西中医药, 2022, 53(7): 69-72.
- [27] Yang Y, Sun M, Li S, et al. Germplasm resources and genetic breeding of *Paeonia*: a systematic review[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 107.
- [28] Chiu Y-J, Lin C-H, Lee M-C, et al. Formulated Chinese medicine Shaoyao Gancao Tang reduces NLRP1 and NLRP3 in Alzheimer's disease cell and mouse models for neuroprotection and cognitive improvement[J]. *Aging*, 2021, 13(11): 15620-15637.
- [29] 周学刚. 白芍种质资源的初步评价及传粉生物学研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [30] 徐峰, 王涛, 余玲, 等. 芍药晒干过程中有效化学成分及其抗氧化能力变化[J]. 植物科学学报, 2017, 35(5): 783-789.
- [31] 王爱晶. 芍药花红色素稳定性研究及应用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [32] 蒋雨晗. 药用白芍优良种质资源的筛选研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [33] 张腾腾, 张梦娇, 王婉婷, 等. 高效液相色谱法测定不同品系亳白芍中 4 种化学成分含量[J]. 生物化工, 2020, 6(4): 21-24.
- [34] 宁传龙. 芍药籽油重要功能营养成分分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [35] 陈曼丽. 芍药花抗氧化和抗炎活性成分的提取与分离[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
- [36] 李雯霞, 于司达, 诸葛斌, 等. 芍药花提取物对果蔬腐败菌的抑菌活性及其在樱桃番茄保鲜中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(2): 228-232.
- [37] 李海亮, 高星, 徐福利, 等. 芍药花精油化学成分及其抗氧化活性[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(5): 204-210.
- [38] Wang X, Hao J C, Shang B, et al. Paeoniflorin ameliorates oxidative stress in Glutamate-stimulated SY5Y and prenatally stressed female offspring through Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2021, 294: 189-199.
- [39] 陈乃东, 黄成, 夏青阳, 等. 亳芍多糖的积累规律及其单糖组成 GC-MS 分析

- [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(8): 1349-1356.
- [40] 郑伟颖, 俞志刚, 陈延辉, 等. HS-SPME/GC-MS 法分析 5 个不同品种芍药花挥发性成分[J]. 化学研究与应用, 2016, 28(3): 355-359.
- [41] 舒希凯, 段文娟, 刘伟, 等. 芍药花化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(1): 66-69.
- [42] 尚盼盼. 不同品种芍药花瓣和侧蕾营养及活性成分研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [43] 花艳敏. 芍药花瓣营养品质分析研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [44] 于红卫. 芍药的历史文化及其价值[J]. 河南农业, 2020(25): 13.
- [45] 宋雨蓬, 马书燕, 李玉鹏, 等. 基于观赏特性的芍药切花优良品种筛选[J]. 山东林业科技, 2022, 52(02): 81-86.
- [46] 石钰. 探讨芍药花精油化学成分及其抗氧化活性[J]. 人人健康, 2019(7): 39.
- [47] 俞憬, 陈冠林, 杨璐齐, 等. 芍药花多酚的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(7): 38-44.
- [48] 钟培星. 芍药花瓣类黄酮成分分析及其对花色的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [49] 俞憬, 陈冠林, 杨璐齐, 等. 芍药花多酚的纯化及其抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(7): 38-44.
- [50] 花艳敏. 芍药花瓣营养品质分析研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2015.
- [51] 赵香菊, 黄秀奇, 王中华. 芍药花多酚提取物对蛋鸡生产性能和抗氧化能力的影响[J]. 中国家禽, 2018, 40(18): 60-62.
- [52] 康耀祖. 芍药的繁殖栽培管理技术[J]. 现代园艺, 2020, 43(17): 95-96.
- [53] 尤斯涵, 殷宏艳, 杨宋蕊, 等. 液质联用技术在中药化学成分中的研究进展[J]. 神经药理学报, 2023, 13(4): 8-12.
- [54] Gogichaeva N V, Alterman M A. Amino Acid Analysis by Means of MALDI TOF Mass Spectrometry or MALDI TOF/TOF Tandem Mass Spectrometry[J]. Amino Acid Analysis, 2019, 2030: 17-31.
- [55] Liu G, Dong J, Wang H, et al. ESI Fragmentation Studies of Four Tea Catechins[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2009, 30(08): 1566-1570.
- [56] Xiao C, Wu M, Chen Y, et al. Revealing Metabolomic Variations in Cortex Moutan from Different Root Parts using HPLC-MS method: Metabolomic Variations in Cortex Moutan from Different Root Parts[J]. Phytochemical Analysis, 2015, 26(1): 86-93.
- [57] CHENG M, ZHANG Y, ZHAO D, et al. Composition Analysis of Flavonols and Their Glycosides in Yellow Flowers of Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Cultivars[J]. Natural Product Research and Development, 2018, 30(08): 1340-1345.
- [58] Yin N-W, Wang S-X, Jia L-D, et al. Identification and Characterization of Major Constituents in Different-Colored Rapeseed Petals by UPLC-HESI-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11053-11065.
- [59] Valiyeva A, Felegyi-Tóth C A, Várnai B, et al. Characterization of alkaloid profile of *Hyoscyamus reticulatus* L. and *Atropa belladonna* subsp. *caucasica* (Kreyer) Avet by LC-MS and NMR[J]. Natural Product Research, 2022: 1-6.
- [60] Khlifi R, Dhaouefi Z, Toumia I B, et al. Erica multiflora extract rich in quercetin-

- 3-O-glucoside and kaempferol-3-O-glucoside alleviates high fat and fructose diet-induced fatty liver disease by modulating metabolic and inflammatory pathways in Wistar rats[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 86: 108490.
- [61] LI X, GUO Y, QIN X, et al. Analysis of chemical components and action mechanism of tartary buckwheat vinegar beverage based on UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *China Brewing*, 2023, 42(02): 59-68.
- [62] Bai Z-Z, Tang J-M, Ni J, et al. Comprehensive metabolite profile of multi-bioactive extract from tree peony (*Paeonia ostii* and *Paeonia rockii*) fruits based on MS/MS molecular networking[J]. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 2021, 148: 110609.
- [63] Tsetegho Sokeng A J, Sobolev A P, Di Lorenzo A, et al. Metabolite characterization of powdered fruits and leaves from *Adansonia digitata* L. (baobab): A multi-methodological approach[J]. *Food Chemistry*, 2019, 272: 93-108.
- [64] Ge Y, Bian X, Sun B, et al. Dynamic Profiling of Phenolic Acids during Pu-erh Tea Fermentation Using Derivatization Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Approach[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(16): 4568-4577.
- [65] ZHANG T, QIN Y, WANG P, et al. Screening and mechanism analysis of active components of Moutan Cortex in treatment of chronic nephritis based on UHPLC-QTOF-MS/MS and TCMIP[J]. 2022, 53(09): 2756-2767. .
- [66] Duan H, Wang W, Li Y, et al. Identification of phytochemicals and antioxidant activity of *Premna microphylla* Turcz. stem through UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131482.
- [67] Luo N, Ding W, Wu J, et al. UPLC-Q-TOF/MS Coupled with Multivariate Statistical Analysis as a Powerful Technique for Rapidly Exploring Potential Chemical Markers to Differentiate between *Radix Paeoniae Alba* and *Radix Paeoniae Rubra*[J]. *Natural Product Communications*, 2013, 8(4): 1934578X1300800.
- [68] Wu Y, Jiang Y, Zhang L, et al. Chemical Profiling and Antioxidant Evaluation of *Paeonia lactiflora* Pall. “Zhongjiang” by HPLC–ESI–MS Combined with DPPH Assay[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2021, 59(9): 795-805.
- [69] Iqbal Y, Ponnampalam E N, Suleria H A R, et al. LC-ESI/QTOF-MS Profiling of Chicory and Lucerne Polyphenols and Their Antioxidant Activities[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(6): 932.
- [70] Mu H, Zhu Jingbo, Ding Y, et al. Analysis on chemical constituents of *Paeonia lactiflora* Pall. by UPLC /Q-TOF-MS[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2013, 32(07): 113-117.
- [71] Xiao C, Wu M, Chen Y, et al. Revealing Metabolomic Variations in Cortex Moutan from Different Root Parts using HPLC-MS method: Metabolomic Variations in Cortex Moutan from Different Root Parts[J]. *Phytochemical Analysis*, 2015, 26(1): 86-93.
- [72] Deshpande S, Matei M F, Jaiswal R, et al. Synthesis, Structure, and Tandem

- Mass Spectrometric Characterization of the Diastereomers of Quinic Acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7298-7306.
- [73] Chbani M, Matthäus B, Charrouf Z, et al. Characterization of Phenolic Compounds Extracted from Cold Pressed Cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) Seed Oil and the Effect of Roasting on Their Composition[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2020, 9(8): 1098.
- [74] Denzel K, Schilling G, Gross G G. Biosynthesis of gallotannins. Enzymatic conversion of 1,6-digalloylglucose to 1,2,6-trigalloylglucose[J]. Planta, 1988, 176(1): 135-137.
- [75] Cao S, Ranarivelo L, Ratsimbason M, et al. Antiplasmodial Activity of Compounds from *Sloanea rhodantha* (Baker) Capuron var. *rhodantha* from the Madagascar Rain Forest[J]. Planta Medica, 2006, 72(15): 1438-1440.
- [76] Seo C-S, Lee M-Y. Simultaneous Determination of Fourteen Marker Compounds in the Traditional Herbal Prescription, Geumgwesingihwan, Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry[J]. Molecules, 2022, 27(12): 3890.
- [77] Ujiie A, Hasebe H, Chiba Y, et al. Simultaneous determination of 7 kinds of preservatives and saccharin in foods with HPLC, and identification with LC/MS/MS[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2007, 48(6): 163-169.
- [78] Spolski R, Li P, Leonard W J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy[J]. Nature Reviews. Immunology, 2018, 18(10): 648-659.
- [79] Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing[J]. Forensic Science International, 2010, 203(1-3): 93-98.
- [80] Doma E, Rupp C, Baccarini M. EGFR-ras-raf signaling in epidermal stem cells: roles in hair follicle development, regeneration, tissue remodeling and epidermal cancers[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(10): 19361-19384.
- [81] Hammouda M B, Ford A E, Liu Y, et al. The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer[J]. Cells, 2020, 9(4): 857.
- [82] Jinlian L, Yingbin Z, Chunbo W. p38 MAPK in regulating cellular responses to ultraviolet radiation[J]. Journal of Biomedical Science, 2007, 14(3): 303-312.
- [83] 陈志强, 张意林, 洪靖, 等. 经典名方真武汤中芍药功效考[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 46(01): 1-6.
- [84] 吴昊, 努兰·拜都拉, 刘琳玉, 等. 没食子酸对人食管癌 TE-1 细胞的体外抑制作用及其机制[J]. 中国药房, 2022, 33(12): 1448-1454.
- [85] 申娜, 骆树瑜, 乔晓丞, 等. 没食子酸对过敏性鼻炎小鼠的抗过敏作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(05): 409-412.
- [86] 黄富文, 吴文钦, 何银英, 等. 芍药苷对糖尿病大血管病变模型小鼠的干预作用[J]. 岭南急诊医学杂志, 2022, 27(02): 105-107+111.
- [87] 严伟伟, 李国辉, 贾仰民, 等. 芍药苷对醋酸铅诱导海马神经元凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(6): 730-737.
- [88] Xiang Y, Zhang Q, Wei S, et al. Paeoniflorin: a monoterpene glycoside from

-
- plants of Paeoniaceae family with diverse anticancer activities[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 72(4): 483-495.
- [89] Li L, Wang H, Zhao S, et al. Paeoniflorin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation via SIRT1/FOXO1a/SOD2 signaling in rats[J]. *Phytotherapy Research*, 2022, 36(6): 2558-2571.
- [90] Xu Y, Tang G, Zhang C, et al. Gallic Acid and Diabetes Mellitus: Its Association with Oxidative Stress[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(23): 7115.
- [91] Zhang L, Wei W. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of paeoniflorin and total glucosides of paeony[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2020, 207: 107452.
- [92] Reich K, Kabashima K, Peris K, et al. Efficacy and Safety of Baricitinib Combined With Topical Corticosteroids for Treatment of Moderate to Severe Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial[J]. *JAMA dermatology*, 2020, 156(12): 1333-1343.
- [93] Kaul A, Gordon C, Crow M K, et al. Systemic lupus erythematosus[J]. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2016, 2: 16039.

攻读硕士学位期间研究成果

- [1] Yuan Chen, Han Li, Xinlian Zhang, Wei Wang, Marwan M.A. Rashed, Hong Duan, Lili Li, Kefeng Zhai. Exploring the anti-skin inflammation substances and mechanism of *Paeonia lactiflora* Pall. Flower via network pharmacology-HPLC integration[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155565.
- [2] 刘慧琴, 陈远, 刘心雨, 郑梦晴, 段红, 翟科峰. 基于 HPLC-DAD 和网络药理学研究油菜蜂花粉中黄酮类成分及其抗氧化靶点预测分析[J]. *凯里学院学报*, 2022, 40(6): 28-36.
- [3] 翟科峰, 段红, 计宇航, 陈圣雄, 王鑫, 李晗, 吕佳敏, 汪威, 陈远. 中华传统食材丛书·野菜卷(上下册) [M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2022, ISBN 978-7-5650-5115-9.

致谢

“我们终将上岸，阳光万里”。伴随着 2021 年 9 月开学的进行，我的研究生生涯开启了新的征程。三年来，无数次的组会，无数次的“收到”，去杭州、北京参加国际会议，这些磨练与提升让我更加坚毅、抗压、有能力的一名研究生。我收获颇多，在跟随导师的脚步中，参与编撰了《野菜卷》专著，我因此也为自己自豪。但也要脚踏实地，懂得感恩。

“知遇之恩，当涌泉相报”。在研究生的征途中，我最要感谢我的恩师翟科峰教授，在我人生迷茫的道路上，给我指引了一条“去读个研吧！”道路。如果没有翟教授，我可能一辈子也不会踏入硕士门槛。短短的三年，如白驹过隙，在翟教授的亲手教导下，我学会了扎实的专业技术和累积了一定的学术能力。从细胞到动物，从中草药的提取到成分分析，从纵向项目到横向项目，这些锻炼都让我不断成长，我相信在今后的道路上，学会的技术足够让我披荆斩棘。

“春晖寸草，难以回报”。只是站在父母的肩，见识了他们从未见过的繁华。感谢父母让我衣食无忧，无惧人海，让我可以专注于学术，专注于科研，成为了家里的第一个研究生，没有他们的无私付出，我不可能行路至此。

文章的最后，我更要谢谢我的女朋友黄茜琳无条件的陪伴、信任与支持，谢谢我的师兄、师姐对我学习路上的指点与改正，谢谢我的同门（李晗）、师弟、师妹（周婧、李杰、沈天赐）对我平时生活的诸多照顾，谢谢我自己！愿未来，我可以无畏风雨，勇往直前！