

不同方法提取的芹菜子挥发油的 GC-MS 分析及其抗肝纤维化作用

谯明¹, 杨建华², 朱毅², 任春晖¹, 胡君萍^{1*} (1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 分析比较 2 种不同方法提取的挥发油对 TGF- β 1 诱导的 HSC-LX2 增殖和肝纤维化指标的影响。方法 分别采用索氏提取法和水蒸气蒸馏法提取芹菜子挥发油, 通过 GC-MS 对其挥发油成分进行分析, 实验数据通过主成分分析法进行综合评价。CCK-8 法检测 2 种方法提取的芹菜子挥发油对 TGF- β 1 诱导的 HSC-LX2 增殖的影响; 酶联免疫吸附法测定 HSC-LX2 细胞上清液中肝纤维化指标人层粘连蛋白、人透明质酸、III 型前胶原肽含量。结果 索氏提取法提取的挥发油成分共鉴定出 36 种, 水蒸气蒸馏法为 26 种, 其中共有成分 13 种。CCK-8 法结果显示索氏提取法提取的芹菜子挥发油对 TGF- β 1 诱导的 HSC-LX2 增殖抑制作用强于水蒸气蒸馏法。酶联免疫吸附法测得水蒸气蒸馏和索氏提取的芹菜子挥发油高剂量组细胞上清液中肝纤维化指标, 与模型组相比含量显著性降低($P < 0.01$), 而索氏提取法组肝纤维化指标更接近于阴性对照组的正常细胞。主成分分析结果显示, 选用第一个作为主成分, 包含原指标 95.277% 信息量, 芹菜子挥发油中 2-丁炔基-1,4-二醇基双醋酸酯、5-甲基-1-己醇、2,5-二氢-1-亚硝基吡咯、2-羟基-反式环己甲腈、2-甲基-1,6-庚二烯这几个成分对抗肝纤维化作用贡献比较大。结论 2 种方法提取的芹菜子挥发油在类别和含量上存在较大差异, 体外抗肝纤维化作用强弱也有所不同, 为后续深入研究芹菜子挥发油成分及其抗肝纤维化机制奠定基础。

关键词: 芹菜子; 提取方法; 气质联用; 主成分分析; 肝纤维化

中图分类号: R917.101; R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)21-2625-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.21.001

引用本文: 谯明, 杨建华, 朱毅, 等. 不同方法提取的芹菜子挥发油的 GC-MS 分析及其抗肝纤维化作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2625-2632.

GC-MS Analysis and Anti-hepatic Fibrosis Effect of Volatile Oil from Celery Seed by Different Extraction Methods

QIAO Ming¹, YANG Jianhua², ZHU Yi², REN Chunhui¹, HU Junping^{1*} (1.College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze and compare volatile oils from celery seed by different extraction methods and their effects on proliferation of HSC-LX2 induced by TGF- β 1. **METHODS** The volatile oils were extracted by Soxhlet extraction method and steam distillation, their volatile oils were identified by gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS), and experimental data were comprehensively evaluated by using principal component analysis(PCA). CCK-8 assay was used to detect the effect of volatile oil from celery seed by different extraction methods on proliferation of HSC-LX2 induced by TGF- β 1. Determination of laminin, hyaluronic acid and type III procollagen peptide in hepatic fibrosis indicators of HSC-LX2 cells by enzyme-linked immunosorbent assay. **RESULTS** Thirty-six kinds of volatile oils extracted by Soxhlet extraction method were separated and identified, while there were twenty-six kinds of volatile oils extracted by steam distillation. There were thirteen volatile oils in common. CCK-8 method showed that the volatile oil of celery seed extracted by Soxhlet extraction method had a stronger inhibitory effect on proliferation of HSC-LX2 induced by TGF- β 1 than that by steam distillation. The hepatic fibrosis indicators in the cell supernatant of high-dose volatile oil from celery seed extracted by steam distillation and Soxhlet extraction method was significantly reduced compared with the model group ($P < 0.01$), while the hepatic fibrosis index of Soxhlet extraction method group was closer to that of the negative control group. PCA results showed that the first one was selected as the main component, containing 95.277% information of the original index. 2-butyne-1,4-diol diacetate, 5-methyl-1-hexanol, 2,5-dihydro-1-nitroso pyrrole, 2-hydroxy-trans-cyclohexanonitrile and 2-methyl-1,6-heptadiene were contributed to anti-hepatic fibrosis a lot. **CONCLUSION** The volatile oil extracted from celery seed by the two methods has great differences in type and content, and the anti-hepatic fibrosis effect is also different *in vitro*, which lays a foundation for further study on the volatile oil

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560688)

作者简介: 谯明, 女, 博士生 Tel: 15099183961 E-mail: 1532527694@qq.com *通信作者: 胡君萍, 女, 博士, 教授 Tel: 13899853561 E-mail: 89229613@qq.com

of celery seed and its anti-hepatic fibrosis mechanism.

KEYWORDS: celery seed; extraction methods; GC-MS; principal component analysis(PCA); hepatic fibrosis

新疆维药芹菜(乌拉盖)系伞形科植物欧芹 *Petroselinum crispum*, 以子和根入药, 维医认为其性干热, 具有健脑安神、活血痛经、祛风除湿之功能, 常用于头晕头痛、四肢麻木、高血压、清胃中浊液和风湿病症^[1], 成为护肝布祖热颗粒、复方木尼孜其颗粒、纳气祖帕蜜膏、玛吾力吾苏利颗粒、复方祖帕糖浆和肝保康颗粒等多种维成药制剂的主要药味。芹菜子的维吾尔语药物名为 Karapshe uruke, 阿拉伯语为 Tuhumi, 是伞形科植物旱芹 *Apium graveolens* L. 的干燥成熟果实^[2]。我国各地均有栽培, 国外欧洲、亚洲其他区域、非洲及美洲亦有分布。芹菜子除含有丰富的营养元素外, 还含有多种具生理活性的物质, 主要包括不饱和脂肪酸、类黄酮物质、丁基苯酞类、氨基酸、膳食纤维、香豆素衍生物、挥发油化合物等多种物质^[3-4]。目前研究表明芹菜子具有多种药理活性, 芹菜子多肽和芹菜素具有抗氧化活性^[5-6]; 芹菜子粗提物具有抑制植物病原真菌的作用^[7]; 黄酮类化合物具有降压安神、保护血管和增强免疫等功效^[8]。芹菜子油系芹菜的种子经提取所得的挥发油, 具有降血压和中枢镇静作用。现代药理试验证明, 它能对抗小鼠多种因素所致的惊厥, 有抗癫痫作用。由于其良好的药用价值, 对芹菜子挥发油的成分进行了系统研究, 从中分析和鉴定了苯酞衍生物、香豆素类、黄酮及其苷类等 40 几种化合物, 并分离得到了芹菜甲素(3-正丁基苯酞)和芹菜乙素(3-正丁基-4,5-二氢苯酞), 挥发油中主要成分正丁基苯酞作为芹菜子中药理活性成分, 除了能够治疗局部缺血的脑血管疾病, 还能够改善微循环, 抑制细胞凋亡和降低氧化性应激, 目前已经被开发成脑血管疾病领域的国家一类新药^[9-10]。

不同的提取方法对提取物化学成分有很大影响。水蒸气蒸馏法^[11-14]为常用的挥发油提取方法, 操作简便; 索氏提取法^[15-16]利用溶剂回流和虹吸原理, 使固体物质每一次都能为纯的溶剂所萃取, 所以萃取效率较高。故本研究将采用水蒸气蒸馏法和索氏提取法提取芹菜子挥发油, 通过 GC-MS 分析比较不同方法提取的芹菜子挥发油种类和含量的差异, 实验数据通过主成分分析进行综合评价; CCK-8 法检测不同方法提取的芹菜子挥发油

对转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)诱导的 HSC-LX2 增殖的影响; 酶联免疫吸附法检测 HSC-LX2 细胞上清液中肝纤维化指标人层黏连蛋白、人透明质酸、III 型前胶原肽含量, 为芹菜子后续的研究开发奠定基础。

1 仪器与试剂

Quattro microTM GC-MS 联用仪(美国 Waters 公司), 色谱柱为 DB-5MS 毛细石英管柱(30 m $\times$ 250 mm, 0.25 μ m); Galaxy 170R 型 CO₂ 细胞培养箱、HERA SAFE KS 超净工作台、Motic AE31 倒置荧光显微镜(美国 Thermo Scientific); 3-18K 型离心机(美国 Sigma); Multiskan Go 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher); 挥发油提取器、索氏提取器均来自上海市实验仪器总厂。

芹菜子(新疆麦迪森维药有限公司饮片厂, 批号: Z30142203); 复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司, 批号: 20171006); HSC-LX2 细胞株由新疆医科大学第一附属医院科技楼细胞实验中心提供; TGF- $\beta 1$ (美国 Novoprotein, 批号: 0506S354); CCK-8 试剂盒(北京 Solarbio, 批号: CA1210); 人透明质酸试剂盒(批号: H141)、人层粘连蛋白试剂盒(批号: H148)、人 III 型前胶原肽试剂盒(批号: H212)均购自上海江莱生物有限公司; 牛胎血清(美国 Gibco, 批号: 41F3013K); DMEM(高糖)培养基(批号: JI30022)、PBS 缓冲液(1 $\times$)(批号: SH30256)、0.25%胰酶(批号: SH30042)、双抗(青霉素、链霉素, 批号: JI30023)和二甲基亚砜(DMSO, 批号: JI30231)均购自美国 Hyclone; 无水乙醇、石油醚均为分析纯, 购自天津市光复精细化工研究所。

2 方法与结果

2.1 索氏提取法

准确称取干燥芹菜子 25 g, 用滤纸包好, 置于索氏提取器的提取管中, 以 130 mL 石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)为提取溶剂, 提取温度 60 $^{\circ}$ C 条件下回流提取 8 h, 直至索氏提取器中浸出液呈无色为止, 得淡黄色具有特殊香味的油状物, 得油率为 4.81%, 并将其密封和避光保存。

2.2 水蒸气蒸馏法

准确称取干燥芹菜子 50.00 g 置于圆底烧瓶

中,加入蒸馏水 300 mL,按中国药典 2015 年版四部“挥发油测定法”(通则 2204)甲法^[17]提取芹菜子挥发油。连续提取 6 h,得无色透明具有特殊香味的油状物,经无水硫酸钠干燥过夜后读取挥发油量,得油率为 0.58%,将收集得到的挥发油密封、避光、低温保存。

2.3 GC-MS 分析

色谱柱为 DB-5MS 毛细石英管柱(30 m×250 mm, 0.25 μm);载气为高纯氦气;进样口温度 270 ℃;程序升温:初始温度 50 ℃,以 5 ℃·min⁻¹升温到 280 ℃,保持 10 min;进样量 1 μL,分流比 200:1。离子源为电子轰击离子源(EI),质谱电离能量 70 eV;离子源温度 180 ℃,接口温度 250 ℃,质量扫描范围为 40~400 *m/z*。2 种方法提取的芹菜子挥发油总离子流图见图 1。

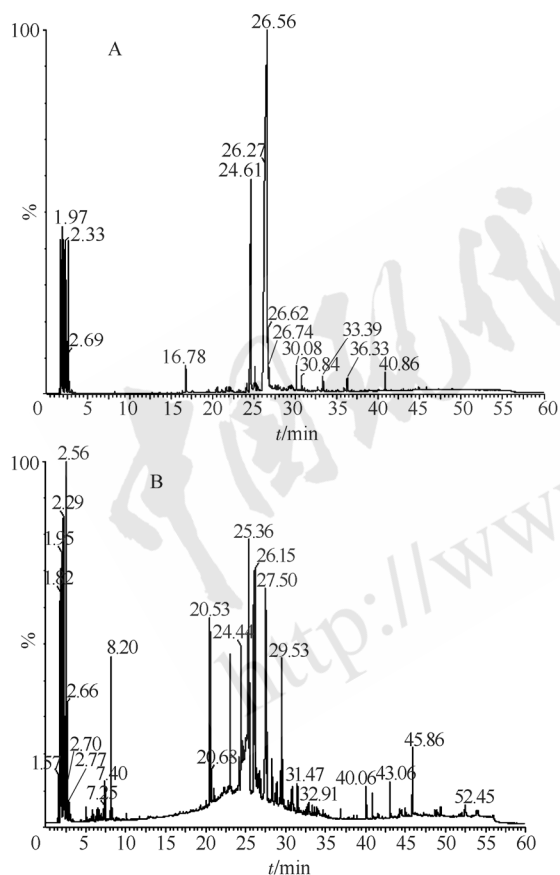


图 1 不同方法提取芹菜子挥发油的总离子流图
A-索氏提取法; B-水蒸气蒸馏法。

Fig. 1 GC-MS total ion chromatograms of volatile oil components from celery seed by different extraction methods
A-Soxhlet extraction method; B-steam distillation.

使用美国 NIST MS Search 2.0 质谱标准库计算机检索确定各成分,采用面积归一化法计算各

组分的相对含量。2 种方法提取的芹菜子挥发油共分离鉴定出 49 种成分,索氏提取法为 36 种,占总相对含量的 83.11%,主要成分为 3-硝基-*N*-(2-吩噻甲基)苯胺(6.70%)、4-甲基哌啶(7.26%)、5-甲基-2-己炔(6.31%)、2-丁炔基-1,4-二醇基双醋酸酯(5.28%);水蒸气蒸馏法为 26 种,占总相对含量的 87.26%,主要成分为 7-双环[4.1.0]胸腺嘧啶-7-亚基-双环[4.1.0]庚烷(9.19%)、4,6-癸二炔(9.52%)、4-戊炔醇(6.82%)、2,5-二氢-1-亚硝基吡咯(6.32%)。索氏提取法和水蒸气蒸馏法共有成分 13 种,结果见表 1。

2.4 体外抗肝纤维化作用

2.4.1 细胞培养 HSC-LX2 细胞置于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基、5% CO₂、37 ℃饱和湿度的条件下培养,复苏及传代后次日换液,1~2 d 换液,并密切观察培养液颜色及细胞状态,当细胞呈单层覆盖瓶底时,用 0.25%的胰酶消化,按照 1:2 的比例传代。

2.4.2 体外 TGF-β1 诱导 HSC-LX2 肝纤维化模型的建立及细胞上清液中肝纤维化指标含量的测定 取对数生长期的 HSC-LX2 细胞,2×10⁴·mL⁻¹接种于 96 孔板,24 h 后吸去培养液,分别加入含 5, 10, 20, 40, 80, 100 ng·mL⁻¹ TGF-β1 的培养液,并设空白对照组(不含细胞)和阴性对照组(不含药物),4 个复孔。分别培养 24, 48, 72 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,培养箱中孵育 1 h,用酶标仪于 450 nm 下测定各孔 *A* 值,取其平均值计算细胞活力。实验平行重复 3 次。筛选出 TGF-β1 诱导 HSC-LX2 最佳作用时间和浓度,并用试剂盒测定透明质酸、层粘连蛋白、III型前胶原肽的含量。细胞活力=[*A*_{450(加药)}-*A*_{450(空白)}]/[*A*_{450(阴性)}-*A*_{450(空白)}]×100%。

TGF-β1 干预 HSC-LX2 细胞后,分别于 24, 48, 72 h 采用 CCK-8 法检测 TGF-β1 对 HSC-LX2 增殖的影响。结果显示,在前 2 个作用时间点(24, 48 h),随着 TGF-β1 浓度增大,增殖的细胞数越多,100 ng·mL⁻¹ TGF-β1 在 24, 48 h 对 HSC-LX2 细胞增殖活力分别达到 (292.45±0.26)% 和 (318.39±6.26)%。72 h 时,细胞增殖活力明显低于前 2 个作用时间点,故将 100 ng·mL⁻¹ TGF-β1、48 h 作为体外 TGF-β1 诱导 HSC-LX2 活化,建立肝纤维化模型的最佳剂量和作用时间,结果见表 2。

表1 不同方法提取的芹菜子挥发油的成分分析

Tab. 1 Analysis of the components of volatile oil extracted from celery seed by different methods

序号	保留时间/min	化合物名称	分子式	相对百分含量/%		
				索氏提取法	水蒸气蒸馏法	
1	1.727	3-甲基-3-[(3-甲基-2-丁烯基)含氧]-1-丁烯	3-methyl-3-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-1-butene	C ₁₀ H ₁₈ O	3.03	—
2	1.774	4-戊炔醇	4-pentyn-1-ol	C ₅ H ₈ O	2.52	6.82
3	1.821	2-丁炔基-1,4-二醇基双醋酸酯	2-butyne-1,4-diol, diacetate	C ₈ H ₁₀ O ₄	5.28	—
4	2.068	5-甲基-1-己醇	5-methyl-1-hexanol	C ₇ H ₁₆ O	1.92	3.12
5	2.115	4-甲基哌啶	4-methyl-piperidine	C ₆ H ₁₃ N	7.26	—
6	2.127	3-硝基-N-(2-噻吩甲基)苯胺	3-nitro-N-(2-thienylmethyl)-benzenamine	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	6.70	—
7	2.197	环庚烷	cycloheptane	C ₇ H ₁₄	4.76	0.53
8	2.291	5-甲基-2-己炔	5-methyl-2-hexyne	C ₇ H ₁₂	6.31	5.19
9	2.338	2,5-二氢-1-亚硝基吡咯	2,5-dihydro-1-nitroso- 1H-pyrrole	C ₄ H ₆ N ₂ O	2.95	—
10	2.562	2-羟基-反式环己腈	2-hydroxy- trans-cyclohexanecarbonitrile	C ₇ H ₁₁ NO	4.77	—
11	2.656	s(+)-1-氧基-2-甲基-氮杂环丁烷	s(+)-1-cyano-2-methyl-azetidine	C ₅ H ₈ N ₂	1.30	—
12	2.703	2-甲基-1,6-庚二烯	2-methyl-1,6-heptadiene	C ₈ H ₁₄	0.23	3.05
13	2.938	瓜氨酸	citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	1.26	5.30
14	3.020	4-氯-赖氨酸	4-chlorolysine	C ₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	0.41	—
15	3.361	硝基-L-精氨酸	nitro-L-arginine	C ₆ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.70	—
16	5.065	1-甲基-2 戊炔基-环丙烷	1-methyl-2-pentyl-cyclopropane	C ₉ H ₁₈	0.54	—
17	7.286	3-甲基-3-苯基杂氮环丁烷	3-methyl-3-phenyl-azetidine	C ₁₀ H ₁₃ N	0.58	—
18	7.404	十二烷醇(月桂醇)	1-dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	1.24	—
19	8.003	精氨酸	arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	0.45	—
20	8.203	丁基苯	n-butylbenzene	C ₁₀ H ₁₄	2.56	—
21	10.095	N-甲基-N-[4-(3-羟基吡咯烷基)-2-丁酰基]-乙酰胺	N-methyl-N-[4-(3-hydroxypyrrolidinyl)-2-butyryl]-acetamid	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	2.34	—
22	20.530	7-双环[4.1.0]胸腺嘧啶-7-亚基-双环[4.1.0]庚烷	7-bicyclo[4.1.0]hept-7-ylidene-Bicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₄ H ₂₀	0.23	9.19
23	25.384	4-(4-甲基-哌嗪)-1,5-咪唑	4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-1,5-dihydro-imidazol-2-one	C ₈ H ₁₄ N ₄ O	0.41	—
24	26.042	8,11-十八二炔酸甲酯	8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	2.09	—
25	26.160	N'-(3,4-二羟基苄基)-3-吡啶并酰肼	N'-(3,4-dihydroxybenzylidene)-3-pyridinohydrazide	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₃	1.31	—
26	27.500	辛基-环癸烷	octyl-cyclodecane	C ₁₈ H ₃₆	5.37	—
27	27.664	2-甲基-1-棕榈醇	2-methyl-1-hexadecanol	C ₁₇ H ₃₆ O	1.38	—
28	29.404	1,1-bis(氧化十二烷基)- 鲸蜡烷	1,1-bis(dodecyloxy)-hexadecane	C ₄₀ H ₈₂ O ₂	2.77	—
29	29.533	1-(乙炔氧基)-十八烷	1-(ethenyloxy)-octadecane	C ₂₀ H ₄₀ O	3.54	—
30	31.496	2-十四烷基-泛酰硫氢乙胺	2-myristinoyl pantetheine	C ₂₅ H ₄₄ N ₂ O ₅ S	1.17	—
31	2.174	2,5-二氢-1-亚硝基吡咯	2,5-dihydro-1-nitroso-1H-pyrrole	C ₄ H ₆ N ₂ O	—	6.32
32	1.669	2-丁烯-1,4-二醇	2-butene-1,4-diol	C ₄ H ₈ O ₂	1.04	0.48
33	1.833	1-氨基-3-甲基-2-丁烯	1-amino-3-methyl-2-butene	C ₅ H ₁₁ N	—	0.41
34	2.174	1-壬醇	1-nonanol	C ₉ H ₂₀ O	—	0.64
35	2.209	2,5-二氢-1-亚硝基-1H-吡咯	1H-pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-	C ₄ H ₆ N ₂ O	1.22	0.21
36	2.315	N-氧基-2-甲基杂氮环丁烷	N-cyano-2-methylazetidine	C ₅ H ₈ N ₂	—	1.02
37	2.374	4-氯-庚烷	4-chloro-heptane	C ₇ H ₁₅ Cl	1.98	4.12
38	2.597	s(+)-1-氧基-2-甲基-氮杂环丁烷	s(+)-1-cyano-2-methyl-azetidine	C ₅ H ₈ N ₂	0.19	5.22
39	2.644	2-乙基-1-己醇	2-ethyl-1-hexanol	C ₈ H ₁₈ O	—	2.64
40	2.726	3,5-二甲苯-1-己烯	3,5-dimethyl-1-hexene	C ₈ H ₁₆	—	2.78
41	3.032	1,1-二甲基乙基)-环己烷	(1,1-dimethylethyl)-cyclohexane	C ₁₀ H ₂₀	2.01	1.76
42	3.173	2,6,6-三甲基-双环[3.1.1]-3-氨基-胸腺嘧啶	2,6,6-trimethyl-bicyclo[3.1.1]hept-3-ylamine	C ₁₀ H ₁₉ N	—	2.69
43	5.899	4,6-癸二炔	4,6-decadiyne	C ₁₀ H ₁₄	—	9.52
44	8.755	1,2,3,5,8,8a-六氢化萘	1,2,3,5,8,8a-hexahydro-naphthalene	C ₁₀ H ₁₄	—	3.75
45	11.775	羟亚甲基-2-硝基-苯乙醛	hydroxymethylene-2-nitro-benzeneacetaldehyde	C ₉ H ₇ NO ₄	1.29	1.45
46	12.986	N,N'-bis(2-羟乙基)-尿素	N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-urea	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₃	—	1.97
47	21.424	3-甲基苯基-异恶唑-4,5-肟	3-tolyl-isoxazole-4,5-dione dioxime	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₃	—	1.09
48	21.553	(Z)-5,8,11,14- 花生四烯酸甲酯	(Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid, methyl ester	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	—	2.97
49	22.881	8,11-十八二炔酸甲酯	8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	—	5.02

注：“—”表示未检测到。

Note: “—”means not detected.

表 2 TGF-β1 不同浓度和作用时间对 HSC-LX2 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab. 2 Effect of different concentration and time of TGF-β1 on proliferation rate of HSC-LX2 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ ng·mL ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		A 值	细胞活力/%	A 值	细胞活力/%	A 值	细胞活力/%
空白对照组	—	0.183±0.004	—	0.175±0.004	—	0.210±0.001	—
阴性对照组	—	0.395±0.102	—	0.671±0.023	—	1.739±0.197	—
TGF-β1	5	0.347±0.054	77.35±0.75	0.711±0.072	108.11±3.26	0.573±0.109 ¹⁾	23.76±2.65
	10	0.501±0.028	150.72±0.62	0.775±0.042	121.10±2.61	0.596±0.035 ¹⁾	25.24±2.41
	20	0.511±0.067	154.71±0.86	0.820±0.103	130.12±4.51	1.316±0.136	47.63±1.04
	40	0.695±0.105 ¹⁾	215.52±1.96	0.894±0.110	145.21±5.62	1.311±0.185	72.13±3.65
	80	0.640±0.108 ¹⁾	241.49±0.21	1.093±0.079 ¹⁾	177.59±2.54	2.472±0.145 ¹⁾	148.51±2.54
	100	0.803±0.101 ¹⁾	292.45±0.26	1.755±0.081 ²⁾	318.39±6.26	2.728±0.177 ¹⁾	164.54±3.22

注: 与阴性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

2.4.3 CCK-8 法检测不同方法提取的芹菜子挥发油对 TGF-β1 诱导的 HSC-LX2 增殖的影响及细胞上清液中肝纤维化指标含量的测定 取对数生长期的 HSC-LX2 细胞, 以 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 24 h 后待铺板细胞完全贴壁并形态展开, 设模型组、鳖甲软肝片组(阳性对照组)、药物组和阴性对照组(不含药物), 4 个复孔。模型组加入含有 100 ng·mL⁻¹ TGF-β1 的培养液, 阳性对照组加入含有 0.5 g·mL⁻¹ 鳖甲软肝片药物的培养液, 各药物组含 100 ng·mL⁻¹ TGF-β1 和不同方法提取的芹菜子挥发油, 培养 48 h 后, 用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔 A 值, 测得的各复孔的 A 值取其平均值, 按公式计算不同方法提取的芹菜子挥发油对细胞的生长抑制率。实验平行重复 3 次。用酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞上清液中透明质酸、层粘连蛋白和Ⅲ型前胶原肽的含量, 严格按照试剂盒说明书操作。细胞抑制率=[1-($A_{450(\text{加药})}$ - $A_{450(\text{空白})}$)/($A_{450(\text{阴性})}$ - $A_{450(\text{空白})}$)]×100%。

2 种方法提取的芹菜子挥发油均能有效抑制 TGF-β1 诱导的 HSC-LX2 增殖($P<0.05$), 且抑制率随提取物剂量的增大而增大, 其中索氏提取法提取的芹菜子挥发油对 HSC-LX2 增殖的抑制率高于水蒸气蒸馏法, 其高浓度的抑制率可达 89.2%。与阴性对照组相比, 模型组细胞上清液中肝纤维化指标含量显著性升高($P<0.01$); 与模型组相比, 水蒸气蒸馏和索氏提取高剂量组细胞上清液中肝纤维化指标含量显著性降低($P<0.05$), 而索氏提取高剂量组中肝纤维化指标透明质酸更接近于阴性对照组, 具有抗肝纤维化作用。结果见表 3~4。

表 3 不同方法提取的芹菜子挥发油对 TGF-β1 诱导的 HSC-LX2 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab. 3 Effects of the volatile oil extracted from celery seed by different methods on the proliferation of HSC-LX2 induced by TGF-β1($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	提取方法	剂量/ μg·mL ⁻¹	OD 值	抑制率/ %
空白对照组	—	—	0.197±0.004	—
阴性对照组	—	—	0.996±0.081	—
鳖甲软肝片组	—	0.5	0.326±0.012 ³⁾	83.6±0.071
模型组(TGF-β1)	索氏提取法	0.000 1	1.622±0.174 ¹⁾	—
		0.05	0.902±0.146 ²⁾	11.7±0.27
		1	0.666±0.082 ²⁾	41.3±0.63
	水蒸气蒸馏法	2	0.283±0.081 ³⁾	89.2±0.56
		0.05	0.758±0.106 ²⁾	29.9±0.87
		1	0.505±0.103 ²⁾	61.4±0.36
		2	0.345±0.052 ³⁾	81.5±1.42

注: 与阴性对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

2.5 主成分分析

以各共有峰的相对峰面积为指标, 将索氏提取法和水蒸气蒸馏法测得的 13 个共有峰的相对峰面积进行标准化处理后, 采用 SPSS 19.0 软件进行主成分分析, 结果见表 5~6 和图 2。以特征值>1 为标准, 选取第一个作为主成分, 成分 1 的特征值为 12.386, 方差贡献率为 95.277%。对应的特征向量依次以峰 3(2-丁炔基-1,4-二醇基双醋酸酯)、4(5-甲基-1-己醇)、9(2,5-二氢-1-亚硝基吡咯)、10(2-羟基-反式环己甲腈)、12(2-甲基-1,6-庚二烯)较大, 第一主成分受这些成分的影响比较大, 说明芹菜子挥发油中这几个成分对肝纤维化作用贡献比较大。

表 4 不同方法提取的芹菜子挥发油对 HSC-LX2 细胞肝纤维化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab. 4 Effects of the volatile oil extracted from celery seed by different methods on hepatic fibrosis indexes in HSC-LX2 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	提取方法	剂量/g·mL ⁻¹	层粘连蛋白/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	透明质酸/ng·L ⁻¹	III型前胶原肽/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
阴性对照组	—	—	51.8±0.78	26.9±5.67	18.8±4.53
模型组(TGF- β 1)	—	0.0001	833.4±9.94 ¹⁾	302.3±7.44 ¹⁾	115.3±3.38 ¹⁾
鳖甲软肝片组	—	0.5	211.0±5.08 ³⁾	104.5±3.19 ²⁾	59.2±2.53 ²⁾
药物组	索氏提取法	0.05	683.2±7.34	286.3±8.32	93.8±7.33
		1	573.3±19.2 ²⁾	229.7±7.33	79.3±4.29 ²⁾
		2	384.0±5.35 ³⁾	133.3±3.26 ³⁾	75.2±8.54 ²⁾
	水蒸气蒸馏法	0.05	718.1±5.72	250.3±8.29	101.2±7.21
		1	523.9±10.22 ²⁾	234.8±6.21	82.8±9.44
		2	362.2±5.15 ³⁾	163.8±9.23 ²⁾	70.6±5.22 ²⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 5 相关矩阵的特征值

Tab. 5 Characteristics values of correlation matrix

因子	初始特征值		
	特征值(λ)	方差/%	累积/%
1	12.386	95.277	95.277
2	0.582	4.478	99.754
3	0.029	0.224	99.979
4	0.003	0.021	100.000
5	4.299×10^{-16}	3.307×10^{-15}	100.000
6	2.446×10^{-16}	1.882×10^{-15}	100.000
7	1.641×10^{-16}	1.262×10^{-15}	100.000
8	1.232×10^{-16}	9.478×10^{-16}	100.000
9	2.942×10^{-17}	2.263×10^{-16}	100.000
10	-6.135×10^{-17}	-4.720×10^{-16}	100.000
11	-2.537×10^{-16}	-1.952×10^{-15}	100.000
12	-3.349×10^{-16}	-2.576×10^{-15}	100.000
13	-5.198×10^{-16}	-3.999×10^{-15}	100.000

表 6 主成分的负荷量

Tab. 6 Loading doses of principal component

因子	成分 1	因子	成分 1	因子	成分 1
1	-0.542 7	6	-0.635 4	11	-0.099 6
2	0.114 5	7	-1.920 9	12	0.646 4
3	1.741 3	8	-1.920 9	13	0.000 0
4	1.197 6	9	0.421 9		
5	-0.473 7	10	0.549 9		

2.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理，计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，并进行资料正态性、方差齐性检验，组间各检测指标的比较用单因素方差分析，两两比较用两样本 t 检验法， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

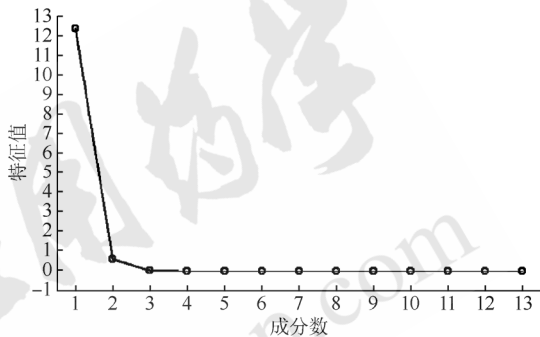


图 2 碎石图

Fig. 2 Scree plot

3 讨论

肝纤维化是多种病因导致慢性肝损害的共同结局，HSC 的激活、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[18]。HSC 大量激活、增殖，合成以 III 型前胶原肽、透明质酸、层粘连蛋白为主的多种细胞外基质，使细胞外基质的合成与降解失衡，在肝脏内过度沉积，改变肝脏结构，导致肝纤维化^[19-20]。目前研究认为肝纤维化逆转并不是使肝星状细胞由活化状态转为静息状态，而是通过促进其凋亡减少其数量来实现的。TGF- β 1 被学者公认为是致肝纤维化最强有力的细胞因子之一，它参与细胞的生长、分化及凋亡，激活 HSC，刺激细胞外基质的合成和沉积^[21]。因此本研究用 TGF- β 1 诱导 HSC 建立体外肝纤维化模型，分别给予不同方法提取的芹菜子提取物后，检测肝纤维化指标含量，研究 3 种不同方法提取的芹菜子挥发油是否具有抗纤维化作用。反映肝纤维化活动程度的重要指标包括血清透明质酸、层粘连蛋白、III 型前胶原肽。大量的临床实践

阐明,透明质酸、层粘连蛋白和Ⅲ型前胶原肽水平与肝组织的炎症活动及肝纤维化的进展程度均呈正相关^[22]。

血清透明质酸水平被作为反映肝脏损伤的严重程度、判别有无活动性肝炎、肝纤维化以及肝硬化的量化指标。当肝纤维化发生时,HSC生成透明质酸的能力会迅速提高,同时,内皮细胞对透明质酸的排除能力会有所降低,这2个方面的因素都会引起肝纤维化中透明质酸的水平增多^[23]。研究报道,透明质酸水平能够较好地反映肝脏纤维化的形成、发生发展程度、肝脏细胞的功能、肝脏炎症的改变进程等。目前的临床研究表明,透明质酸可作为目前众多肝纤维化检测的生化指标中最为特异和敏感的指标(>80%),当与其他指标联合使用时,可更进一步提高病情的诊断特异性和敏感度。还有报道显示,对于慢性肝病肝纤维化和肝脏炎症性改变的病人进行组织学-血清学对照研究试验,透明质酸的诊断准确率为82.9%,特异性为93%,敏感性为56%,成为透明质酸、层粘连蛋白和Ⅲ型前胶原肽3项细胞外间质成分中最为准确和特异的指标,证实透明质酸对与检测肝脏炎症、肝纤维化发生发展进程以及判断治疗药物的效果均有很高诊断价值^[24]。

Ⅲ型胶原的前体成分是Ⅲ型前胶原肽,当HSC激活和活化时会合成并释放Ⅲ型前胶原肽,其表达水平的高低可用于反映Ⅲ型胶原代谢含量及直接预测肝纤维化早期病变程度,也是慢性肝组织炎症坏死、纤维化程度和肝纤维化、肝硬化诊断的重要指标^[25]。肝脏炎症及肝脏纤维化的病人,其病情严重程度和肝脏纤维化的活动程度与血清生化中Ⅲ型前胶原肽水平呈正相关,因此,Ⅲ型前胶原肽含量的测定可用于有效地鉴别轻型、中型、重型慢性肝纤维化,是检测慢性肝纤维化的活动程度的重要指标,其临床判断预后的价值已被公认^[26]。

当肝细胞损伤时,层粘连蛋白的生成可被各种细胞因子及细胞外基质本身的破坏所激活,大量生成的层粘连蛋白会引起肝窦毛细血管化,故层粘连蛋白的血清生化指标含量一般被作为反映基底膜的更新率,还可反映汇管区肝纤维化和肝窦毛细血管化的大致范围^[27]。血清层粘连蛋白水平与肝纤维化程度和炎症反应水平密切相关,在正常的健康人血清中层粘连蛋白的含量非常少,当肝脏纤维化发生时,随着纤维化程度会迅速升高,立即出现在病

人的血清中,有助于对早期肝纤维化的诊断。

本研究采用索氏提取法和水蒸气蒸馏法提取芹菜子挥发油,得率分别为4.81%和0.58%。通过GC-MS分析,2种方法提取的芹菜子挥发油成分在类别和含量上差异较大,有13种共有成分。通过总离子流图可看出,对于水蒸气蒸馏法和索氏提取法,挥发油成分主要集中在保留时间20~40 min,保留时间靠前的成分相对较少,可能是长时间回流使低沸点不稳定成分损失所致。索氏提取法提取得到的挥发油成分主要为烷烃和醇类化合物,水蒸气蒸馏法提取得到的化学成分主要为酯类和烷烃化合物。研究结果显示,索氏提取法提取的芹菜子挥发油对TGF- β 1诱导的HSC-LX2增殖抑制作用强于水蒸气蒸馏法;水蒸气蒸馏和索氏提取的芹菜子挥发油高剂量组细胞上清液中肝纤维化指标与模型组相比含量显著性降低($P<0.01$),而索氏提取组肝纤维化指标更接近于阴性对照组细胞,可有效逆转肝纤维化;经主成分分析,芹菜子挥发油抗肝纤维化作用可能与2-丁炔基-1,4-二醇基双醋酸酯、5-甲基-1-己醇、2,5-二氢-1-亚硝基吡咯、2-羟基-反式环己甲腈、2-甲基-1,6-庚二烯这几个成分有关。本研究为后续探究芹菜子抗肝纤维化药效成分及其作用机制奠定理论基础。

REFERENCES

- [1] 刘勇民. 维吾尔药志: 下册[M]. 乌鲁木齐: 乌鲁木齐科技卫生出版社, 1999: 346.
- [2] MATHEW A. Elevated gibberellin enhances lignin accumulation in celery (*Apium graveolens* L.) leaves [J]. Protoplasma, 2019, 1(2): 1-12.
- [3] POW C, WHITE W. Celery seed and related extracts with antiarthritic antiulcer and antimicrobial activities [J]. Pro Drug Res, 2015, 7(12): 133-153.
- [4] WANG W B, MA H X, SONG C M. Research progress on chemical components and the pharmaceutical action of celery seeds [J]. J Jilin Med Coll(吉林医药学院学报), 2012, 33(1): 49-51.
- [5] MENG Y L, XI L H, FENG W, et al. Advances in the research of celery, an important apiaceae vegetable crop [J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 4(22): 1-12.
- [6] LIU Z, CAO S, JIN C, et al. The antagonism between apigenin and protoapigenone to the PDK-1 target in macrothelypteris torresiana. [J]. Fitoterapia, 2019, 314(4): 14-22.
- [7] LIU T, LIU F, XIE H, et al. Phytopathogenic fungal inhibitors from celery seeds [J]. Nat Prod Commun, 2012, 7(7): 889-890.
- [8] TI H, RAM M. Protective and hypoglycemic effects of celery seed on streptozotocin induced diabetic rats: experimental and histopathological evaluation [J]. Acta Diabetol, 2016, 53(4): 609-619.
- [9] LIU M Y. Research progress on the protective effect of butylphthalide on nervous system [J]. J Mod Med Health(现代

医药卫生), 2018, 30(2): 212-215.

- [10] HE W, HU Z. Chinese herbal extract dl-3n-butylphth-alide a commonly use drug for the treatment of ischemic stroke as a novel therapeutic approach to treat for neurodegenerative disease [J]. Neural Regen Res, 2015, 12(5): 273-278.
- [11] BIAN T T, XIN E D, ZHANG A X, et al. Analysis of volatile components in *Zanthoxylum bungeanum* before and after processing by GC-MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(15): 1871-1875.
- [12] TAN C, CHEN Q, MA L, et al. Determination of 18 polychlorinated biphenyls in traditional Chinese medicine with GC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(10): 1447-1450.
- [13] MAO P, WANG L, LEI G, et al. Comparative study of extraction methods of rose flower essential oil [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(4): 538-541.
- [14] WANG Y, LI X, JIANG Q, et al. GC-MS analysis of the volatile constituents in the leaves of 14 composite plants [J]. Molecules, 2018, 23(1): 21-29.
- [15] MARI P, MALI D, FLOR O, et al. Bioassisted azeotropic soxhlet extraction of mustard oilseeds [J]. J Biotechnol, 2017, 25(8): 101-104.
- [16] CHANG W, CHENG Z, RAN T, et al. Analysis on the physicochemical properties of ginkgo biloba leaves after enzymolysis based ultrasound extraction and soxhlet extraction [J]. Molecules, 2016, 21(1): 97-103.
- [17] 中国药典 四部[S]. 2015: 附录 203-204.
- [18] HOU F, LIU R, LIU X, et al. Arkadia protein expression is reduced in the liver during the progression of hepatic fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3): 1315-1322.
- [19] YU H, XIN D, JIAN L. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis [J]. Exp Cell Res, 2017, 352(2): 420-426.
- [20] GANDHI C R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals [J]. J Hepatol, 2017, 67(5): 1104-1105.
- [21] ZHEN L, JUAN W, WU X, et al. Role of DDAH/ADMA pathway in TGF- β 1 mediated activation of hepatic stellate cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 2549-2556.
- [22] SUN L, XIU M, WANG S, et al. Lipopolysaccharide enhances TGF- β 1 signalling pathway and rat pancreatic fibrosis [J]. J Cell Mol Med, 2018, 12(1): 227-229.
- [23] DONG Z, GAO Q, GUO H. Glaucocalyxin a attenuates the activation of hepatic stellate cells through the TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. DNA and Cell Biol, 2018, 37(3): 227-232.
- [24] HU Z, QIN F. Paeoniflorin exerts protective effect on radiation-induced hepatic fibrosis in rats via TGF- β 1/Smads signaling pathway [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(3): 1012-1021.
- [25] CAO J, LIN L X, QIN G J, et al. Effects of total flavonoids of semen litchi on TGF- β 1-induced apoptosis of human hepatic stellate cells [J]. Shandong Med J(山东医药), 2018, 12(5): 13-16.
- [26] YANG D. Research progress of receptor targeted hepatic stellate cell in treatment of liver fibrosis [J]. Chin J Hepatol(中华肝脏病杂志), 2018, 26(8): 630-632.
- [27] DENG L, SHEN B D, LIU Y, et al. Effect of modified formula Compound Biejia Ruangan Pills on hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄ and its mechanism [J]. Chin Tradit Herbal Drug(中草药), 2018, 49(6): 1371-1378.

收稿日期: 2019-01-04

(本文责编: 蔡珊珊)