

广东紫珠中的萜类化合物及其抗炎活性

黄逸敏,袁 欢,陈 萍,王 涛,彭光天,吴爱芝*

广州中医药大学中药学院,广州 510006

摘要:对岭南药材广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis*)地上部分进行化学成分研究,得到 11 个萜类化合物,分别鉴定为 sambucunlin A(**1**)、2 α -羟基羽扇豆醇(**2**)、swinhoeic acid(**3**)、3 β -羟基-乌苏烷-11-烯-13 β ,28-内酯(**4**)、蔷薇酸(**5**)、2 α ,3 β ,6 β ,18 β ,23-pentahydroxy-olean-12-en-28-oic acid(**6**)、rel-5-(3S,8S-dihydroxy-1R,5S-dimethyl-7-oxa-6-oxobicyclo-oct-8-yl)-3-methyl-2Z,4E-pentadienoic acid(**7**)、salvionoside B(**8**)、齐墩果酸(**9**)、白桦脂酸(**10**)和 α -香树脂醇(**11**)。其中,化合物 **1**~**4** 和 **6**~**8** 为首次从该属植物中分离得到。在化学成分分离基础上,进一步选择脂多糖(LPS)诱导的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞炎症模型进行萜类化合物抗炎活性测试。结果表明:化合物 **3** 和 **9** 具有显著的抗炎活性,对比结构发现,三萜类化合物(**3**~**6**,**9** 和 **11**)抗炎活性优于倍半萜类化合物(**7** 和 **8**)。研究结果广东紫珠萜类成分在抗炎方面的临床应用提供了实验依据。

关键词:马鞭草科;广东紫珠;萜类;抗炎

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)1-0050-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.1.007

Terpenoids from *Callicarpa kwangtungensis* and their anti-inflammatory activity

HUANG Yi-min, YUAN Huan, CHEN Ping, WANG Tao, PENG Guang-tian, WU Ai-zhi*

School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Eleven terpenoids were isolated and purified from the ethanol extract of *Callicarpa kwangtungensis* of Lingnan Herbs. Based on spectral analysis and the comparison of literatures, these compounds were identified as sambucunlin A(**1**), 2 α -hydroxy-lupeol(**2**), swinhoeic acid(**3**), 3 β -hydroxy-urs-11-en-13 β ,28-olide(**4**), euscaphic acid(**5**), 2 α ,3 β ,6 β ,18 β ,23-pentahydroxy-olean-12-en-28-oic acid(**6**), rel-5-(3S,8S-dihydroxy-1R,5S-dimethyl-7-oxa-6-oxobicyclo-oct-8-yl)-3-methyl-2Z,4E-pentadienoic acid(**7**) and salvionoside B(**8**), oleanolic acid(**9**), betulinic acid(**10**), α -amyrin(**11**), respectively. Compounds **1-4**, **6-8** was firstly isolated from the genus of *Callicarpa*. Further the lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 mouse macrophages was explored as inflammatory model to measure the anti-inflammatory activity of the terpenoids. The experimental results revealed that compounds **3** and **9** had obvious anti-inflammatory activity. It was found that the anti-inflammatory activity of triterpenoids (**3-6**, **9** and **11**) was better than that of sesquiterpenoids (**7** and **8**). This study provided the experimental basis for the clinical application of *C. kwangtungensis* in anti-inflammatory fields.

Key words: Verbenaceae; *Callicarpa kwangtungensis*; terpenoids; anti-inflammatory activity

广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.)为马鞭草科紫珠属(*Callicarpa* L.)落叶灌木,是该属代表性药物植物,为岭南地区常用药材,主要分布在广东、广西、江西和湖南等地^[1]。该品种药材收录于2020版《中国药典》一部,具有收敛止血,散瘀,清热解毒等功效,常用于治疗衄血、咯血、吐血、便血、崩漏,外伤出血、肺热咳嗽、咽喉肿痛和热毒疮疡

等,是“抗宫炎”系列中成药的主要原料药材^[2]。此外,广东紫珠在长江以南地区还可用于日常茶饮。本课题组成员近几年来对紫珠属植物枇杷叶紫珠(*C. kochiana*)、全缘叶紫珠(*C. integrissima*)、裸花紫珠(*C. nudiflora*)、长柄紫珠(*C. longipes*)和广东紫珠(*C. kwangtungensis*)的化学成分进行了较为系统地研究^[3-7],发现萜类成分在该属植物中广泛存在,为该属植物中低极性部位的主要化学成分类型。经笔者系统查阅文献整理发现紫珠属植物中已报道的萜类成分有131种,其中三萜37种,二萜84种,倍半

收稿日期:2021-07-20 接受日期:2021-11-02

基金项目:国家自然科学基金(82073986)

*通信作者 Tel: 86-20-39358132; E-mail: wuaizhi@gzucm.edu.cn

萜 10 种。

一氧化氮(NO)是由 *L*-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)家族的作用下合成的一种自由基,在许多不同的生化过程中作为细胞信号分子发挥作用^[8]。近年来,越来越多的研究表明 NO 是炎症反应的关键标志物,在各种炎症疾病的发生发展过程中发挥关键作用,抑制过多 NO 的生成已成为治疗炎症性疾病的有效策略^[9]。现代药理研究表明,萜类化合物具有良好的抗炎生物活性^[10-12]。为了丰富广东紫珠中萜类成分的化学结构类型并为其后续药理活性研究奠定丰富的物质基础,本文将运用多种色谱方法对广东紫珠甲醇提取物中低极性部位的萜类化合物进行成分分离和结构鉴定。为了明确这些萜类成分的抗炎作用,将采用 LPS 诱导 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞建立体外炎症模型,运用 Griess 法评价广东紫珠中萜类成分的抗炎效果,初步分析萜类化合物结构对抗炎活性的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(德国安捷伦公司);DRX 400 型核磁共振仪(德国 Bruker);AB Sciex Triple TOF 5600⁺ 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(江苏苏净安泰公司);MCO-20AIC 型 CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司);光学倒置显微镜(重庆市奥利巴斯公司);Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

柱层析硅胶精制型、薄层层析硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工有限公司);Sephadex LH 20(GE Healthcare);地塞米松对照品(大连美伦生物科技有限公司);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);PBS 磷酸缓冲液(美国 Gibco 公司);双抗(10000U 青霉素和链霉素混合液)(美国 Gibco 公司);FBS 胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMSO 二甲基亚砷(分析纯,阿拉丁公司);MTT 噻唑蓝(美国 Sigma 公司);LPS 脂多糖(大连美伦生物科技有限公司);NO 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7):购自中国科学院上海细胞库。

实验所用广东紫珠栽培品于 2016 年购自于江西萍乡,经广州中医药大学中药鉴定学教研室彭光天老师鉴定为马鞭草科(Verbenaceae)紫珠属(*Callicarpa* L.)植物广东紫珠(*C. kwangtungensis* Chun.)。标本(NO. 20160715)存放于广州中医药

大学中药学院天然产物研究室。

1.2 提取与分离

将 12 kg 晾干的广东紫珠枝和叶粉碎过筛,用 120 L 甲醇进行渗漉提取,提取液合并减压浓缩后得到浸膏 1 kg,加 4 L 蒸馏水得到混悬液,随后依次分别用石油醚(3×4 L)、乙酸乙酯(3×4 L)、正丁醇(3×4 L)进行萃取,萃取液减压浓缩至干,得到石油醚部位 85 g,乙酸乙酯部位 108 g,正丁醇部位 400 g,水部位 260 g。

取广东紫珠甲醇提取物的乙酸乙酯萃取部位 108 g 经硅胶柱层析(200~300 目),依次石油醚/乙酸乙酯(1:0→0:1)梯度洗脱得到 7 个流分 Fr. A~G,其中,Fr. A 先经 Sephadex LH 20,氯仿/甲醇(1:1)洗脱,再经硅胶柱层析,石油醚/乙酸乙酯(200:1→100:1)多次洗脱,再经 Sephadex LH 20 柱层析纯化,甲醇洗脱,得化合物 **1**(15 mg)。Fr. B 先经 Sephadex LH 20,氯仿/甲醇(1:1)洗脱,再经硅胶柱层析,石油醚/乙酸乙酯(100:1→80:1);二氯甲烷/乙酸乙酯(50:1→30:1);石油醚/丙酮(12:1)洗脱,再经 Sephadex LH 20 柱层析纯化,甲醇洗脱,得化合物 **2**(20 mg)、**9**(125 mg)、**10**(12 mg)和 **11**(20 mg)。Fr. D 先经 Sephadex LH-20,氯仿/甲醇(1:1)洗脱,再经硅胶柱层析,二氯甲烷/甲醇(80:1);二氯甲烷/乙酸乙酯(20:1);石油醚/丙酮(10:1)多次洗脱,再经 Sephadex LH 20 柱层析纯化,以甲醇洗脱,得化合物 **3**(7 mg)。Fr. F 先经 Sephadex LH 20,氯仿/甲醇(1:1)洗脱,再经硅胶柱层析,二氯甲烷/甲醇(75:1);石油醚/丙酮(20:1)多次洗脱,再经 Sephadex LH 20 柱层析纯化,甲醇洗脱,得化合物 **4**(5.6 mg)和 **5**(15 mg)。Fr. G 先经 Sephadex LH 20,氯仿/甲醇(1:1)洗脱,再经硅胶柱层析,二氯甲烷/甲醇(60:1→40:1)多次洗脱,再经 Sephadex LH 20 柱层析纯化,甲醇洗脱,得化合物 **6**(33 mg)、**7**(5 mg)和 **8**(56 mg)。

1.3 抗炎活性测试

1.3.1 细胞活力实验

取对数生长期的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,设立对照组和 11 个实验组,每组 3 个复孔,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁。实验组加入 100 μ L 终浓度为 12.5、25.0 和 50.0 μ mol/L 的样品(对照组加入等体积的培养基)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L

MTT 溶液(避光操作)孵育 4 h,吸净上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷溶液,避光振荡 10 min,采用酶标仪在 490 nm 下测定 OD 值,计算细胞活力。

1.3.2 抗炎活性筛选

取对数生长期的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,同时设立空白组(control)、脂多糖组(lipopolysaccharide, LPS)、地塞米松组(dexamethasone, DEX)和实验组,每组 4 个复孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h 至细胞贴壁。实验组加入 100 μL 终浓度为 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 的样品(空白组和 LPS 组加入等体积的培养基)孵育 2 h,再加入 1 μL 终浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 刺激(空白组加入等体积培养基)24 h,用 Griess 法测定上清液中 NO 的含量。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色固体;ESI-MS: m/z 665 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.68 (1H, br s, Ha-29), 4.57 (1H, br s, Hb-29), 4.45 (1H, m, H-3), 1.68 (3H, s, 30- CH_3), 1.0 ~ 2.5 (28H, H-2' ~ H-15'), 1.03 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-27), 0.85 (3H, s, H-25), 0.84 (9H, s, H-23, H-24, H-28), 0.78 (3H, s, H-16'); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 173.9 (C-1'), 151.1 (C-20), 109.5 (C-29), 80.8 (C-3), 55.5 (C-5), 50.5 (C-9), 48.4 (C-19), 48.2 (C-18), 43.1 (C-17), 42.9 (C-14), 41.0 (C-8), 40.1 (C-22), 38.5 (C-1), 38.2 (C-13), 38.0 (C-4), 37.2 (C-10), 35.7 (C-16), 35.0 (C-2'), 34.3 (C-7), 32.1 (C-3'), 30.0 (C-4'), 29.8 (C-21), 29.8 (4 CH_2 , C-5' ~ C-8'), 29.7 (C-10'), 29.6 (C-9'), 29.5 (C-11'), 29.4 (C-12'), 29.3 (C-13'), 28.1 (C-23), 27.6 (C-15), 25.3 (C-12), 25.2 (C-14'), 23.9 (C-2), 22.9 (C-15'), 21.1 (C-11), 19.4 (C-30), 18.3 (C-6), 18.2 (C-28), 16.7 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 14.3 (C-16')。以上数据与文献^[13]基本报道一致,故鉴定化合物为 sambucunlin A (结构见图 1)。

化合物 2 白色针晶;ESI-MS: m/z 443 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.74 (1H, s, H-29a), 4.61 (1H, s, H-29b), 3.19 (1H, m, H-3), 3.00 (1H, m, H-2), 1.69 (3H, s, H-30), 1.25 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-24), 0.75 (3H, s, H-28); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 150.2 (C-20), 109.5 (C-29), 78.8

(C-3), 56.1 (C-2), 55.2 (C-5), 50.3 (C-9), 49.1 (C-18), 46.7 (C-19), 42.3 (C-8), 40.5 (C-22), 38.7 (C-14), 38.5 (C-17), 38.2 (C-1), 37.0 (C-4), 36.9 (C-16), 34.1 (C-10), 34.0 (C-13), 32.0 (C-7), 30.4 (C-21), 29.5 (C-23), 27.8 (C-15), 27.2 (C-12), 25.3 (C-11), 20.7 (C-30), 19.2 (C-6), 18.1 (C-28), 16.0 (C-24), 15.9 (C-25), 15.2 (C-26), 14.5 (C-27)。以上数据与文献^[14]基本报道一致,故鉴定化合物为 2 α -hydroxy-lupeol。

化合物 3 白色粉末;ESI-MS: m/z 487 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.97 (1H, s, H-12), 5.65 (1H, s, H-11), 5.36 (1H, s, H-18), 4.05 (1H, s, H-2), 3.45 (1H, s, H-3), 2.13 (3H, s, H-29); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 213.1 (C-19), 180.8 (C-28), 144.4 (C-13), 130.6 (C-12), 128.3 (C-11), 126.6 (C-18), 79.7 (C-3), 67.1 (C-2), 54.7 (C-5), 48.5 (C-9), 48.0 (C-10), 47.6 (C-11), 42.3 (C-1), 42.0 (C-14), 41.5 (C-8), 39.1 (C-4), 38.84 (C-22), 38.75 (C-10), 32.6 (C-7), 29.0 (C-24), 28.2 (C-29), 27.5 (C-21), 26.6 (C-16), 23.5 (C-15), 22.0 (C-27), 20.7 (C-25), 19.6 (C-6), 18.6 (C-23), 17.2 (C-26), 17.1 (C-30)。以上数据与文献^[15]报道基本一致,故鉴定该化合物为 swinhoeic acid。

化合物 4 白色固体;ESI-MS: m/z 452 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.96 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-12), 5.53 (1H, dd, J = 10.3, 3.1 Hz, H-11), 3.22 (1H, dd, J = 11.3, 5.0 Hz, H-3), 2.12 (1H, dd, J = 13.2, 5.8 Hz, H-18), 1.16 (3H, s, H-27), 1.05 (3H, s, H-26), 1.00 (6H, d, J = 5.9 Hz, H-23, 29), 0.93 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-24); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 180.1 (C-28), 133.6 (C-12), 128.9 (C-11), 89.8 (C-13), 79.0 (C-3), 60.7 (C-18), 54.9 (C-5), 53.2 (C-9), 45.2 (C-17), 41.8 (C-8), 40.4 (C-14), 40.3 (C-20), 39.1 (C-4), 38.4 (C-1), 38.3 (C-19), 36.5 (C-10), 31.5 (C-22), 31.4 (C-7), 30.8 (C-21), 27.9 (C-23), 27.1 (C-2), 25.7 (C-15), 22.8 (C-16), 19.3 (C-30), 19.0 (C-26), 18.1 (C-25), 18.0 (C-29), 17.7 (C-6), 16.3 (C-27), 15.1 (C-24)。以上数据与文献^[16]基本报道一致,故鉴定为 3 β -羟基-乌苏烷-11-烯-13 β ,28-内酯。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS: m/z 489 $[\text{M} +$

$\text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 5.60 (1H, s, H-12), 4.94 (1H, dt, $J = 11.0$ Hz, H-2), 4.24 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3), 3.71 (1H, s, H-18), 1.69 (3H, s, H-27), 1.59 (3H, s, H-29), 1.37 (3H, s, H-24), 1.06 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-25), 1.06 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-30), 0.85 (3H, s, H-23); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 181.4 (C-28), 140.7 (C-13), 128.7 (C-12), 80.1 (C-3), 73.4 (C-19), 66.9 (C-2), 55.3 (C-18), 49.5 (C-5), 49.0 (C-17), 48.4 (C-9), 43.6 (C-14), 43.1 (C-20), 42.9 (C-1), 41.3 (C-8), 39.6 (C-4), 39.5 (C-10), 39.4 (C-22), 34.3 (C-7), 30.2 (C-23), 29.9 (C-15), 27.8 (C-29), 27.7 (C-21), 27.1 (C-16), 25.4 (C-27), 24.8 (C-11), 23.0 (C-24), 19.4 (C-6), 18.0 (C-26), 17.5 (C-25), 17.4 (C-30)。以上数据与文献^[17]报道基本一致,故鉴定为 euscaphic acid。

化合物 6 白色粉末; ESI-MS: m/z 521 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 5.66 (1H, br s, H-12), 5.12 (1H, br s, H-6), 4.43 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-18), 4.28 (1H, dd, $J = 10.8, 4.0$ Hz, H-3), 4.09 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-2), 3.67 (2H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23a, 23b), 1.85 (3H, s, H-24), 1.78 (3H, s, H-25), 1.71 (3H, s, H-26), 1.62 (3H, s, H-27), 1.21 (3H, s, H-29), 1.14 (3H, s, H-30); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 181.0 (C-28), 144.4 (C-13), 123.2 (C-12), 81.4 (C-18), 78.6 (C-3), 69.3 (C-2), 68.2 (C-6), 66.4 (C-23), 50.0 (C-5), 49.4 (C-9), 46.3 (C-17), 45.1 (C-19), 44.8 (C-4), 42.9 (C-14), 41.5 (C-1), 41.2 (C-7), 39.8 (C-8), 38.6 (C-10), 35.9 (C-20), 33.9 (C-22), 29.4 (C-21), 29.3 (C-15), 29.1 (C-30), 28.4 (C-16), 25.1 (C-29), 24.6 (C-27), 28.6 (C-11), 19.0 (C-26), 18.6 (C-25), 16.1 (C-24)。以上数据与文献^[18]基本报道一致,故鉴定为 $2\alpha, 3\beta, 6\beta, 18\beta, 23$ -pentahydroxy-olean-12-en-28-oic acid。

化合物 7 白色粉末; ESI-MS: m/z 296 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 8.01 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-4), 6.43 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-5), 5.84 (1H, s, H-2), 3.85 (1H, m, H-3'), 2.27 (1H, ddd, $J = 13.0, 7.0, 1.0$ Hz, H-2'a), 2.09 (3H, s, H-3), 1.91 (1H, dd, $J = 14.7, 7.6$ Hz, H-4'a), 1.85 (1H, dd, $J = 13.0, 10.0$ Hz, H-2'β), 1.74 (1H, dd, $J = 13.0, 10.5$ Hz, H-4'b), 1.35 (3H, s, H-1'), 1.08

(3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 181.4 (C-6'), 150.1 (C-3), 133.6 (C-4), 132.2 (C-5), 121.6 (C-2), 90.2 (C-1'), 83.1 (C-8'), 65.6 (C-3'), 53.8 (C-5'), 42.6 (C-2'), 41.3 (C-4'), 21.3 (3- CH_3), 18.8 (1'- CH_3), 14.9 (5'- CH_3)。以上数据与文献^[19]报道基本一致,故鉴定化合物为 rel-5-(3S, 8S-dihydroxy-1R, 5S-dimethyl-7-oxa-6-oxobicyclo-oct-8-yl)-3-methyl-2Z, 4E-pentadienoic acid。

化合物 8 黄色固体; ESI-MS: m/z 501 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.90 (1H, s, H-4), 5.72 (1H, dd, $J = 15.1, 9.3$ Hz, H-7), 5.57 (1H, dd, $J = 15.1, 7.8$ Hz, H-8), 5.32 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1"), 4.45 (1H, m, H-9), 4.33 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 4.03 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, Hb-4"), 3.87 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2"), 3.84 (1H, dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz, Ha-6'), 3.69 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, Ha-4"), 3.54 ~ 3.67 (3H, Ha-6', H-2, 5"), 3.35 (1H, br t, $J = 7.8$ Hz, H-3'), 3.11 (1H, m, H-5'), 2.70 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-6), 2.48 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-2b), 2.05 (1H, d, $J = 16.6$ Hz, H-2a), 1.98 (3H, s, H-13), 1.28 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-10), 1.03 (3H, s, H-11), 0.99 (3H, s, H-12); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 202.2 (C-3), 169.7 (C-5), 136.8 (C-8), 130.9 (C-7), 126.0 (C-4), 103.7 (C-1''), 100.9 (C-1'), 77.9 (C-3'), 77.8 (C-2'), 77.8 (C-5'), 77.5 (C-3''), 75.0 (C-4''), 74.6 (C-9), 74.5 (C-2''), 71.4 (C-4'), 62.5 (C-6'), 62.5 (C-5''), 56.5 (C-6), 47.8 (C-2), 37.2 (C-1), 28.8 (C-12), 27.3 (C-11), 26.4 (C-13), 21.7 (C-10)。以上数据与文献^[20]基本报道一致,故鉴定化合物为 salvionoside B。

化合物 9~11 均为白色无定形粉末; ESI-MS: m/z 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 456 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 427 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 用两种不同溶剂系统展开,分别与齐墩果酸、白桦脂酸和 α -香树脂醇对照品薄层色谱 R_f 值相同,经 HPLC 分析,分别与各对照品保留时间一致,依次确定化合物 9 为齐墩果酸,化合物 10 为白桦脂酸,化合物 11 为 α -香树脂醇。

2.2 萜类化合物的抗炎活性

2.2.1 萜类化合物对 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞活力的影响

MTT 试验检测 11 个萜类化合物分别在不同浓度时对 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞活力的影响,结果如表 1 所示。

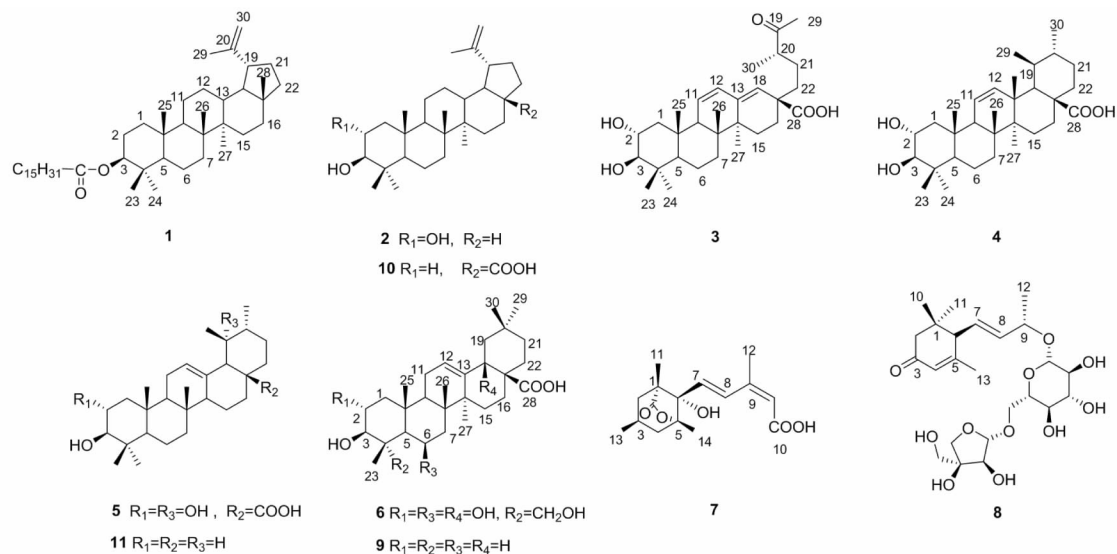


图1 化合物1~11的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-11

表1 11个萜类化合物对 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞活力的影响

Table 1 Effects of eleven terpenoids on the cell viability of RAW 264.7 mouse macrophages

化合物 Compound	浓度 Concentration (μmol/L)		
	12.5	25	50
1	95.57 ± 2.23	87.00 ± 4.16	102.1 ± 2.78
2	33.44 ± 2.95	29.98 ± 1.66	26.20 ± 4.54
3	97.46 ± 0.70	96.22 ± 2.11	97.14 ± 1.38
4	160.8 ± 1.90	170.0 ± 6.80	196.9 ± 1.83
5	166.6 ± 0.78	135.4 ± 1.51	165.8 ± 1.57
6	171.7 ± 2.55	129.0 ± 3.50	152.2 ± 1.03
7	112.8 ± 5.60	120.9 ± 0.17	122.6 ± 13.9
8	152.6 ± 16.0	158.8 ± 7.29	165.5 ± 11.9
9	91.41 ± 9.62	92.92 ± 1.47	86.33 ± 13.6
10	29.06 ± 1.80	21.40 ± 6.27	29.44 ± 17.0
11	111.0 ± 2.10	121.4 ± 4.47	128.5 ± 6.30
地塞米松 Dexamethasone *	97.89 ± 0.10	126.3 ± 5.20	112.2 ± 6.21

注:数据用均数 ± 标准差表示(n = 3);* 阳性对照。
Note: Data are expressed as mean ± SD (n = 3); * Positive control.

化合物1、3~9和11浓度在12.5~50.0 μmol/L范围内对RAW 264.7小鼠巨噬细胞增殖无明显抑制作用,化合物2和10显示有明显毒副作用。结果表明,除化合物2和10外,其他萜类化合物在12.5~50.0 μmol/L范围内对RAW 264.7小鼠巨噬细胞无细胞毒性,因此选取化合物1、3~9和11进行抗炎活性测试。

2.2.2 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞中 NO 的含量

Griess 法检测9个萜类化合物抑制RAW 264.7细胞中NO的释放水平,结果如图2所示。

LPS 作用于 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞后,细胞上清液中 NO 含量明显增加,与空白组比较,具有显著性差异(P < 0.01),说明模型诱导成功。与模型组比较,阳性药作用于细胞后,NO 含量显著降低(P < 0.001)。与模型组相比,广东紫珠中分离得到的9个萜类化合物均能不同程度地抑制 NO 释放,其中化合物3和9抑制能力尤为显著(P < 0.001, P < 0.01, P < 0.05)。实验结果表明化合物3和9具有显著的抗炎活性,且三萜类化合物(3~6、9和11)抗炎活性优于倍半萜类化合物(7和8),对比三萜

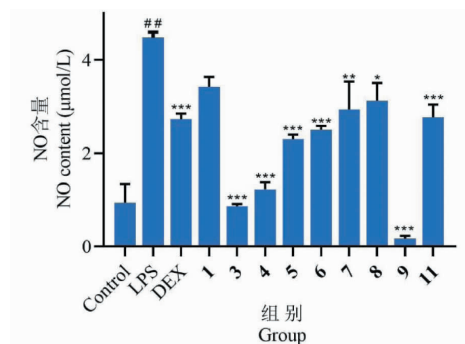


图2 9个萜类化合物对 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞 NO 含量的影响

Fig. 2 The effect of nine terpenoids on NO production in RAW 264.7 mouse macrophages

注:与空白组比较,## $P < 0.01$;与 LPS 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note: Compared with control,## $P < 0.01$;Compared with LPS,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

类化合物结构发现,推测三萜类化合物中 3 位羟基取代和 28 位羧基取代会协同增强抗炎活性。

3 讨论与结论

本实验从广东紫珠地上部分的甲醇提取物中低极性部位中分离鉴定了 11 个萜类化合物,其中三萜类成分 9 个,倍半萜类成分 2 个。其中,化合物 1、2 和 10 为羽扇豆烷型,化合物 6 和 9 为齐墩果烷型,化合物 3~5 和 11 为乌苏烷型,化合物 7 为倍半萜内酯类,化合物 8 为降倍半萜类。本文首次从马鞭草科紫珠属植物分离得到 E 环开裂的三萜类化合物 swinhoeic acid,查阅文献发现其研究报道较少,分布在蔷薇科的悬钩子属、蔷薇属、无尾果属和委陵菜属植物中,广东紫珠中该化合物的首次发现对于从化学结构分类学角度探讨植物的归属具有重要的指导意义。在化学成分分离的基础上,采用 LPS 诱导的 RAW 264.7 小鼠巨噬细胞建立体外炎症模型对 11 个萜类化合物进行抗炎活性测试。细胞增殖实验结果表明:在 12.5 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,化合物 2 和 10 对细胞增殖有显著抑制作用,其余萜类化合物对细胞增殖无明显抑制作用。随后选取化合物 1、3~9 和 11 进行抗炎活性测试,结果表明化合物 3 和 9 具有显著的抗炎活性,三萜类化合物 3 位羟基取代和 28 位羧基取代是化合物发挥抗炎活性的关键因素。研究结果为广东紫珠萜类成分抗炎机制的深入探讨提供了思路,并为广东紫珠在抗炎方面的临床应用提供了实验依据。

参考文献

1 Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. The Flora of China(中国植物志)[M]. Beijing:

Science Press,2004,65:74-75.

- Chinese Pharmacopoeia Commission Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press,2020,44.
- Lin CZ, Zhu CC, Zhao ZX, et al. Two new abietane diterpenoids from the caulis and leaves of *Callicarpa kochiana*[J]. Fitoterapia,2012,83:1-5.
- Zhu CC, Gao L, Zhao ZX, et al. Triterpenes from *Callicarpa integerrima* Champ[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2012,47:77-83.
- Xia YY. The pharmacokinetic study of three phenylethanoid glycosides in *Callicarpa nudiflora*[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学),2015.
- Yang ZY, Yuan H, Zhou Y, et al. Phenylpropanoid compounds isolated from *Callicarpa kwangtungensis* and antibacterial activity research[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1928-1933.
- Gao L, Lin CZ, Zhu CC. Chemical constituents of *Callicarpa longipes*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2011,42:1289-1292.
- Anavi S, Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions[J]. Free Radic Biol Med,2020,146:16-35.
- Oishi K, Matsunaga K, Shirai T, et al. Role of Type 2 inflammatory biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Clin Med,2020,9:2670.
- Zhou DX, Huang X, Liu W, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory constituents from the bark of *Streblus zeylanicus*[J]. Fitoterapia,2020,147:104770.
- Xing HH, An LJ, Song ZT, et al. Anti-inflammatory ent-kaurane diterpenoids from *Isodon serra*[J]. J Nat Prod,2020,83:2844-2853.

- 12 Xu YZ, Wei HB, Gao JM. Natural terpenoids as neuroinflammatory inhibitors in LPS-stimulated BV-2 microglia[J]. Mini-Rev Med Chem, 2021, 21:520-534.
- 13 Lin CN, Tome WP. Antihepatotoxic principles of *Sambucus formosana*[J]. Planta Med, 1988, 54:223-224.
- 14 Lu YS. Studies on the chemical constituents of the stems of *Celastrus paniculatus* Willd[D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College(中国协和医科大学), 2007.
- 15 Zhao WQ, Ding LS, Zhang Q, et al. A novel ursane triterpene from *Rubus swinhoei*[J]. Chin Chem Lett, 2001, 12: 245-246.
- 16 Tan BX, Peng GT, Yu S, et al. Chemical constituents of *Aedonosma glutinosum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48:2024-2027.
- 17 Jiang CX, Mao JH, Wang WY, et al. Chemical constituents of traditional She medicine Rubi Radix et Rhizoma[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47:3370-3373.
- 18 Qiao A, Wang Y, Xiang L, et al. Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities[J]. J Funct Foods, 2015, 13:308-313.
- 19 Du BZ, Zhang HXG, Yang XY, et al. Chemical constituents from stems of *Ilex asprella*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42:4154-4158.
- 20 Takeda Y, Zhang H, Matsumoto T, et al. Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*[J]. Phytochemistry, 1997, 44: 117-120.

大黄酸通过巨噬细胞激活的串扰调控肠道炎症中 氧化还原介导的 Nlrp3 炎症小体的激活

巨噬细胞浸润和激活是急性结肠炎的关键步骤。巨噬细胞中氧化还原介导的 Nlrp3 炎症小体激活在介导结肠炎症反应中起着关键作用。从大黄根茎中分离出的大黄酸具有较强的抗炎作用。然而,其在调节急性结肠炎症中的作用尚未得到研究。

来自澳门大学的王一涛及其团队研究了大黄酸在急性肠道炎症期间的保护机制及其对巨噬细胞活化的调节。结果发现大黄酸通过 Nlrp3 炎症小体干扰其在巨噬细胞中的复合物组装,降低 IL-1 β 的分泌。大黄酸还通过激活 Nrf2-HO1-NQO1 通路,抑制 Nox2 亚单位的表达和易位以调节氧化还原平衡。此外,大黄酸通过介导巨噬细胞从 M1 表型向 M2 表型的极化来减轻炎症反应。NF- κ B、AP-1 和 MAPK 信号通路也参与了大黄酸改善炎症的过程。在患有急性肠道炎症的小鼠中,大黄酸治疗改善了临床症状,减少巨噬细胞浸润到受损组织中,从而减轻结肠炎症。这些发现为调节胃肠道疾病粘膜炎症的药物发现提供了一种有前景的策略。相关研究发表在《British Journal of Pharmacology》杂志上。

胡乃华编译自:<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15773>

原文标题: Rhein regulates redox-mediated Nlrp3 inflammasome activation in
intestinal inflammation through macrophage-activated crosstalk