

尾叶香茶菜总二萜的抗炎活性及其 LC-MS 成分分析

姜春保¹, 曾孝玉^{1,3}, 聂慧¹, 刘洪川², 汤建^{1*}, 欧阳臻¹, 陈海生²

¹江苏大学药学院, 镇江 212013; ²第二军医大学药学院, 上海 200433; ³华中科技大学同济医学院, 武汉 430030

摘要: 本文测定了尾叶香茶菜总二萜抗炎活性, 并进行初步成分分析。使用小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7 考察二萜类成分对肿瘤坏死因子(TNF- α)表达的影响以及对二甲苯诱导的小鼠耳肿胀的抑制作用。用液相色谱-质谱联用技术鉴定出总二萜中的 6 种成分。结果表明, 尾叶香茶菜总二萜和尾叶香茶菜丙素(KA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可明显降低脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞炎症因子表达, 抑制炎症反应。与空白对照组比较, 乙醇提取物、总二萜和尾叶香茶菜丙素的高剂量组小鼠耳肿胀明显降低, 低剂量组也有降低趋势, 其中乙醇提取物低剂量组的抗肿胀作用接近吲哚美辛(Indo, 25 mg/kg)。

关键词: 尾叶香茶菜; 总二萜; 抗炎活性; 液相色谱-质谱联用技术

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

Anti-inflammatory Activity of Total Diterpenoids in *Rabdosia excisa* and Its LC-MS Analysis

JIANG Chun-bao¹, ZENG Xiao-yu^{1,3}, NIE Hui¹, LIU Hong-chuan², TANG Jian^{1*}, OUYAN Zhen¹, CHEN Hai-sheng²

¹College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ²College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ³Tongji medical college, Huazhong university of science and technology, Wuhan 430030, China

Abstract: The anti-inflammatory activity and constituents of total diterpenoids in *Rabdosia excisa* were evaluated. Anti-inflammatory action of total diterpenoids was carried out by the macrophage RAW264.7 cells and ear edema induced by dimethylbenzene in mice. The chemical constituents of total diterpenoids fraction were identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The results indicated that total diterpenoids and kamebakaurin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) could reduce significantly lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage inflammatory cytokine. Compared with control group, the high dose groups significantly reduced the swelling induced by dimethylbenzene in mice. The low dose group had the tendency of inhibition, and ethanol extract (low dose, 100 mg/kg) showed the inhibition closing to indomethacin (Indo, 25 mg/kg).

Key words: *Rabdosia excisa*; total diterpenoids; anti-inflammatory activity; LC-MS

尾叶香茶菜 *Rabdosia excisa* (Maxim.) Hara 为唇形科(Labiatae)植物, 又名龟叶草、狗日草、野苏子, 性凉味甘, 广泛分布于我国的吉林、辽宁与河南等省份^[1]。在民间长期以来被用来治疗风湿感冒、咽喉肿痛、胃炎、关节疼痛、癌症初起及蛇虫咬伤。尾叶香茶菜其主要活性成分为贝壳杉烯型二萜, 目前分离得 30 余种二萜类化合物^[2], 这些化合物具有良好的抑制肿瘤^[3]以及抗炎活性^[4,5]。为了考察尾叶香茶菜总二萜的抗炎活性以及多种二萜类成分之间可能存在的协同作用, 本实验采用 RAW264.7 细

胞模型和小鼠模型, 对尾叶香茶菜总二萜的抗炎活性进行研究, 并用液相色谱-质谱联用法对其成分进行分析鉴定。

1 材料和方法

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司); Thermo LXQ 质谱仪(赛墨飞世尔科技有限公司); PCR 热循环仪(美国 ABI 公司); 电泳仪和电泳槽(上海康华生化仪器有限公司); 紫外凝胶成像系统(美国 UVP 公司)

1.2 试剂

尾叶香茶菜 95% 乙醇提取物、总二萜(总二萜含量 51.4%) 和 KA(本实验室制得); 小牛血清(赛

收稿日期: 2013-10-21 接受日期: 2014-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(21272269, 81072985); 国家博士后基金(2012M521023)

* 通讯作者 Tel: 86-511-85038201; E-mail: jt_u@hotmail.com

墨飞世尔生物化学制品(北京)有限公司); RPMI1640 培养基(赛墨飞世尔生物化学制品(北京)有限公司); 总核糖核酸(RNA)提取试剂盒(南京生兴生物技术有限公司); Turbo Script 逆转录第一链 cDNA 试剂盒(北京原平皓生物技术有限公司)

1.3 抑制二甲苯致小鼠耳肿胀试验

参考文献^[6], 取 ICR 小鼠 80 只, 体重 18 ~ 22 g, 随机分成 8 组。空白对照组、阳性对照组(Indo, 25 mg/kg)、给药组(95% 乙醇提取物、总二萜、KA), 灌胃给药 1 h 后, 于小鼠右耳涂二甲苯致炎, 30 min 后颈椎脱臼致死。剪下双耳, 用 $\Phi 7$ mm 打孔器打下圆耳片。以左右耳重量之差为肿胀度, 计算抑制率:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白组与给药组平均肿胀度之差}}{\text{空白组平均肿胀度}} \times 100\%$$

1.4 二萜抑制 TNF- α mRNA 表达试验

1.4.1 细胞培养及总 RNA 提取

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞由本实验室保存。用 RPMI1640 培养基, 体积分数 5% CO₂, 37 °C 条件下传代培养。取生长状态良好的 RAW264.7 细胞, 质量分数 0.25% 胰酶消化, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞浓度为 5×10^9 /L, 接种到 24 孔培养板内, 待细胞生长至 80% 融合后, 加入不同的样品(总二萜和 KA 的浓度都为 100 μ g/mL) 培养 1 h 后, 再加入 1 mL 含 LPS(终浓度为 5 μ g/mL) 的 RPMI1640 培养液进行刺激。培养 6 h 后弃上清液, 提取细胞总 RNA(操作按试剂盒说明进行)。

1.4.2 TNF- α mRNA 表达的检测

参考文献^[7], 合成 cDNA(操作按试剂盒说明进行), 将合成好的 cDNA 保存于 -20 °C。参考文献^[8], 采用 RT-PCR 法, 已合成的 cDNA 用引物扩增基因片段。PCR 反应的条件为: 94 °C 30 s, 55 °C 60 s, 72 °C 45 s, 35 个循环后 72 °C 7 min。反应完毕后, PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶(溴乙锭为 0.5 μ g/mL) 电泳分离, 紫外凝胶数字成像系统照相, Gel-Pro Analyzer 4.0 软件分析条带亮度, 并与内标 β -actin 的密度比较。

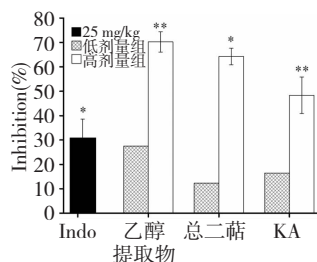
1.5 液相色谱-质谱联用测定尾叶香茶菜总二萜成分

液相色谱条件: 色谱柱 Inertsil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 4.5 μ m); 流动相: A 为水, B 为甲醇, 以 A: B = 50:50 等度洗脱; 柱温 25 °C; 柱流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 235 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μ L。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 喷雾电压 3.50 kV, 毛细管温度 300 °C, 毛细管电压 -30 V, 透镜电压 -100.00 V, 鞘气(液氮)流速 40 arb, 辅助气 10 arb, 扫描范围: 100.00 ~ 2000.00 m/z, 采用负谱全离子扫描方式采集数据^[9]。

2 结果与分析

2.1 尾叶香茶菜二萜对二甲苯致小鼠耳肿胀的抑制作用结果



95% 乙醇提取物高剂量: 500 mg/kg, 低剂量: 100 mg/kg; 总二萜高剂量: 250 mg/kg, 低剂量: 50 mg/kg; KA 高剂量: 50 mg/kg, 低剂量: 10 mg/kg。

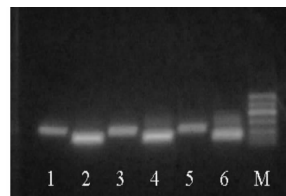
图 1 二萜对二甲苯所致小鼠耳肿胀的抑制

Fig. 1 Inhibition of diterpenoids to ear edema induced by dimethylbenzene in mice

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

Note: Compare with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

三种样品的高剂量组对二甲苯所致的小鼠耳肿胀有极显著的抑制作用, 低剂量组有明显的抑制作用; 与吲哚美辛比较, 乙醇提取物的低剂量组对其抑制作用相当。二萜类成分是该药材的主要抗炎活性成分, 在总二萜(250 mg/kg) 下, 对小鼠耳肿胀的抑制率 64.24%。KA(50 mg/kg) 具有显著抑制小鼠耳肿胀作用($P < 0.01$)。说明总二萜的抗炎活性主要源于 KA, 或总二萜中非萜类成分含量过多, 干扰了总二萜成分之间基于协同作用的抗炎活性。



M: DNA 分子量标准; 1: LPS + KA (100 μ g/mL); 3: LPS + 总二萜 (100 μ g/mL); 5: 空白; 1, 3, 5 为 TNF- α (249bp); 2, 4, 6 为 β -Actin (175bp); 药物作用时间为 6 h。

图 2 尾叶香茶菜二萜对 RAW264.7 细胞 TNF- α mRNA 的表达影响

Fig. 2 Effect of diterpenoids in *R. excisa* on TNF- α mRNA expression in RAW264.7

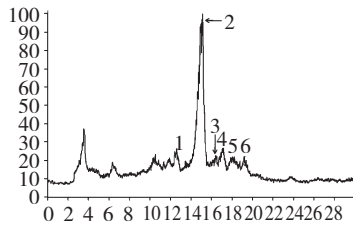


图3 尾叶香茶菜 95% 乙醇部位的质谱总离子流图

Fig. 3 Liquid chromatogram of diterpenoids in 95% ethanol fraction in *R. excisa*

2.2 尾叶香茶菜二萜对 RAW264.7 细胞 TNF- α mRNA 的表达影响

以 LPS(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 RAW264.7 细胞,培养 6

h。KA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和总二萜(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对 LPS 刺激的 TNF- α mRNA 表达具有明显抑制作用,基本恢复至空白组水平,结果见图 2。

2.3 LC-MS 分析二萜类成分

本实验通过 LC-MS 手段分析了尾叶香茶菜 95% 乙醇提取物的总二萜的化学成分,总离子流质谱图见图 3。结合保留时间、多级质谱碎裂信息,并参照相关文献^[10]推导出 6 种主要成分(表 1)的化学结构:excisanin E (1),kamebakaurin (2),excisanin A (3),excisanin M (4),kamebanin (5),excisanin B (6)。17.19 min 处的化合物可能是 excisanin B 的 15-羟基化产物,前期研究中分到这个化合物的糖苷类化合物,此处为其苷元,命名 excisanin M。

表 1 尾叶香茶菜 95% 乙醇部位总二萜 LC-MS 分析结果

Table 1 Component analysis of the diterpenoids in 95% ethanol fraction in *R. excisa*

NO.	Compd.	t_R (min)	ESI/MS	ESI/MS ⁿ
1	excisanin E	10.20	407.16[M-H] ⁻	467.27[M+AcO] ⁻ , 389.37[M-H-H ₂ O] ⁻
2	kamebakaurin	15.00	349.21[M-H] ⁻	409.21[M+AcO] ⁻ , 331.24[M-H-H ₂ O] ⁻
3	excisanin A	16.08	349.18[M-H] ⁻	441.20[M+92] ⁻ , 331.24[M-H-H ₂ O] ⁻
4	excisanin M	17.19	351.16[M-H] ⁻	411.26[M+AcO] ⁻
5	kamebanin	18.03	333.24[M-H] ⁻	393.17[M+AcO] ⁻ , 315.36[M-H-H ₂ O] ⁻
6	excisanin B	19.25	391.14[M-H] ⁻	451.12[M+AcO] ⁻ , 331.25[M-H-AcO] ⁻

3 讨论

实验证明该尾叶香茶菜总二萜具有一定的抗炎活性,这与其中二萜类化合物的药理作用相吻合,但并未表现出显著优于单一成分的抗炎强度。这可能是因为总二萜的抗炎活性主要源于 KA,或总二萜中杂质干扰了成分之间基于协同作用的抗炎活性。LC-MS 鉴定的 6 种成分中 excisanin M 为一新化合物。后续工作中需要进一步精制总二萜,以其确证几种主要二萜类成分间是否存在协同作用,并发现具有生物活性的新的二萜类化合物。

参考文献

- 1 Editorial Board of Flora of China(中国科学院中国植物志编委会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 1977. 65:490.
- 2 Hu XP(胡孝鹏), Gao Y(高原), Wang F(王飞), et al. The Research of chemical component in *Rabdosia excisa*. *J Mod Chin Med*(中国现代中药), 2013, 15:274-276.
- 3 Ming-yu Gui, Yutaka Aoyagi, Yong-Ri Jin, et al. Excisanin H, a novel cytotoxic 14, 20-epoxy-ent-kaurene diterpenoid,

- and three new ent-kaurene diterpenoids from *Rabdosia excisa*. *J Nat Prod*, 2004, 67:373-376.
- 4 Jeong-Hyung Lee, Jin Kyu Choi, Min Soo Noh, et al. Anti-inflammatory effect of kamebakaurin in *in vivo* animal model. *Planta Med*, 2004, 70:526-530.
- 5 Byung-Wook Kim, Sushruta Koppula, In Su Kim, et al. Anti-neuroinflammatory activity of kamebakaurin from *Isodon japonicus* via inhibition of c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathway in activated microglial cells. *J Pharmacol Sci*, 2011, 116:296-308.
- 6 Xu SY(徐淑云), Bian RL(卞如廉), Chen X(陈修). Experimental Methodology of Pharmacology(药理试验方法学). Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. 883.
- 7 Li XJ(李晓娟), Wang PX(王培训), Liu L(刘良), et al. The mechanism of sinomenine's anti-inflammatory anti-rheumatism. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*(广州中医药大学学报), 2004, 21:34-36.
- 8 Liu YN(刘亚男), Shao YT(邵月婷), Li XJ(李晓娟), et al. Effect of diterpenoid B derived from *Rabdosia excisa* on cell cycle of mouse prostatic cancer cell line. *Chin J Patho*(中国病理生理杂志), 2008, 24:1916-1921.

(下转第 214 页)