

# 川牛膝化学成分及其舒张子宫平滑肌活性研究

文 敏<sup>1,3</sup>, 赵 芮<sup>1,3</sup>,

孙美记<sup>1,3</sup>, 彭 成<sup>1,3</sup>, 刘 娟<sup>1,3\*</sup>, 熊 亮<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室; <sup>2</sup>成都中医药大学医学技术学院; <sup>3</sup>成都中医药大学 西南特色药材创新药物成分研究所, 成都 611137

**摘 要:** 本文探究川牛膝提取物及其化学成分的舒张子宫平滑肌活性。利用离体子宫收缩模型对川牛膝乙醇提取物及其乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位的舒张子宫平滑肌活性进行评价, 确定最佳活性部位。采用硅胶柱层析、制备薄层层析和半制备高效液相色谱等方法对活性部位进行分离纯化, 运用多种现代波谱学技术对分离得到的化合物进行结构鉴定, 并对其舒张子宫平滑肌活性进行测定分析。结果显示: 与对照组比较, 0.4 mg/mL 的乙酸乙酯萃取部位能显著 ( $P < 0.01$ ) 抑制大鼠子宫平滑肌的收缩张力和收缩活力并表现出最佳活性, 其抑制率分别为 ( $67.09 \pm 5.37$ )% 和 ( $79.27 \pm 2.49$ )%。此外在累计给药下, 川牛膝乙酸乙酯萃取物的最大张力抑制率可达 ( $77.45 \pm 12.12$ )%,  $EC_{50}$  为 ( $0.10 \pm 0.01$ ) mg/mL。从川牛膝乙酸乙酯部位分离鉴定出 9 个化合物, 即 irilin A (1)、irilin B (2)、2'-羟基-5,6,7-三甲氧基异黄酮 (3)、 $\beta$ -谷甾醇葡萄糖苷 (4)、滨蒿内酯 (5)、*N*-顺式-阿魏酰-3-甲氧基酪胺 (6)、*N*-反式-阿魏酰甲氧基酪胺 (7)、*N*-顺式-阿魏酰酪胺 (8)、*N*-反式-阿魏酰酪胺 (9), 化合物 2、3、6、7、8、9 为首次从川牛膝中分离得到。与对照组比较, 化合物 1-3、5-9 在 50  $\mu$ mol/L 时均能抑制子宫平滑肌的收缩张力及收缩活力 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中化合物 2 在 50  $\mu$ mol/L 时, 张力抑制率可达 ( $36.16 \pm 2.75$ )%, 活力抑制率可达 ( $47.03 \pm 5.84$ )%。本文通过现代分离纯化技术和离体子宫收缩模型, 发现了具有舒张子宫平滑肌活性的川牛膝提取物及化学成分, 为阐明川牛膝治疗痛经的物质基础提供了依据。

**关键词:** 川牛膝; 提取物; 化学成分; 舒张子宫平滑肌

中图分类号: R284.2; R285.5 文献标识码: A

## Chemical constituents from *Cyathulae Radix* and their relaxant effects on uterine smooth muscle

WEN Min<sup>1,3</sup>, ZHAO Rui<sup>1,3</sup>, SUN Mei-ji<sup>1,3</sup>,

PENG Cheng<sup>1,3</sup>, LIU Juan<sup>1,3\*</sup>, XIONG Liang<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; <sup>2</sup> College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; <sup>3</sup> Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** In this study, the relaxant activity on uterine smooth muscle of the extracts and chemical components from *Cyathulae Radix* was investigated. The uterine contraction model *in vitro* was used to evaluate the uterine smooth muscle relaxant activity of the 70% EtOH extract and its EtOAc and *n*-BuOH fractions of *Cyathulae Radix*. Silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography, and semi-preparative high performance liquid chromatography were used to isolate the compounds from the best active portion, then the structures of isolated compounds were determined by various modern spectroscopic techniques. Finally, the relaxant effects of these compounds on uterine smooth muscle was screened. The results showed that the EtOAc fraction (0.4 mg/mL) could significantly inhibited the contractile tension and contractile activity inhibition on rat uterine smooth muscle

and exhibited the best activity, with inhibition rates at  $(67.09 \pm 5.37)\%$  and  $(79.27 \pm 2.49)\%$ . In addition, under the cumulative dosing, the maximum tension inhibition rate was  $(77.45 \pm 12.12)\%$ , and the  $EC_{50}$  was  $0.10 \pm 0.01$  mg/mL. Nine compounds were isolated from the EtOAc fraction of RC and were identified as irilin A (1), irilin B (2), 2'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyisoflavonoid (3), betavulgarin (4), scoparone (5), *N-cis*-feruloyl-3-methoxytyramine (6), *N-trans*-feruloylmethoxytyramine (7), *N-cis*-feruloyltyramine (8), and *N-trans*-feruloyltyramine (9). Among them, compounds 2, 3, 6, 7, 8 and 9 were isolated from this plant for the first time. Compared with control, compounds 1-3, 5-9 inhibited the contractile tension and activity on uterine smooth muscle at 50  $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), among which compound 2 had the best activity, with a tension inhibition rate of  $(36.16 \pm 2.75)\%$  and the activity inhibition rate of  $(47.03 \pm 5.84)\%$  at 50  $\mu\text{mol/L}$ . In this study, the relaxant activity on the uterine smooth muscle of *Cyathulae Radix* extract and its chemical components were found, which provided a scientific basis for clarifying the material basis of *Cyathulae Radix* in the treatment of dysmenorrhea.

**Key words:** *Cyathulae Radix*; extracts; chemical constituents; uterine smooth muscle relaxant activity

川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 为苋科 (Amaranthaceae) 杯苋属 (*Cyathula*) 多年生草本植物, 其以干燥根入药, 可药食两用。《新华本草纲要》记载川牛膝具有祛风湿及活血通经的功效, 可以治疗瘀血经闭、血淋、尿血、胞衣不下、难产、产后瘀血腹痛等<sup>[1]</sup>。目前, 从川牛膝中分离得到 70 多个化学成分, 主要包括生物碱、黄酮、酚苷、苯丙素、有机酸、甾酮及皂苷等类型<sup>[2-5]</sup>。关于川牛膝的药理研究主要集中在其各类提取物<sup>[6]</sup>及主要成分杯苋甾酮<sup>[7]</sup>上, 研究显示川牛膝具有雌激素样、心血管及骨关节保护、免疫调节、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[7-12]</sup>。现代研究证明, 痛经的发生与子宫平滑肌痉挛性收缩密切相关<sup>[13]</sup>, 川牛膝具有活血通经的功效, 临床可用于治疗经闭<sup>[14]</sup>、痛经<sup>[15, 16]</sup>等疾病, 但基础研究相对匮乏。为阐明川牛膝治疗痛经的物质基础, 本文利用离体子宫收缩模型对川牛膝各提取物(70%乙醇提取物及其乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位)进行舒张子宫平滑肌活性筛选, 采用现代分离技术对活性最佳的部位进行分离纯化, 随后对获得的单体化合物进行活性评价, 以期阐明川牛膝治疗痛经的物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

Agilent 1220 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Bruker Avance Neo 600 MHz 核磁共振仪、Bruker timsTOF 高分辨液质联用仪 (德国 Bruker 公司); Powerlab 多功能生理记录仪、离体组织器官恒温灌流系统 (澳大利亚埃德仪器国际贸易(上海)有限公司)。

### 1.2 药物与试剂

川牛膝药材于 2020 年 9 月采自四川省乐山市金口河区, 经成都中医药大学的高继海副教授鉴定为苋科杯苋属植物川牛膝 (*Cyathula officinalis* Kuan) 的干燥根, 标本 (CO-20200915) 现存于西南特色药材创新药物成分研究所。

薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub> (青岛海洋化工厂); 200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (瑞典 Amersham Pharmacia 公司); 氘代试剂 (英国 Cambridge isotope laboratories 公司); 甲醇、正己烷、乙醇 (色谱级, 美国 Fisher 公司); 其他所用试剂均为分

析纯（成都市科隆化学品有限公司）；戊酸雌二醇片（批号：818A，德国 Bayer 公司）；盐酸维拉帕米（批号：100223-200102，中国食品药品检定研究院）；NaCl、CaCl<sub>2</sub>、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、葡萄糖（纯度均≥99.5%，成都市科隆化学品有限公司）；缩宫素注射液（批号：230705，江西省创欣药业集团有限公司）

### 1.3 实验动物

SPF 级未孕雌性 SD 大鼠，体重 200 ± 20 g，鼠龄 7~8 周，购买于成都斯贝福（北京）实验动物有限公司，生产许可证号：SCXK (京)2019-0010。实验前，大鼠应在温度 25 °C、湿度 50% 的室内环境中适应性喂养 72 h，期间自由饮水及进食。所有实验程序均按照中国实验动物管理委员会的指南进行，并经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号：TCM-2022-58）。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 川牛膝不同提取物的制备

取 24 kg 干燥的川牛膝，加 8 倍量 70% 乙醇，加热回流提取 3 次，每次 2 h，收集乙醇提取液，合并提取液并减压浓缩至约 1 g/mL，得到乙醇提取物，再将乙醇提取物加少量超纯水混悬，待分散均匀后，依次用 10 kg 乙酸乙酯和 8 kg 正丁醇萃取，分别回收溶剂，减压浓缩至约 2 g/mL，得到乙酸乙酯萃取部位（130 g）和正丁醇萃取部位（400 g）。

#### 1.4.2 川牛膝不同提取物舒张子宫平滑肌活性研究

##### 1.4.2.1 大鼠离体子宫肌条的制备

将戊酸雌二醇溶液（8 mg/kg）于实验前 2 d，每晚 8 点左右给 SD 大鼠灌胃，复制动情期大鼠模型。实验第 3 d，采用颈椎脱臼方式处死大鼠后，立刻取出子宫，并迅速放置于盛满洛氏液的玻璃培养皿中，快速用剪刀剔除子宫肌条上的多余脂肪及周围组织。然后取中间段子宫肌条 2~3 cm，将子宫肌条一端固定在装有 37 °C 洛氏液（20 mL）的恒温水浴槽中（稳定通入 5% CO<sub>2</sub> 和 95% O<sub>2</sub>），另一端连接在张力感受器上。

##### 1.4.2.2 单浓度给药测定川牛膝不同提取物的舒张大鼠子宫平滑肌活性

利用 PowerLab 多功能生理记录仪记录子宫肌条收缩曲线，调节旋钮，让静息张力保持 1.0 g，平衡约 20~30 min，待子宫肌条收缩稳定后，先加入缩宫素（oxytocin, 0.008 U/mL）建立离体大鼠子宫肌条收缩模型，10 min 后，分别加入川牛膝乙酸乙酯萃取部位（EtOAc）、正丁醇萃取部位（n-BuOH）、70% 乙醇提取物（EtOH），浓度：0.4 mg/mL，DMSO 为空白对照组（Con），盐酸维拉帕米（Ver: 0.5 μmol/L）为阳性对照组，10 min 后记录子宫肌条的收缩张力和收缩活力，重复 5 次。每次药物作用 10 min 后立刻用 37 °C 的洛氏液冲洗子宫肌条 3 次，以恢复子宫肌条的活力。计算每次给药后子宫收缩活力和收缩张力的抑制率：抑制率 = (模型组平均值 - 给药组平均值) / 模型组平均值 × 100%。

##### 1.4.2.3 累积给药测定川牛膝乙酸乙酯萃取部位的舒张子宫平滑肌活性

采用“1.4.2.1”的方法，将子宫肌条固定在张力感受器上及恒温水浴槽中，调节旋钮，让

静息张力保持为 1.0 g, 平衡 20~30 min, 待子宫肌条收缩稳定后, 先加入缩宫素(0.008 U/mL) 建立大鼠子宫平滑肌收缩模型, 10 min 后, 按照累积给药方式, 每隔 10 min 加入川牛膝乙酸乙酯萃取物(终浓度依次为 0.002、0.006、0.02、0.06、0.14 mg/mL)。各组累积给药总浓度如下: 空白对照组(Con, 等体积给药 DMSO), 阳性对照组(Ver, 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), 川牛膝乙酸乙酯提取物(EtOAc, 0.2 mg/mL)。通过记录子宫肌条收缩曲线, 观察药物对子宫肌条收缩活动的影响, 计算最大张力抑制率( $E_{\text{max}}$ )和  $EC_{50}$ , 实验重复 3 次。

#### 1.4.3 川牛膝活性部位化学成分分离

将川牛膝乙酸乙酯部位浸膏(130 g), 经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇(1:0 $\rightarrow$ 0:1) 梯度洗脱得到 19 个组分(Fr.1~Fr.19)。Fr.14 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(二氯甲烷: 甲醇 = 3:1) 分离得到 5 个组分(Fr.14-1~Fr.14-5), Fr.14-3 经硅胶柱, 以二氯甲烷-甲醇(90:10 $\rightarrow$ 0:100) 洗脱后合并得到 5 个组分(Fr.14-3-1~Fr.14-3-5)。Fr.14-3-2 经硅胶柱, 以二氯甲烷-甲醇(90:10 $\rightarrow$ 30:70) 洗脱分为 4 份(Fr.14-3-2a~Fr.14-3-2d)。其中, Fr.14-3-2a 经反相半制备液相色谱(50%甲醇-水, 1.5 mL/min) 得到化合物 2 (2.5 mg,  $t_R = 150$  min) 和 3 (3.0 mg,  $t_R = 130$  min)。Fr.14-3-2b 通过反相半制备液相色谱(45%甲醇-水, 1.5 mL/min) 得到化合物 1 (1.0 mg,  $t_R = 60$  min)。Fr.14-3-2c 通过反相半制备液相色谱(51%甲醇-水, 1.5 mL/min) 得到化合物 4 (3.8 mg,  $t_R = 170$  min) 和 5 (1.8 mg,  $t_R = 115$  min)。Fr.14-3-3 通过反相半制备液相色谱(50%甲醇-水, 1.5 mL/min) 得到化合物 6 (2.5 mg,  $t_R = 30$  min) 和 7 (2.8 mg,  $t_R = 42$  min)。Fr.14-3-4 通过反相半制备液相色谱(40%甲醇-水, 1 mL/min) 得到化合物 8 (7.1 mg,  $t_R = 65$  min) 和 9 (6.0 mg,  $t_R = 110$  min)。

#### 1.4.4 川牛膝单体成分舒张子宫平滑肌活性测定

采用“1.4.2.2”的方法, 空白对照组: 等体积的 DMSO; 阳性对照组(Ver): 终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ; 药物组: 川牛膝单体化合物终浓度为 1、10、50  $\mu\text{mol/L}$ 。计算每次给药后子宫收缩活力和收缩张力的抑制率( $n=3\sim 5$ )。

### 1.5 数据分析

实验数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 使用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析或秩和检验比较组间数据统计学差异,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。使用 Graphpad prism 8 软件绘制柱状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 川牛膝不同提取物单浓度给药对大鼠平滑肌收缩活动的影响

与空白对照组比较, 阳性对照组 Ver (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 可显著抑制大鼠的收缩张力和收缩活力( $P < 0.01$ ), 最大抑制率分别为  $(68.26 \pm 2.52)\%$  和  $(88.63 \pm 6.06)\%$ 。在川牛膝的三种提取物中, 乙酸乙酯部位(终浓度: 0.4 mg/mL) 活性最佳, 能显著抑制离体大鼠子宫平滑肌收缩活动(见图 1A), 其收缩张力抑制率为  $(67.09 \pm 5.37)\%$ , 收缩活力抑制率为  $(79.27 \pm 2.49)\%$ 。正丁醇部位活性明显弱于乙酸乙酯部位, 在最大终浓度时, 收缩张力抑制率和

收缩活力抑制率仅为  $(29.97 \pm 8.32)\%$  和  $(32.59 \pm 11.53)\%$ 。70%乙醇提取物对子宫平滑肌收缩活动影响不明显,  $P > 0.05$ , 结果见图 1B、图 1C 和表 1。

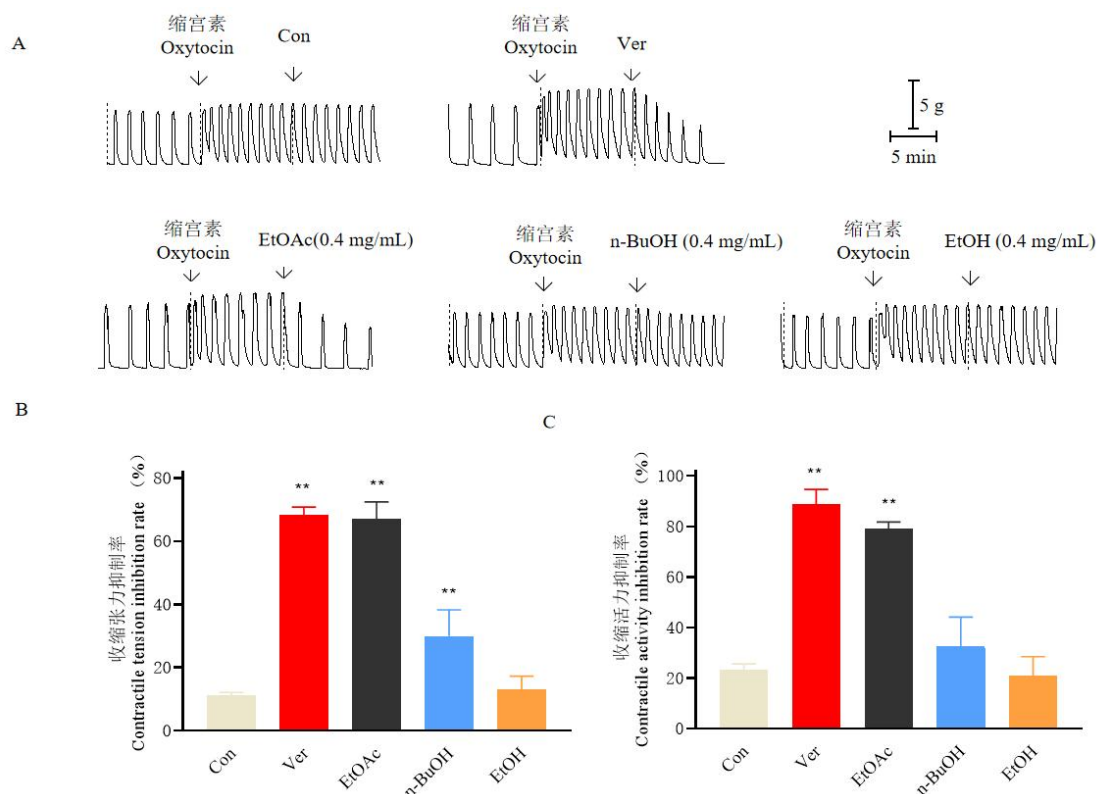


图 1 川牛膝不同提取物对大鼠子宫平滑肌收缩活动的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects of different extracts of Cyathulae Radix on contractile activity of rat uterine smooth muscle ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

表 1 川牛膝不同提取物对大鼠子宫平滑肌收缩活动的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effects of different extracts of Cyathulae Radix on contractile activity of rat uterine smooth muscle ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别 Group	浓度 Concentration	收缩张力抑制率 Contractile tension inhibition rate (%)	收缩活力抑制率 Contractile activity inhibition rate (%)
Con	-	$11.23 \pm 0.87$	$23.45 \pm 2.21$
Ver	$0.5 \mu\text{mol/L}$	$68.26 \pm 2.52^{**}$	$88.63 \pm 6.06^{**}$
EA	$0.4 \text{ mg/mL}$	$67.09 \pm 5.37^{**}$	$79.27 \pm 2.49^{**}$
n-BuOH	$0.4 \text{ mg/mL}$	$29.97 \pm 8.32^{**}$	$32.59 \pm 11.53$
EtOH	$0.4 \text{ mg/mL}$	$13.15 \pm 4.14$	$20.85 \pm 7.66$

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

## 2.2 川牛膝乙酸乙酯部位累积给药对大鼠子宫平滑肌的舒张作用

通过累积给药可知，空白对照组对大鼠的收缩张力作用不明显，阳性药对照组（Ver: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ）能显著抑制大鼠子宫平滑肌收缩张力（ $P < 0.01$ ），最大抑制率可达（ $82.22 \pm 3.67$ ）%；川牛膝乙酸乙酯组对大鼠子宫平滑肌收缩张力有显著的抑制作用（ $P < 0.01$ ），最大抑制率可达（ $77.45 \pm 12.12$ ）%， $\text{EC}_{50}$ 为（ $0.10 \pm 0.01$ ） $\text{mg/mL}$ ，结果见图2、表2。

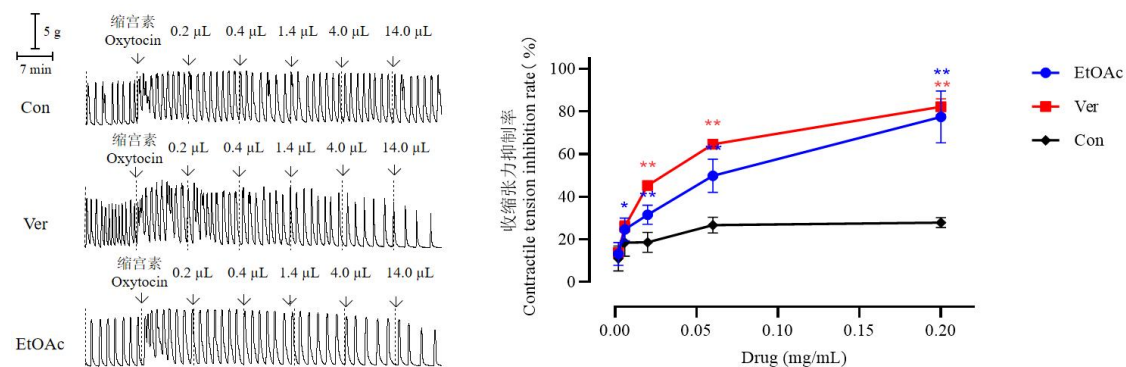


图2 川牛膝乙酸乙酯部位对大鼠子宫平滑肌的舒张作用（ $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ）

Fig.2 The relaxant effects of ethyl acetate fraction of Cyathulae Radix on uterine smooth muscle in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ ；\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

表2 川牛膝乙酸乙酯部位舒张子宫平滑肌的  $\text{EC}_{50}$  和  $\text{E}_{\text{max}}$

Table 2  $\text{EC}_{50}$  and  $\text{E}_{\text{max}}$  of the ethyl acetate extract of Cyathulae Radix in relaxing uterine smooth muscle

组别 Group	$\text{EC}_{50}$	$\text{E}_{\text{max}}$ (%)
Con	-	$27.89 \pm 1.97$
EA	$0.10 \pm 0.01 \text{ mg/mL}$	$77.45 \pm 12.12$
Ver	$0.33 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$	$82.22 \pm 3.67$

### 2.3 川牛膝活性部位化学成分的结构鉴定

**化合物1** 黄色无定形固体；HR-ESI-MS:  $m/z$  337.0679  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ （计算值 $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{Na}$ , 337.0688）； $^1\text{H}$  NMR（600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ） $\delta$ : 8.16（1H, s, H-2），7.25（1H, br t,  $J = 7.8$  Hz, H-4'），7.25（1H, br d,  $J = 7.8$  Hz, H-6'），6.92（1H, br d,  $J = 7.8$  Hz, H-3'），6.91（1H, br t,  $J = 7.8$  Hz, H-5'），6.57（1H, s, H-8），3.97（3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>），3.84（3H, s, OCH<sub>3</sub>-6）； $^{13}\text{C}$  NMR（150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ） $\delta$ : 157.3（C-2），122.5（C-3），182.6（C-4），154.1（C-5），133.7（C-6），160.7（C-7），92.1（C-8），155.3（C-9），107.6（C-10），119.3（C-1'），156.8（C-2'），117.0（C-3'），131.0（C-4'），120.6（C-5'），132.7（C-6'），61.1（6-OCH<sub>3</sub>），57.0（7-OCH<sub>3</sub>）。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道基本一致，故化合物1可鉴定为 irilin A。

**化合物2** 黄色胶状物; HR-ESI-MS:  $m/z$  323.0519  $[M + Na]^+$  (计算值 $C_{16}H_{12}O_6Na$ , 323.0532);  $^1H$  NMR (600 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 8.21 (1H, s, H-2), 7.31 (1H, br d,  $J=7.8$  Hz, H-6'), 7.27 (1H, br t,  $J=7.8$  Hz, H-4'), 6.97 (1H, br d,  $J=7.8$  Hz, H-3'), 6.93 (1H, br t,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.55 (1H, s, H-8), 3.88 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $(CD_3)_2CO$ )  $\delta$ : 154.5 (C-2), 121.7 (C-3), 182.1 (C-4), 156.6 (C-5), 132.7 (C-6), 156.8 (C-7), 94.8 (C-8), 154.5 (C-9), 106.1 (C-10), 119.8 (C-1'), 156.8 (C-2'), 117.6 (C-3'), 130.7 (C-4'), 120.6 (C-5'), 132.4 (C-6'), 60.6 (6-OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[17]</sup>对照一致, 故化合物2可鉴定为irilin B

**化合物3** 油状物; HR-ESI-MS:  $m/z$  351.0830  $[M + Na]^+$  (计算值 $C_{18}H_{16}O_6Na$ , 351.0845);  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 8.07 (1H, s, H-2), 7.21 (1H, m, H-4'), 7.21 (1H, m, H-6'), 6.99 (1H, s, H-8), 6.90 (1H, m, H-3'), 6.90 (1H, m, H-5'), 3.99 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.91 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 155.1 (C-2), 124.9 (C-3), 177.8 (C-4), 142.0 (C-5), 153.7 (C-6), 160.0 (C-7), 97.7 (C-8), 156.4 (C-9), 113.9 (C-10), 120.8 (C-1'), 156.9 (C-2'), 117.3 (C-3'), 130.8 (C-4'), 120.7 (C-5'), 132.6 (C-6'), 61.8 (5-OCH<sub>3</sub>), 62.6 (6-OCH<sub>3</sub>), 57.0 (7-OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[18]</sup>对照一致, 故化合物3可鉴定为2'-羟基-5,6,7-三甲氧基异黄酮。

**化合物4** 黄色胶状物; HR-ESI-MS:  $m/z$  335.0526  $[M + Na]^+$  (计算值 $C_{17}H_{12}O_6Na$ , 335.0532);  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 7.90 (1H, s, H-2), 7.33 (1H, br t,  $J=7.8$  Hz, H-4'), 7.07-7.11 (1H, m, H-6'), 7.07-7.11 (1H, m, H-3'), 6.94 (1H, br t,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 6.71 (1H, s, H-8), 6.11 (2H, s, -OCH<sub>2</sub>-), 4.12 (3H, s, 5-OCH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 153.6 (C-2), 125.9 (C-3), 178.9 (C-4), 141.6 (C-5), 135.9 (C-6), 154.0 (C-7), 93.0 (C-8), 154.8 (C-9), 112.8 (C-10), 120.9 (C-1'), 156.8 (C-2'), 119.6 (C-3'), 130.2 (C-4'), 120.8 (C-5'), 130.6 (C-6'), 102.6 (-OCH<sub>2</sub>-), 61.5 (5-OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[17]</sup>对照一致, 故化合物4可鉴定为 $\beta$ -谷甾醇葡萄糖苷。

**化合物5** 白色粉末; HR-ESI-MS:  $m/z$  229.0465  $[M + Na]^+$  (计算值 $C_{11}H_{10}O_4Na$ , 229.047

7) ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.89 (1H, d,  $J=9.6$  Hz, H-4) , 7.15 (1H, s, H-5) , 6.99 (1H, s, H-8) , 6.27 (H, d,  $J=9.6$  Hz, H-3) , 3.93 (3H, s, 6- $\text{OCH}_3$ ) , 3.88 (3H, s, 7- $\text{OCH}_3$ ) ;  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 163.8 (C-2) , 109.9 (C-3) , 145.9 (C-4) , 113.6 (C-5) , 148.1 (C-6) , 154.8 (C-7) , 101.0 (C-8) , 151.3 (C-9) , 113.1 (C-10) , 56.8 (6- $\text{OCH}_3$ ) , 56.8 (7- $\text{OCH}_3$ ) 。以上数据和文献<sup>[19]</sup>对照一致, 故化合物5可鉴定为滨蒿内酯。

**化合物6** 白色无定形粉末; HR-ESI-MS:  $m/z$  366.1304  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Na}$ , 366.1317) ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.36 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2) , 6.93 (1H, dd,  $J=8.4, 1.8$  Hz, H-6) , 6.77 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2') , 6.73 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5) , 6.69 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5') , 6.61 (1H, dd,  $J=7.8, 1.8$  Hz, H-6') , 6.61 (1H, d,  $J=12.6$  Hz, H-7) , 5.82 (1H, d,  $J=12.6$  Hz, H-8) , 3.82 (3H, s, 3- $\text{OCH}_3$ ) , 3.78 (3H, s, 3'- $\text{OCH}_3$ ) , 3.42 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-8') , 2.71 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-7') ;  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 128.5 (C-1) , 113.4 (C-2) , 148.6 (C-3) , 148.9 (C-4) , 115.8 (C-5) , 124.9 (C-6) , 138.3 (C-7) , 122.2 (C-8) , 170.4 (C-9) , 131.9 (C-1') , 113.9 (C-2') , 148.5 (C-3') , 146.0 (C-4') , 116.2 (C-5') , 121.5 (C-6') , 36.0 (C-7') , 42.3 (C-8') , 56.3 (3- $\text{OCH}_3$ ) , 56.3 (3'- $\text{OCH}_3$ ) 。以上核磁数据和文献<sup>[20]</sup>对照一致, 故化合物6可鉴定为*N*-顺式-阿魏酰-3-甲氧基酰胺。

**化合物7** 白色针晶 ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ; HR-ESI-MS:  $m/z$  366.1304  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Na}$ , 366.1317) ;  $^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.43 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7) , 7.11 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2) , 7.01 (1H, dd,  $J=8.4, 1.8$  Hz, H-6) , 6.79 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5) , 6.82 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2') , 6.72 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5') , 6.66 (1H, dd,  $J=8.4, 1.8$  Hz, H-6') , 6.40 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8) , 3.88 (3H, s, 3- $\text{OCH}_3$ ) , 3.83 (3H, s, 3'- $\text{OCH}_3$ ) , 3.48 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-8') , 2.77 (2H, t,  $J=7.2$  Hz, H-7') ;  $^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 132.0 (C-1) , 111.5 (C-2) , 149.9 (C-3) , 148.9 (C-4) , 116.5 (C-5) , 123.2 (C-6) , 142.1 (C-7) , 118.7 (C-8) , 169.2 (C-9) , 128.2 (C-1') , 113.4 (C-2') , 149.3 (C-3') , 146.0 (C-4') , 116.2 (C-5') , 122.2 (C-6') ,



36.2 (C-7'), 42.5 (C-8'), 56.4 (3'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上核磁数据和文献<sup>[21]</sup>对照一致, 故化合物7可鉴定为*N*-反式-阿魏酰甲氧基酪胺。

**化合物8** 黄色油状; HR-ESI-MS:  $m/z$  336.1213 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>Na, 336.1212); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.36 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-2), 7.00 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd,  $J$  = 7.8, 1.8 Hz, H-6), 6.74 (1H, d,  $J$  = 7.8 Hz, H-5), 6.69 (2H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.61 (1H, d,  $J$  = 12.6 Hz, H-7), 5.82 (1H, d,  $J$  = 12.6 Hz, H-8), 3.83 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.40 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-8'), 2.69 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-7')。 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 128.5 (C-1), 113.9 (C-2), 148.6 (C-3), 148.5 (C-4), 116.2 (C-5), 124.9 (C-6), 138.4 (C-7), 121.6 (C-8), 170.3 (C-9), 131.2 (C-1'), 130.7 (C-2'), 115.8 (C-3'), 156.9 (C-4'), 116.2 (C-5'), 130.7 (C-6'), 35.6 (C-7'), 42.4 (C-8'), 56.3 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上核磁数据和文献<sup>[21]</sup>对照一致, 故化合物8可鉴定为*N*-顺式-阿魏酰酪胺。

**化合物9** 黄色油状; HR-ESI-MS:  $m/z$  336.1211 [M + Na]<sup>+</sup>(计算值C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>Na, 336.1212); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.43 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-7), 7.12 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz, H-2), 7.05 (2H, d, H-2', 6'), 7.02 (1H, dd,  $J$  = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 6.80 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5), 6.71 (2H, d, H-3', 5'), 6.40 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-8), 3.88 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.46 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-8'), 2.75 (2H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H-7')。 <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 128.2 (C-1), 111.5 (C-2), 149.9 (C-3), 149.3 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 142.1 (C-7), 118.7 (C-8), 169.2 (C-9), 131.3 (C-1'), 130.7 (C-2'), 116.3 (C-3'), 157.0 (C-4'), 116.3 (C-5'), 130.7 (C-6'), 35.8 (C-7'), 42.6 (C-8'), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>)。以上核磁数据和文献<sup>[22]</sup>对照一致, 故化合物9可鉴定为*N*-顺式-阿魏酰酪胺。

化合物1~9 结构见图3。

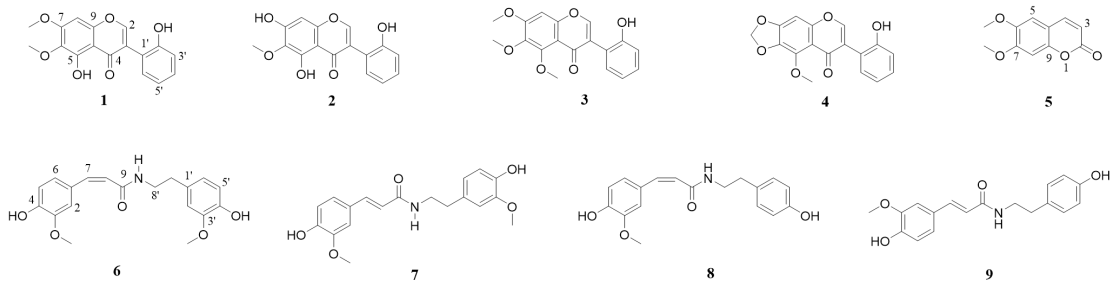


图3 化合物1~9的结构

Fig.3 Structures of compounds 1-9

#### 2.4 单体成分舒张大鼠子宫平滑肌活性

与空白对照组比较，化合物1~3、5~9在50 μmol/L浓度下，均对收缩张力及活力有一定的抑制作用 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。其中，以化合物2的活性最好，与对照组比较，在50 μmol/L时张力抑制率可达  $(36.16 \pm 2.75)\%$ ，活力抑制率可达  $(47.03 \pm 5.84)\%$ 。(具体结果见图4、图5和表3)

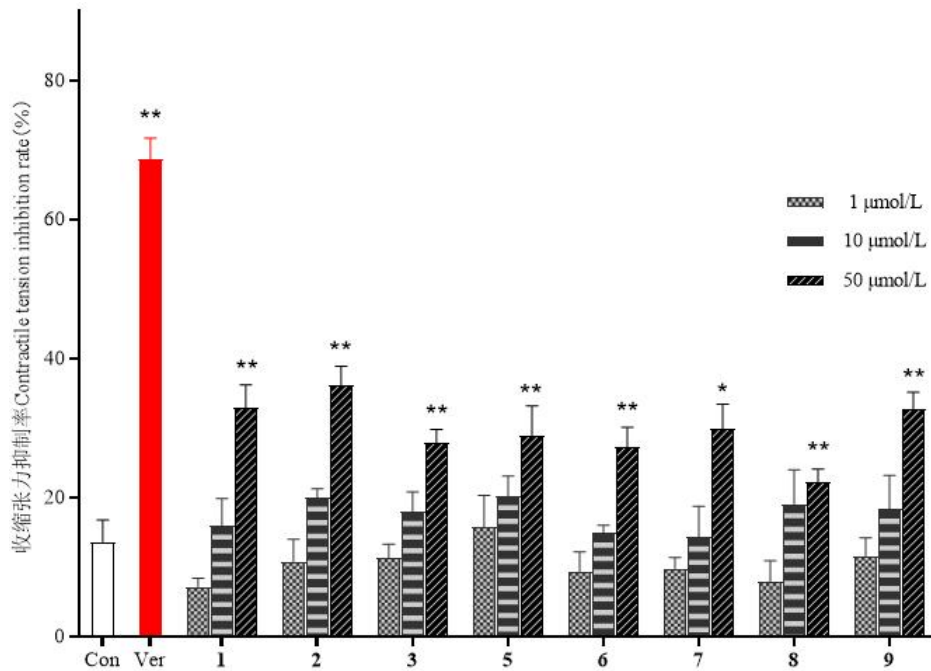


图4 川牛膝不同化合物对缩宫素诱导的大鼠子宫平滑肌收缩张力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 5$ )

Fig. 4 Effects of different compounds of Cyathulae Radix on contractile tension of rat uterine smooth muscle induced by oxytocin ( $\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 5$ )

注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ ；\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Con, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

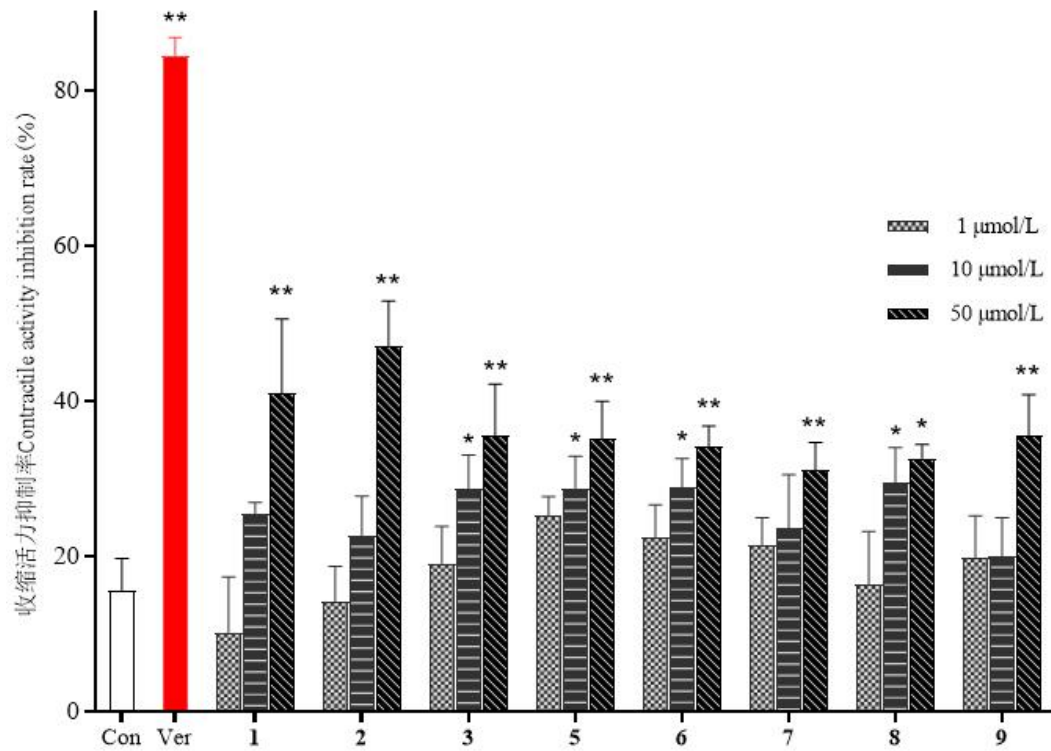


图 5 川牛膝不同化合物对缩宫素诱导的大鼠子宫平滑肌收缩活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3-5$ )

Fig.5 Effects of different compounds of Cyathulae Radix on contractile activity of rat uterine smooth muscle

induced by oxytocin ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3-5$ )

注: 与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Con, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

表 3 川牛膝不同化合物对子宫平滑肌收缩活动的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3-5$ )

Table 3 Effects of different compounds of Cyathulae Radix on contractile activity of rat uterine smooth muscle

induced by oxytocin ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3-5$ )

组别 Group	浓度 Concentration (μmol/L)	收缩张力抑制率 Contractile tension inhibition rate (%)	收缩活力抑制率 Contractile activity inhibition rate (%)
Con	-	13.63 ± 3.14	15.49 ± 4.25
Ver	0.5	68.68 ± 3.05**	84.39 ± 2.44**
1	1	7.17 ± 1.25	10.21 ± 7.15
	10	16.02 ± 3.82	25.44 ± 1.50
	50	32.95 ± 3.25**	40.97 ± 9.61**
2	1	10.79 ± 3.22	14.18 ± 4.52
	10	20.06 ± 1.18	22.71 ± 5.05
	50	36.16 ± 2.75**	47.03 ± 5.84**
3	1	11.29 ± 2.00	19.07 ± 4.79
	10	17.95 ± 2.85	28.72 ± 4.34**
	50	27.86 ± 1.97**	35.57 ± 6.62*
5	1	15.71 ± 4.61	25.18 ± 2.49
	10	15.71 ± 4.61	27.86 ± 1.97**
	50	27.86 ± 1.97**	36.16 ± 2.75**

	10	20.23 ± 2.83	28.78 ± 4.11*
	50	28.93 ± 4.29**	35.07 ± 4.90**
6	1	9.39 ± 2.83	22.48 ± 4.13
	10	14.89 ± 1.16	28.82 ± 3.79*
	50	27.25 ± 2.86**	34.13 ± 2.64**
7	1	9.78 ± 1.60	21.45 ± 3.54
	10	14.32 ± 4.44	23.55 ± 6.96
	50	29.92 ± 3.55*	33.40 ± 4.59**
8	1	7.86 ± 3.07	16.36 ± 6.84
	10	19.06 ± 4.94	29.43 ± 4.53*
	50	22.22 ± 1.87**	32.62 ± 1.76*
9	1	11.59 ± 2.60	19.81 ± 5.40
	10	18.31 ± 4.88	20.06 ± 4.93
	50	32.65 ± 2.51**	35.46 ± 5.40**

注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Con, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3 论与结论

本文利用离体子宫收缩模型考察川牛膝不同提取物对子宫收缩活动的影响，发现乙酸乙酯部位舒张子宫活性最佳， $EC_{50}$ 为  $(0.10 \pm 0.01)$  mg/mL，随后对活性最佳的乙酸乙酯部位进行分离，从中获得9个单体成分，包括4个黄酮、1个香豆素和4个生物碱，其中，化合物**2**、**3**、**6**、**7**、**8**、**9**均为首次从川牛膝中分离得到。对分离得到的化合物进行活性筛选，发现与对照组相比较，化合物**1**~**3**、**5**~**9**在50  $\mu\text{mol/L}$ 时均对缩宫素引起的子宫平滑肌痉挛性收缩有抑制作用 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )，其中化合物**2**活性最好，在50  $\mu\text{mol/L}$ 时张力抑制率可达  $(36.16 \pm 2.75)\%$ ，活力抑制率可达  $(47.03 \pm 5.84)\%$ 。上述结果说明川牛膝70%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位及分离得到的黄酮类、生物碱类化合物具有舒张子宫平滑肌作用。

中医认为痛经属于“经行腹痛”范畴，而“血瘀”是痛经发生的主要病因。根据《素问》“血实宜决之”的治则，历代医家常用活血化瘀药来治疗痛经。西医认为痛经的发生与子宫痉挛性收缩密切相关，舒张子宫是治疗痛经的重要手段。课题组前期从活血化瘀中药出发，研究了十种具有代表性的活血化瘀药挥发油舒张子宫平滑肌活性，发现除川牛膝挥发油外，其他活血化瘀药的挥发油均有不同程度的舒张子宫平滑肌活性<sup>[23]</sup>。川牛膝具有活血通经的功效，临床可用于治疗经闭、痛经等疾病。如调肝汤<sup>[24]</sup>、血府逐瘀汤<sup>[25]</sup>方中的川牛膝可用于活血祛瘀、通经止痛。为深入阐明川牛膝“活血通经”的科学内涵，本实验在前期基础之上，发现川牛膝乙酸乙酯部位及黄酮、香豆素、生物碱类小分子化合物具有舒张子宫平滑肌活性，这个研究结果也与文献报道的黄酮类<sup>[26]</sup>、生物碱类<sup>[27]</sup>具有舒张子宫平滑肌作用一致，本研究不仅对挖掘川牛膝舒张子宫平滑肌成分具有重要意义，也为揭示川牛膝“活血通经”的科学内涵提供了依据。

#### 参考文献

- 1 Ren MT, Li HJ, Sheng LS, et al. Rapid analysis of constituents of Radix Cyathulae using hydrophilic interaction-reverse phase LC-MS[J]. *J Sep Sci*, 2009, 32: 3988-3995.
- 2 Liao PY, et al. Research progress in chemical constituents in plant resources of *Achyranthis Bidentatae Radix* from Amaranthaceae family[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2013, 44: 2019-2026.
- 3 Ding G, Li LY, Song XH, et al. Study on quality evaluation of *Cyathula officinalis* Kuan[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 851-859.
- 4 Fan QJ, Liu JL, Sun L, et al. Development of fingerprinting for quality evaluation of *Cyathula officinalis* Kuan by LC-DAD-ESI-Q-TOF MS/MS coupled with multivariate statistical analysis[J]. *Anal Methods*, 2015, 7: 3395-3401.
- 5 Zhao R, Peng C, Li L, et al. A new arborinane-type triterpenoid glycoside and three known megastigmanes from the roots of *Cyathula officinalis* K.C. Kuan[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2022, 104: 104489.
- 6 Si HY, Chen Y, Yang J, et al. Characterization and comparison of polysaccharides from *Achyranthes bidentata*, *Cyathula officinalis* and *Achyranthes aspera* by saccharides mapping[J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2023, 227: 115272.
- 7 Xie JC, Zhao Y, Huang LH, et al. Cyasterone inhibits osteoclast differentiation by estrogen-like effect[J]. *Centr South Pharm(中南药学)*, 2022, 20: 2046-2051.
- 8 Mo J, Xie H, Zhou Y, et al. Inokosterone is a potential drug target of estrogen receptor 1 in rheumatoid arthritis patients: analysis from active ingredient of *Cyathula officinalis*[J]. *Chin J Integr Med(中国结合医学杂志)*, 2021, 27: 767-773.
- 9 Huang Y, et al. Review of traditional uses, botany, chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of Radix Cyathulae[J]. *Chin Med*, 2019, 14: 1-16.
- 10 Lin L, Yang J, Yang Y, et al. Phosphorylation of Radix Cyathula Officinalis polysaccharide improves its immune-enhancing activity[J]. *J Carbohydr Chem*, 2020, 39: 50-62.
- 11 Chen AM, Pan J, Hu B, et al. Determination of antioxidant activities of polysaccharides from Radix Cyathulae and optimization of microwave extraction[J]. *Chin Tradit Pate Med(中成药)*, 2017, 39: 80-84.
- 12 Shen CY, et al. Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 1395-1425.
- 13 Jiang C, et al. Update of recent studies of adenomyosis-associated dysmenorrhea[J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2016, 5: 137-140.

- 14 Chen DD.Study on quality evaluation of *Achyranthes sinensis*[D].Chengdu:Chengdu University of Chinese Medicine(成都中医药大学),2008.
- 15 Lin S.The effect of Chinese integrative therapy on dysmenorrhea in endometriosis and its influence on bad mood[J].J Chin Nat Drug Use(临床合理用药杂志),2022,15:178-181
- 16 Zhang WP.Observation on curative effect of primary dysmenorrhea treated with Aiqi Decoction(艾芪汤)and its effects on serum  $PGF_{2\alpha}$ ,IL-6 [J].Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技),2021,28:63-64.
- 17 Hanawa F,Tahara S,Mizutani J.Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride [J].Phytochemistry,1991,30:157-163.
- 18 Chen H,HajiA.A,Yang JZ,et al.Isolation and structure identification of chemical constituents from *Anabasis brevifolia* [J].Acta Pharm Sin(药学学报),2005,3:248-251.
- 19 Cho JY,Jeong SJ,Lee HL,et al.Sesquiterpene lactones and scopoletins from *Artemisia scoparia* Waldst.& Kit.and their angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities [J].Food Sci biotechnol,2016,25:1701-1708.
- 20 Yao HN,Zhang H,Wang WX,et al.Two new phenylpropanoid amide glycosides from whole plants of *Corydalis racemosa* [J].Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2020,45:2411-2416.
- 21 Chen C,Chang FR,Yen HF,et al.Amides from stems of *Annona cherimola* [J].Phytochemistry,1998,49:1443-1447.
- 22 Huang WM,Chen FY,Bian YT,et al.Chemical constituents from *Chloranthus multistachys* and their anti-inflammatory activity[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:1688-1697.
- 23 Ni H,Liu J,Dai O,et al.Chemical composition and uterine smooth muscle relaxant activity of essential oils from 10 kinds of blood-activating and stasis-resolving Chinese medicinal herbs[J].J Ethnopharmacol,2021,269:113713.
- 24 Jin RM ,Chen ZS,Chen CX ,et al.Effects of motherwort on dysmenorrhea[J].Chin Pharma Assoc 2004,21:90-93.
- 25 Fu CY,et al.Research progress on chemical constituents,pharmacological effects and clinica application of Xuefu Zhuyu Decoction[J].Asia-Pacific Tradi Med(亚太传统医药),2024,20:232-237.
- 26 Liu J,Peng C,Zhou QM,et al.Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle[J].Phytochemistry,2018,145:128-136.
- 27 Feng R,Peng C,Zhou F,et al.Chemical constituents from *Ligusticum striatum* and their inhibitory effects on uterine smooth muscle contraction(II)[J].Chin Tradit Pat Med(中成药),2021,43:3032-3037.

收稿日期: 2024-05-13

接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(82104371); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-D-202209); 四川省科技创新人才计划(2023JDRC0041)

\*通信作者 Tel: (028)61800231; E-mail: xiling@cdutcm.edu.cn, liuj02022@163.com