

[成分分析]

油茶枯黄酮类化学成分及其体外抗炎活性

焦兵¹, 许承婷¹, 黎青¹, 覃江克^{1*}, 罗勇为², 杨文国²

(1. 广西师范大学化学与药学学院, 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室, 广西 桂林 541004; 2. 桂林莱茵生物科技股份有限公司, 广西 桂林 541199)

摘要: 目的 研究油茶枯 *Camellia oleifera* Abel Cake 中黄酮类化学成分及其体外抗炎活性。方法 油茶枯 80% 乙醇提取物采用硅胶、HPLC、中低压制备色谱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎症筛选模型评价其抗炎活性。结果 从中分离得到 7 个化合物, 分别鉴定为山柰酚 (1)、槲皮素 (2)、芦丁 (3)、山柰酚-3-O-β-D-吡喃葡萄糖 (1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 (4)、山柰酚-3-O-α-L-鼠李糖 (1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷 (5)、山柰酚-3-O-[2-O-β-D-木糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷 (6)、山柰酚-3-O-[2-O-β-D-半乳糖-6-O-α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷 (7)。化合物 1, 4~7 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生的炎症因子 NO、PGE2 均具有良好的抑制作用, 且均能抑制 RAW 264.7 细胞中 NF-κB 的活性、下调诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧合酶-2 (COX-2) 的表达。结论 化合物 4 为首次从该植物中分离得到; 化合物 1, 4~7 具有较强的体外抗炎活性。

关键词: 油茶枯; 化学成分; 分离鉴定; 抗炎活性

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)02-0327-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.017

Chemical constituents of the flavonoids from *Camellia oleifera* and their anti-inflammatory activities *in vitro*

JIAO Bing¹, XU Cheng-ting¹, LI Qing¹, QIN Jiang-ke^{1*}, LUO Yong-wei², YANG Wen-guo²

(1. Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, School of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2. Guilin Layn Natural Ingredients Corp, Guilin 541199, China)

ABSTRACT: AIM To study the chemical constituents of the flavonoids from *Camellia oleifera* Abel Cake and their anti-inflammatory activities *in vitro*. **METHODS** The 80% ethanol extract from *C. oleifera* was isolated and purified by silica column, HPLC and low and medium pressure chromatography, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. Their anti-inflammatory activities *in vitro* were estimated by LPS-induced inflammatory model in RAW264.7 macrophages. **RESULTS** Seven compounds were isolated and identified as kaempferol (1), quercetin (2), rutoside (3), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl (1→2) α-L-arabinopyranoside (4), kaempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→6) -β-D-glucopyranoside (5), kaempferol-3-O-[2-O-β-D-xylopyranosyl-6-O-α-L-rhamnopyranosyl] -β-D-glucopyranoside (6), kaempferol-3-O-[2-O-β-D-galactopyranosyl-6-O-α-L-rhamnopyranosyl] -β-D-glucopyranoside (7). Compounds 1, 4-7 had very significant inhibitory effects on inflammatory mediators such as NO and PGE2, and could inhibit the activity of NF-κB in RAW 264.7 cells and reduced the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). **CONCLUSION** Compound 4 is isolated from this plant for the first time, and

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 国家自然科学基金 (21462007); 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 1598007-19); 省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室支持项目 (EMEMR 2016-A08、2015-A03)

作者简介: 焦兵 (1992—), 男, 硕士, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0773) 2120958, E-mail: 1161499609@qq.com

* 通信作者: 覃江克 (1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向为天然药物化学与药理学。Tel: (0773) 2120958, E-mail: jiangkeq@sina.com

sina.com

compounds **1**, **4**–**7** have strong anti-inflammatory activities *in vitro*.

KEY WORDS: *Camellia oleifera* Abel Cake; chemical constituents; isolation and identification; anti-inflammatory activity

油茶 *Camellia oleifera* Abel. 系山茶科山茶属植物, 油茶枯是油茶籽经压榨出油后的固体残渣, 又名油茶籽饼、茶籽饼粕等, 呈紫褐色块状, 粉碎后即可得到褐色粉末, 是一种营养价值较高的油茶副产品, 富含皂素、多糖和黄酮等物质^[1-4]。每获得一吨茶油约产生四吨的油茶枯^[4], 而工业上常用于提取皂素, 在民间仅用于肥田, 大量被废弃作燃料, 未能有效的加以综合利用和充分发挥油茶的宝贵价值, 造成了极大的资源浪费^[5], 因此对油茶枯综合利用与开发研究成为当前热点之一。

研究表明油茶枯中富含黄酮类化合物^[6-8], Chen 等^[7]运用了异丙醇-盐析预处理和色谱技术从油茶籽中分离获得 7 个黄酮苷, 并采用 ORAC、ABTS 抗氧化模型初步评价了其体外抗氧化活性。Gao 等^[4]从油茶枯中分离获得 2 个新黄酮苷和 8 个已知山柰酚类化合物, 并考察了其对 DPPH 自由基的清除活性。刘晓惠^[9]对油茶枯总黄酮的生物活性研究表明, 提取的总黄酮具有良好的抗炎活性。油茶枯中黄酮类化合物不仅可以作为优良的抗氧化资源, 还具有增强人体免疫力、降血压、抗菌和抗癌等活性, 但对油茶枯中的黄酮, 尤其是其中单体化合物的抗炎活性研究很少。为了进一步阐明油茶枯抗炎作用的物质基础及其作用机制, 本研究采用柱层析手段对油茶枯提取物的乙酸乙酯、正丁醇部位化学成分进行分离, 并采用现代波谱手段鉴定其结构; 采用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立体外炎症筛选模型评价其抗炎活性, 旨在为油茶资源的综合开发与利用提供一定的实验依据和理论基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 WRS-IA 型数字熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司); ESI-MS 电喷雾质谱仪 (德国布鲁克-道尔顿公司); 400 MHz、500 MHz 超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); P230 II 高效液相色谱 (大连依利特分析仪器有限公司); Dr. Flash 中压快速纯化系统 [利穗科技 (苏州) 有限公司]; Infinite M1000 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); Image Station 4000R 凝胶图像分析系统 (kodek 公司); SDS-PAGE 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); KB-800 摇床 (浙江其林贝尔仪器有

限公司); 311 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司)。

1.2 试剂 油茶枯购于广西桂林市龙胜县, 经广西师范大学生命科学院唐绍清教授鉴定为正品, 粉碎过筛备用。RAW 264.7 巨噬细胞购于中科院上海生命科学研究院。分析纯石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇、甲醇 (西陇化工股份有限公司); 50 μm ODS 常压开放柱填料 (日本 YMC 有限责任公司)。Inertil ODS-3 4.6 i. d. ×250 mm ODS 分析柱 (日本岛津科技公司); YMC-Pack-ODS-AQ 20.0 i. d. ×250 mm ODS 制备柱 (日本 YMC 有限责任公司); NO 试剂盒 (碧云天公司); MTT 粉剂、DMSO (细胞级)、脂多糖 (德国 Sigma 公司); 吡啶美辛 [萨恩化学技术 (上海) 有限公司]; ELISA 试剂盒 (上海邦奕商贸有限公司产品); Rabbit Anti-COX2、Rabbit Anti-iNOS、Rabbit Anti-NF-κB (美国 Abcam 公司); 小鼠抗 β-Actin 单抗、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG (H+L) (中杉金桥公司)。

2 提取与分离

取 6 kg 油茶枯粉末, 用 60 L 80% 乙醇回流提取 3 次 (3 h/次), 合并提取液, 减压浓缩得褐色流浸膏 2.5 L。静置后撇去上层残油, 将下层浸膏分为 10 份分别分散于 2 L 水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取。各部分萃取液分别浓缩得石油醚部分 500 mL、乙酸乙酯浸膏 80 g、正丁醇浸膏 275 g。

取乙酸乙酯萃取物 80 g, 利用硅胶柱层析进行分离, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 收集乙酸乙酯比例为 10%、20%、40%、50%、60% 的流分; 这些组分再利用中低压制备色谱以 50 μm 的 C₁₈ 反相硅胶为分离填料, 甲醇-水体系按甲醇的比例为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 进行梯度洗脱, 并根据 HPLC 检测 (5%~100% 甲醇-水体系梯度洗脱 20 min) 的结果合并相同流份; 经过中低压制备色谱分离、合并后的流份, 再利用半制备高效液相色谱, 按甲醇为 85% 的甲醇-水体系, 检测波长 254 nm 的条件进行多次反复分离得到化合物 **1**~**3**。

取正丁醇萃取物 80 g, 利用硅胶柱层析进行分

离, 二氯甲烷-甲醇 (100 : 0~0 : 100) 体系进行梯度洗脱。收集甲醇比例为 10%、14%、18%、20% 的流分; 这些组分再利用中低压制备色谱以 50 μm 的 C_{18} 反相硅胶为分离填料, 以 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的甲醇-水梯度洗脱, HPLC 检测 (条件 5%~100%, 梯度洗脱 20 min), 合并相同流份。根据 HPLC 检测的结果合并相同流份; 经过中低压制备色谱分离、合并后的流份, 再利用半制备高效液相色谱, 按甲醇为 85% 的甲醇-水体系, 检测波长 254 nm 的条件进行多次反复分离得到化合物 4~7。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色无定型粉末, mp 274~276 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.17 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 8.07 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-3', 5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 148.0 (C-2), 137.1 (C-3), 177.3 (C-4), 160.5 (C-5), 99.2 (C-6), 162.5 (C-7), 94.5 (C-8), 158.2 (C-9), 104.5 (C-10), 123.7 (C-1'), 130.7 (C-2', 6'), 165.5 (C-4'), 16.3 (C-3', 5')。以上数据与文献 [10] 一致, 故鉴定为山柰酚。

化合物 2: 黄色针状结晶, mp 252~253 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ : 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 7.73 (2H, d, $J=2$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.63 (1H, dd, $J=2.0, 8.5$ Hz, H-6'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 146.2 (C-2), 137.2 (C-3), 177.3 (C-4), 162.5 (C-5), 99.2 (C-6), 165.6 (C-7), 94.0 (C-8), 158.2 (C-9), 104.5 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.2 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.8 (C-4'), 116.0 (C-5'), 121.8 (C-6')。以上数据与文献 [11] 一致, 故鉴定为槲皮素。

化合物 3: 黄色粉末, mp 188~190 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 6.22 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 7.67 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.63 (1H, dd, $J=2.4, 2.4$ Hz, H-6'), 5.11 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-1'''), 1.12 (3H, d, $J=6.0$ Hz, - CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 158.5

(C-2), 135.6 (C-3), 179.4 (C-4), 161.0 (C-5), 99.9 (C-6), 166.0 (C-7), 94.9 (C-8), 159.4 (C-9), 105.7 (C-10), 123.2 (C-1'), 116.1 (C-2'), 149.8 (C-3'), 145.9 (C-4'), 117.7 (C-5'), 123.6 (C-6'), 102.4 (Glc-1), 5.7 (Glc-2), 78.2 (Glc-3), 71.4 (Glc-4), 77.3 (Glc-5), 68.6 (Glc-6), 104.7 (Rha-1), 72.1 (Rha-2), 72.3 (Rha-3), 73.9 (Rha-4), 69.7 (Rha-5), 17.9 (Rha-6)。以上数据与文献 [12] 一致, 故鉴定为芦丁。

化合物 4: 黄色无定型粉末, mp 223~224 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ : 8.08 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-3', 5'), 6.39 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6), 5.46 (1H, d, $J=6$ Hz, H-1''), 4.75 (1H, d, $J=5.4$ Hz, H-1'''), 3.21-3.94 (9H, m, H-2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4''', 5'', 5''', 6'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ : 158.5 (C-2), 135.0 (C-3), 179.6 (C-4), 163.1 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.6 (C-8), 158.4 (C-9), 105.8 (C-10), 122.8 (C-1'), 132.3 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 161.5 (C-4'), 100.8 (Ara-1), 82.5 (Ara-2), 75.0 (Ara-3), 71.1 (Ara-4), 66.7 (Ara-5), 105.5 (Glc-1), 77.1 (Glc-2), 78.4 (Glc-3), 71.0 (Glc-4), 78.2 (Glc-5), 62.4 (Glc-6)。以上数据与文献 [13] 一致, 故鉴定为山柰酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖 (1 \rightarrow 2) - α -L-吡喃阿拉伯糖苷。

化合物 5: 淡黄色结晶型粉末, mp 208.2~209.4 $^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 8.06 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-8), 6.21 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6), 5.13 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, s, H-1'''), 3.23-3.82 (10H, m, H-2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4''', 5'', 5''', 6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ : 158.5 (C-2), 135.5 (C-3), 179.4 (C-4), 163.0 (C-5), 100.0 (C-6), 166.0 (C-7), 94.9 (C-8), 159.4 (C-9), 105.7 (C-10), 122.8 (C-1'), 132.4 (C-2'), 116.1 (C-3'), 161.5 (C-4'), 116.1 (C-5'), 132.4 (C-6'), 102.4 (Glc-1), 75.8 (Glc-2), 78.1 (Glc-3), 73.9 (Glc-4), 77.2 (Glc-5), 68.6 (Glc-6), 104.6 (Rha-1),

72.1 (Rha-2), 72.3 (Rha-3), 71.4 (Rha-4), 69.7 (Rha-5), 17.9 (Rha-6)。以上数据与文献 [4, 14] 一致, 故鉴定山柰酚-3-*O*- α -*L*-鼠李糖-(1 \rightarrow 6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 6: 黄色无定型粉末, mp 194 ~ 195 $^{\circ}$ C。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.02 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.88 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.41 (s, 1H, H-8), 6.19 (s, 1H, H-6), 5.56 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, Glu H-1), 4.57 (d, *J*=7.2 Hz, 1H, Xyl H-1), 4.33 (s, 1H, Rha H-1), 3.7 - 3.06 (m, 15H), 0.94 (d, *J*=5.6 Hz, 3H, Rha H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.9 (C-4), 164.4 (C-7), 161.7 (C-5), 160.3 (C-4'), 156.8 (C-2), 156.3 (C-9), 133.3 (C-3), 131.4 (C-2', 6'), 121.4 (C-1'), 115.6 (C-3', 5'), 104.9 (C-10), 104.4 (Rha C-1), 100.9 (Xyl C-1), 99.1 (Glu C-1), 98.6 (C-6), 94.1 (C-8), 82.1 (Glu C-2), 77.2 (Glu C-3), 76.5 (Glu C-5), 76.2 (Xyl C-3), 74.2 (Xyl C-2), 72.3 (Rha C-3), 71.0 (Rha C-2), 70.8 (Rha C-4), 71.4 (Xyl C-4), 69.9 (Glu C-4), 68.6 (Rha C-5), 66.5 (Glu C-6), 66.1 (Xyl C-5), 18.1 (Rha C-6)。以上数据与文献 [15] 一致, 故鉴定为山柰酚-3-*O*-[2-*O*- β -*D*-木糖-6-*O*- α -*L*-鼠李糖]- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 7: 黄色无定型粉末, mp 202~204 $^{\circ}$ C。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.98 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, H-2', 6'), 6.89 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, H-3', 5'), 6.40 (s, 1H, H-8), 6.19 (d, *J*=1.6 Hz, 1H, H-6), 5.53 (d, *J*=5.4 Hz, 1H, Glu H-1), 4.58 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, Gal H-1), 4.30 (s, 1H, Rha H-1), 0.93 (d, *J*=6.1 Hz, 3H, Rha H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.9 (C-4), 164.6 (C-7), 161.7 (C-5), 160.3 (C-4'), 156.9 (C-9), 156.8 (C-2), 133.2 (C-3), 131.2 (C-2', 6'), 121.4 (C-1'), 115.7 (C-3', 5'), 104.5 (C-10), 104.3 (Gal C-1), 100.8 (Rha C-1), 99.2 (Glu C-1), 98.7 (C-6), 94.2 (C-8), 82.7 (Glu C-2), 77.5 (Glu C-3), 77.0 (Glu C-5), 76.9 (Gal C-5), 76.1 (Gal C-3), 74.8 (Gal C-2), 72.3 (Rha C-3), 71.0 (Rha C-2), 70.8 (Glu C-4), 70.1 (Rha C-4), 70.0 (Gal C-4), 68.6 (Rha C-5), 66.4 (Glu C-6), 61.3 (Gal C-6), 18.1 (Rha C-6)。以上数据与文献 [15] 一致, 故鉴定为山柰酚-3-

O-[2-*O*- β -*D*-半乳糖-6-*O*- α -*L*-鼠李糖]- β -*D*-葡萄糖苷。

所有化合物均为黄酮类化合物, 其中化合物 4 为首次从该植物中分离得到。考虑到化合物 2~3 的抗炎活性研究已有较多报道, 本实验选取化合物 1、4~7 进行抗炎活性研究。

4 方法与结果

4.1 抗炎活性测试

4.1.1 细胞毒性实验 将生长态势表现良好的 RAW264.7 细胞进行消化, 吹打均匀得细胞悬液。按照 180 μ L/孔的体积将浓度为 1×10^5 个/mL 的 RAW264.7 细胞悬液接种于 96 孔板中, 于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 条件下的细胞培养箱中培养。24 h 后弃去培养基, 重新加入新鲜的培养基 180 μ L, 并在每孔中加入 10 μ L 的 LPS 溶液使其质量浓度为 5 ng/mL, 刺激 2 h 后将吲哚美辛或所得黄酮类化合物样品, 加入 96 孔板中, 每个质量浓度梯度设置 3 个复孔。于含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件的培养箱中培养 24 h。每孔加入 10 μ L 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 于培养箱中继续培养 4 h。4 h 后弃掉上清液, 每孔加入 DMSO 100 μ L 并震荡使甲臞紫色结晶完全溶解, 于酶标仪中, 选择波长为 570 nm, 测定光密度值并计算细胞存活率。

4.1.2 NO 抑制率 采用 Griess 法检测亚硝酸盐, 从而测定出总 NO 的含有量。取对数生长期的 RAW264.7 细胞进行消化, 按每孔 2 mL 接种至 6 孔培养板, 于含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件的培养箱中培养 24 h。吸尽每孔上清液, 加入新鲜 DMEM 培养基, 分为对照组、LPS (5 ng/mL) 组、LPS (5 ng/mL) + 化合物组, 加入相应质量浓度药物后于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件下继续培养 24 h, 随后取细胞上清液测定其中 NO 的含有量。

4.1.3 PGE2 抑制率 采用 ELISA 双抗体夹心法来测定 PGE2。实验步骤同“4.1.2”项, 取上清液根据 ELISA 试剂盒说明书测定并计算细胞上清液中 PGE2 浓度。

4.1.4 Western blot 实验 取对数生长期的 RAW264.7 细胞进行消化、接种至细胞培养皿, 于含 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度条件的培养箱中培养 24 h。弃去上清液, 加入新鲜 DMEM 培养基, 分为对照组、LPS (5 ng/mL) 组、LPS (5 ng/mL) + 化合物组, 加入相应质量浓度药物后继续培养 24 h, 随后提取细胞总蛋白。用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。各组取等量蛋白进

行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭液室温封闭 2 h 后结合一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 次日与 HRP 标记的二抗结合, 摇床中室温孵育 1.5 h。经显影、定影后, 用扫描仪和凝胶成像系统记录相应条带的透射光积分光密度值, 以 β -actin 蛋白条带作为内参, 检测蛋白表达量。

4.2 结果

4.2.1 细胞毒性实验 采用 MTT 方法测定了阳性对照吲哚美辛以及山柰酚类化合物 1、4~7 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 存活率的影响, 见图 1。吲哚美辛及化合物 1、4~7 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率均大于 85%, 与阴性对照组无明显差异, 表明吲哚美辛和化合物 1、4~7 在该浓度值下无明显细胞毒作用。

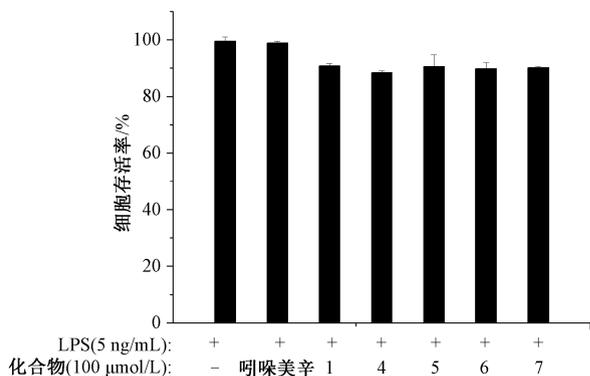


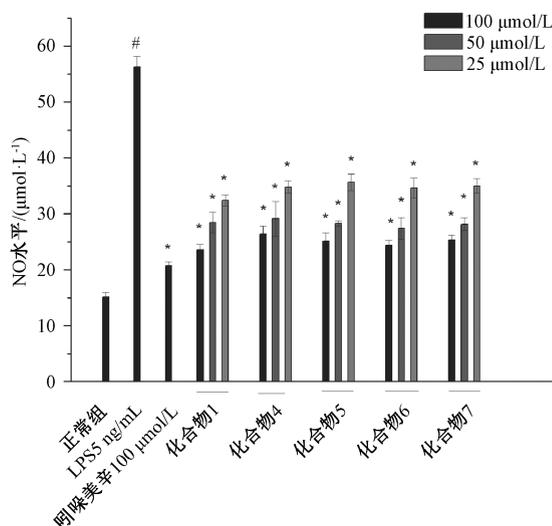
图 1 LPS、吲哚美辛及化合物 1、4~7 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of LPS, indometacin and compounds 1, 4-7 on the cell viability of RAW 264.7

4.2.2 抗炎活性

4.2.2.1 对 NO 的抑制作用 化合物 1、4~7 对 NO 的抑制能力测定结果见图 2, NO 在正常组细胞中存在少量基础表达, 当 RAW 264.7 受到 LPS 诱导后大量表达 NO, NO 水平较空白组提升至 56.31 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)。当加入抗炎药物吲哚美辛做阳性对照时, 细胞上清液中 NO 水平显著降低 ($P < 0.01$); 在测试组中, 所测试的这些化合物均能显著抑制 LPS 诱导产生的 NO 表达 ($P < 0.01$), 且表现出较好的剂量依赖性。

4.2.2.2 对 PGE2 的抑制作用 化合物 1、4~7 对 PGE2 的抑制能力测定结果, 见图 3。PGE2 在正常组细胞中存在少量基础表达。在细胞培养液中加入 5 ng/mL 的 LPS 刺激 2 h 后, PGE2 水平显著提升 ($P < 0.01$), 达 106.5 pg/mL 。当加入抗炎药物吲

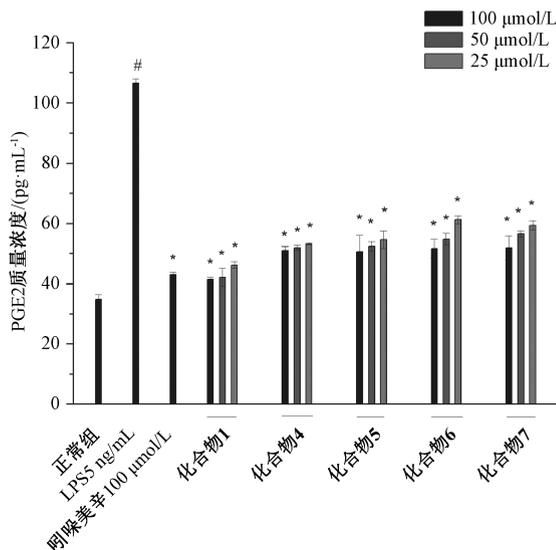


注: 与正常组比较, $\#P < 0.01$; 与 5 ng/mL LPS 组比较, $*P < 0.01$

图 2 化合物 1、4~7 对 NO 表达水平的影响

Fig. 2 Effects of compounds 1, 4-7 on the level of NO expression

哚美辛和化合物 1、4~7 均能显著抑制 LPS 诱导产生的 PGE2 表达 ($P < 0.01$), 其中化合物 1 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 LPS 诱导的 PGE2 的抑制效果最佳, 此时细胞上清中的 PGE2 的含有量为 41.4 pg/mL , 且山柰酚对 LPS 诱导的 PGE2 的抑制作用均优于其苷类化合物。



注: 与正常组比较, $\#P < 0.01$; 与 5 ng/mL LPS 组比较, $*P < 0.01$

图 3 化合物 1、4~7 对 PGE2 表达水平的影响

Fig. 3 Effects of compounds 1, 4-7 on the level of PGE2 expression

4.2.2.3 对 iNOS、COX-2 蛋白表达的抑制作用 图 4~5 表明, 在 RAW264.7 细胞中, 无刺激时, 细胞中 iNOS、COX-2 的表达量较低; LPS 刺激能

够引起 iNOS、COX-2 蛋白表达水平显著提高；加入山柰酚类化合物以后，细胞中 iNOS、COX-2 的表达量显著降低，随着化合物的浓度增大其作用效果增强。结果表明化合物 **1**、**4~7** 能够很好的抑制

LPS 引起的 iNOS、COX-2 的表达，并呈现出剂量依赖性。在化合物 **1**、**4~7** 中，山柰酚本身对 iNOS、COX-2 蛋白的抑制能力最好，随着 3 位羟基被取代其活性逐渐变弱。

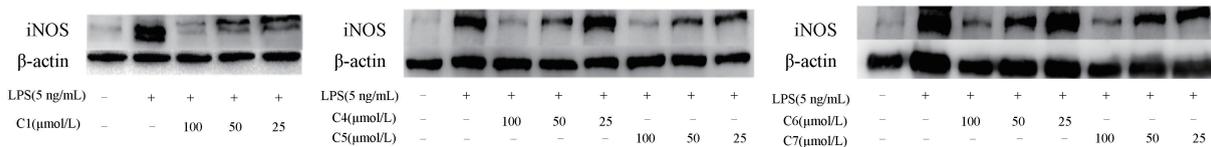


图 4 化合物 1、4~7 对 iNOS 的抑制作用

Fig. 4 Effects of compounds 1, 4-7 on the inhibition to iNOS

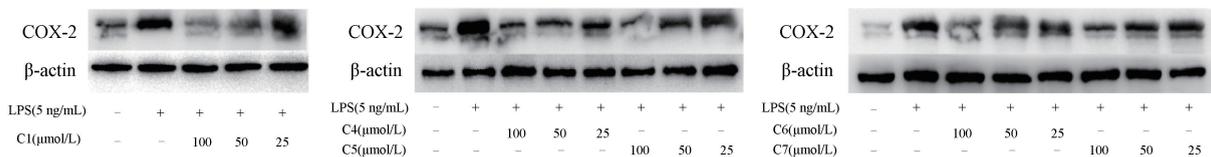


图 5 化合物 1、4~7 对 COX-2 的抑制作用

Fig. 5 Effects of compounds 1, 4-7 on the inhibition to COX-2

4.2.2.4 化合物 **1**、**4~7** 对 NF-κB 相关蛋白 P65 的抑制作用 在细胞中 NF-κB 通常以失活状态存在，但当细胞暴露于外来刺激如有丝分裂原、炎性细胞因子、LPS 时会引起 IKK 复合体快速将 IκB 磷酸化继而泛素化，随后被相应蛋白酶降解，此时 NF-κB 结构中的核定位信号被暴露，进而激活促炎细胞因子如 TNF-α、IL-6 等靶基因的转录过程，同时体外实验已证明 NF-κB 可调节巨噬细胞分泌炎

性因子的水平^[16]。图 6 表明，LPS 刺激能够引起 NF-κB 蛋白表达水平显著提高；加入化合物 **1**、**4~7** 后，细胞中 NF-κB 的表达量显著降低，随着化合物的浓度增大其作用效果增强，呈现出剂量依赖性。结果表明化合物 **1**、**4~7** 能够很好的抑制 LPS 引起的 NF-κB 的表达；并且山柰酚本身对 NF-κB 蛋白的抑制能力较其苷类更佳，随着 3 位羟基被取代其活性减弱。

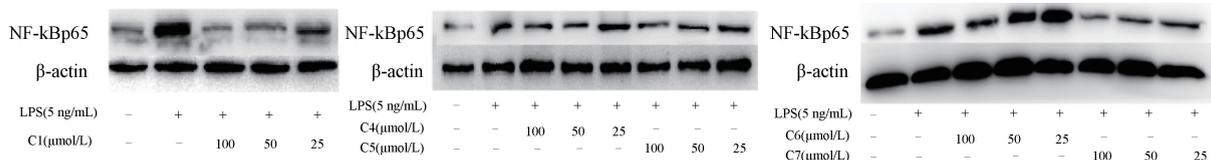


图 6 化合物 1、4~7 对 NF-κB 相关蛋白 P65 的抑制作用

Fig. 6 Effects of compounds 1, 4-7 on the inhibition to P65 of NF-κB

5 结论

核转录因子 (NF-κB) 可调节控制细胞增殖或生长、炎症反应、细胞粘附等基因的表达，能够与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链的增强子序列发生相互作用，是转录激活过程中实现信号转导的关键因子之一^[17]。由于 NF-κB 能诱导包括许多炎症反应和肿瘤相关基因 [如环氧合酶-2 (COX-2) 基因、诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 基因、基质金属蛋白酶 (MMP-9)、抗凋亡基因、促炎分子基因等] 的表达，而导致炎症或肿瘤的发生，从而成为医药领域中发现有效抗炎、抗肿瘤药物的重要靶点^[18-19]。

本研究采用植物化学和波谱学相结合的技术，从油茶枯乙醇提取物的乙酸乙酯和正丁醇部位分离并鉴定了 7 个黄酮类化合物，其中化合物 **1**、**4~7** 为山柰酚类化合物。化合物 **4** 为首次从该植物中分离得到。随后建立脂多糖 (LPS) 诱导巨噬细胞 RAW264.7 产生炎症的细胞筛选模型，结果表明化合物 **1**、**4~7** 均可显著抑制 NO、PGE2 在细胞内的浓度；能抑制 RAW 264.7 细胞中 NF-κB 的活性，以及下调诱导型诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 和环氧合酶-2 (COX-2) 的表达。其可作为炎症介质或因子的抑制剂而抗炎药物的开发上具有良好发展前景。

参考文献:

[1] 高石花, 黎国庆, 覃江克, 等. 油茶枯多糖的水提工艺及纯化研究[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 191-194, 195.
[2] 李怡杰, 陆海南, 覃江克, 等. 微波辅助提取油茶枯中膳食纤维的工艺优化[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 188-192.
[3] 黎国庆, 李盛宣, 覃江克, 等. 油茶枯中皂素和多糖的综合提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(3): 70-73.
[4] Gao D F, Xu M, Zhao P, et al. Kaempferol acetylated glycosides from the seed cake of *Camellia oleifera*. [J]. *Food Chem*, 2011, 124(2): 432-436.
[5] 干 丽, 李嘉滢, 蔡帧艳, 等. 茶枯饼主要化学成分的研究及综合利用[J]. 中兽药, 2013, 11(11): 823-826.
[6] Ye Y, Guo Y, Luo Y T, et al. Isolation and free radical scavenging activities of a novel biflavonoid from the shells of *Camellia oleifera* Abel[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1585-1589.
[7] Chen J H, Wu H Y, Liu B C, et al. Identification and evaluation of antioxidants defatted *Camellia oleifera*, seeds by isopropanol salting-out pretreatment[J]. *Food Chem*, 2010, 121(4): 1246-1254.
[8] Zhou H, Wang C Z, Ye J Z, et al. New triterpene saponins from the seed cake of *Camellia Oleifera*, and their cytotoxic activity[J]. *Phytochem Lett*, 2014, 8(1): 46-51.
[9] 刘晓慧. 油茶籽活性成分抗炎机理研究[D]. 杭州: 浙江大

学, 2014.
[10] 罗永明, 李 斌, 谢一辉. 油茶化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(2): 117-118.
[11] 高 雯, 沈 阳, 张红军, 等. 委陵菜的化学成分研究[J]. 药学服务与研究, 2007, 7(4): 262-264.
[12] 李怡杰. 四方藤水溶性化学成分的提取分离、结构鉴定与生物活性的研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.
[13] Zhou S X, Yao Z R, Li J, et al. Flavonoids from the leaves of *Ilex cornuta*[J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(2): 84-87.
[14] 周志宏, 杨崇仁. 云南普洱茶原料晒青毛茶的化学成分[J]. 云南植物研究, 2000, 22(3): 343-350.
[15] Sekine T, Arita J, Yamaguchi A, et al. Two flavonol glycosides from seeds of *Camellia sinensis*[J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(3): 991-995.
[16] Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(6): 280-288.
[17] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism[J]. *Cell*, 1986, 47(6): 921-928.
[18] Karin M. Nuclear factor-kB in cancer development and progression[J]. *Nature*, 2006, 441 (7092): 431-436.
[19] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kB puzzle[J]. *Cell*, 2002, 109(2): S81-S96.

短管兔耳草化学成分的研究

张晨辉, 李 敏*, 曾金祥*, 谢雄雄, 毛 竹, 钟国跃
(江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西南昌 330004)

摘要: 目的 研究短管兔耳草 *Lagotis breviflora* Maxim 的化学成分。方法 短管兔耳草 70% 乙醇提取物采用硅胶、Sephadex LH-20、MCI 柱和制备液相色谱进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。结果 从中分离得到 10 个化合物, 分别鉴定为 3, 4-二甲氧基苯甲醛 (1)、3, 4-二甲氧基苯丙酸 (2)、阿魏酸甲酯 (3)、邻苯二甲酸二丁酯 (4)、木犀草素 (5)、柯伊利素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (6)、香叶木素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (7)、4-p-香豆酸-O-α-D-吡喃葡萄糖苷 (8)、4-p-香豆酸-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 (9)、6-O- [α-L- (3-3, 4-二甲氧基肉桂酰)-吡喃鼠李糖基]-梓醇 (10)。结论 化合物 2~4、8~10 为首次从该属分离得到, 化合物 1~4、8~10 为首次从该植物中分离得到。

关键词: 短管兔耳草; 化学成分; 分离鉴定

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)02-0333-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.018

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660648); 江西省自然科学基金项目 (20171BAB205090); 江西中医药大学民族药协同创新项目 (JXXT2018001, JXXT201402022); 江西中医药大学研究生创新专项资金项目 (JZYCI8S11)

作者简介: 张晨辉 (1992—), 男, 硕士生, 从事中药药效物质基础与质量控制研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: 416141946@qq.com

#共同第一作者: 李 敏 (1984—), 女, 讲师, 从事天然产物活性成分研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: 84492393@qq.com

***通信作者:** 曾金祥 (1974—), 男, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础与质量控制研究。Tel: (0791) 87119065, E-mail: zjinxiang@