

麻欠产地对精油化学成分及抗炎效果的影响

董丽华^{1,2}, 郭娟¹, 张红霞³, 杜芝芝³, 许又凯¹, 张萍^{1*}¹中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 西双版纳 666303;²中国科学院大学, 北京 100049; ³中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650201

摘要: 为了进一步探究麻欠的产地对精油成分和抗炎效果的影响, 本研究针对从西双版纳州的勐仑、勐旺、勐醒三个地点采集的麻欠果实, 以水蒸馏法提取精油, 用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术分析化学成分并用 RAW 264.7 细胞研究抗炎效果。精油共鉴定出 21 种化合物, 以烯、醇类物质组成为主。其中勐仑与勐醒所产精油成分含量相似, 与勐旺所产精油差异较大。溶剂对照、地塞米松或麻欠精油预处理 RAW264.7 细胞后, LPS 处理培养 24 h 后, 测定 NO、TNF- α 的含量。三地精油对 LPS 刺激产生的 NO 和 TNF- α 均有显著抑制作用。结果表明, 虽然三个地点的麻欠精油成分有差异, 但是抗炎效果相当。

关键词: 麻欠精油; 产地差异; 化学成分; RAW264.7; 抗炎

中图分类号: R967

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.011

Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effects of Essential Oil of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang) Collected in Three Locations of Xishuangbanna, Yunnan

DONG Li-hua^{1,2}, GUO Juan¹, ZHANG Hong-xia³, DU Zhi-zhi³, XU You-kai¹, ZHANG Ping^{1*}

¹Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna, 666303, China; ²University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; ³Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

Abstract: In order to understand the effects of location on the chemical composition and anti-inflammatory effects of Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang) essential oil (MQEO), fruits of Maqian were collected from three locations in Xishuangbanna (Menglun, Mengwang, Mengxing). The essential oils were obtained by hydrodistillation. The chemical composition was analyzed using GC-MS and the anti-inflammatory effect was determined by RAW264.7 cells. A total of 21 kinds of substances were identified in three MQEOs among which alkenes and alcohols were the dominant components. The chemical composition of MQEOs from Menglun and Mengxing was more similar, whereas MQEO from Mengwang showed marked difference in the content of several major components from those in Menglun and Mengwang samples. RAW264.7 cells were pretreated with vehicle, Dex, or MQEO, and then cultured with LPS for 24 h. NO was determined by Griess reagent. TNF- α was determined by ELISA. Three MQEO all exhibited dose-dependent inhibition of LPS-stimulated production of NO and TNF- α . These results showed that despite difference in the chemical composition of MQEO from three locations, their anti-inflammatory effects remain the same.

Key words: Maqian essential oil; producing area; chemical composition; RAW264.7; anti-inflammatory

麻欠 [*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang], 是当地傣族对毛大叶臭花椒的俗称(也叫玛哨), 芸香科花椒属植物, 产于中国的云南西双版纳, 见于海拔 1400 m 疏或密林中。因其有柠檬香

气, 当地少数民族居民将其用于烧烤、煲汤、腌肉等食品加工过程^[1]。据傣族药典记载, 果实成熟时采收, 可用于通气除寒, 解毒, 消肿止痛^[2]。

现有研究显示麻欠精油具有很好的抗炎、抗氧化和抗菌效果。本实验室研究发现, 麻欠果实精油, 能显著缓解小鼠结肠炎症状并下调促炎性细胞因子, 其抗炎活性与 NF- κ B 信号通路的炎症介质相

关并影响通路膜受体 TLR4、相关激酶 IKK 的表达以及抑制蛋白 I κ B 的磷酸活化;同时还可以抑制氧化应激反应并且能减缓氧化应激引起的凋亡过程^[3,4]。麻欠挥发油对金黄色葡萄球菌、白假丝酵母菌和烟曲霉菌等常见的食源性致病菌和食品腐败菌具有显著的抑制和灭杀效果^[5]。

以前研究的麻欠都采自于云南省西双版纳傣族自治州景洪市勐旺乡,而西双版纳州其他地点的麻

欠却没有人研究过。本实验选择西双版纳州北部勐旺(MW)、中部勐仑(ML)与勐醒(MX)地区的麻欠果实,通过水蒸气蒸馏法提取麻欠精油,用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对其化学成分进行研究与分析,并利用细菌脂多糖(LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型测定精油抗炎活性,为以后麻欠精油产品的开发及质量标准的制定提供了理论依据。

表 1 麻欠样品

Table 1 Sample of Maqian

地点 Location	海拔 Altitude(m)	年平均气温 Annual mean temperature(°C)	年降水量 Annual rainfall(mm)
勐仑 Menglun	800	21	1400
勐旺 Mengwang	1131	19.3	1650
勐醒 Mengxing	600	21	1400

1 材料及试剂

1.1 细胞株

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞株 RAW 264.7 购于中国科学院昆明动物研究所动物种质资源库。

1.2 主要试剂及仪器

细菌脂多糖(LPS)、地塞米松(Dex)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司);磷酸盐缓冲液、青/链霉素、DMEM高糖培养基(Hyclone公司);胎牛血清、谷氨酰胺(Gibco公司);NO检测试剂盒(Promega公司);TNF- α 检测试剂盒(ELISA)(BD公司)。

多功能酶标仪(Thermo scientific,美国);高速冷冻离心机(Eppendorf 5810R,德国);7890A GC-5975MS气相色谱-质谱联用仪(Agilent Technologies,美国)。

2 实验方法

2.1 麻欠精油提取及成分测定

精油提取:分别购买自西双版纳州勐仑、勐旺、勐醒三个地点麻欠果实(经中国科学院西双版纳热带植物园许又凯研究员鉴定),果实晒干后粉碎机粉碎,在60 °C水中加热2 h然后采用水蒸气蒸馏法提取精油,-20 °C保存备用。

成分分析:采用美国 Agilent Technologies 公司 7890A GC-5975MS 气相色谱-质谱联用仪进行成分分析,方法如下:

气相条件:色谱柱:Agilent, HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxan, 50 m \times 0.32 mm \times 0.52 μ m);进样口温度:250 °C;柱箱升温程序:50 °C起始,以 5 °C/min 的速率升到 100 °C,保持 5 min,然后以 25 °C/min 的速率从 100 °C 升到 250 °C 保持 5 min;进样量:1 μ L;分流比:50:1;进样口压力:90 kPa;流速:1.8 mL/min。

质谱条件:电离方式 EI,电子轰击能量 70 eV,扫描范围 m/z 50 ~ 550;离子源温度 230 °C;四极杆温度 150 °C。

化学成分鉴定:采用 NIST14 数据库对质谱图进行自动检测获得初步鉴定结果,参考相关文献中质谱资料(线性保留指数由一系列直链烷烃在 HP-5 (C₈ ~ C₃₀)毛细管色谱柱的保留时间计算决定),最终对精油的化学成分进行定性分析。对色谱峰用相对面积归一法定量,计算各组分的百分含量。

2.2 细胞培养

用 DMEM 高糖培养基[含 10% 胎牛血清,100 U/mL 的青霉素,100 μ g/mL 链霉素,2 mmol/L 的谷氨酰胺]培养 RAW 264.7 细胞。将细胞置于 37 °C,5% CO₂ 的细胞培养箱中进行传代培养,并取生长至对数期的细胞用于试验。

2.3 细胞增殖活性测定

收集对数生长期的 RAW 264.7 细胞并调整其密度为 1 \times 10⁵/mL,以 100 μ L/孔接种于 96 孔板。过夜培养贴壁后,给予以完全培养基配制的 ML、MW、MX 不同浓度麻欠精油(v/v,0、0.0005%、

0.001%、0.002%、0.004%、0.005%)培养基继续培养,每组3个复孔。培养24 h后采用MTT法测定吸光度 OD_{570} 值,实验组 OD_{570} 值/对照组 OD_{570} 值表示细胞增殖活性。

2.4 一氧化氮(NO)含量测定

将处于对数生长期的RAW 264.7细胞按 5×10^5 个/mL,以100 μ L/孔接种于96孔板中,设置空白组、LPS组、Dex组及LPS+ML麻欠精油处理组、LPS+MW麻欠精油处理组、LPS+MX麻欠精油处理组,每组3个平行。过夜培养贴壁后,各麻欠处理组分别用不同浓度的麻欠精油(v/v,0、0.0005%、0.001%、0.002%、0.004%)预处理30 min,Dex组用10 μ mol/L Dex。之后LPS组,Dex组与各精油处理组均用1 μ g/mL LPS刺激细胞24 h。收集上清,按照Griess试剂盒操作说明检测上清液中的NO含量。

2.5 TNF- α 含量测定

将处于对数生长期的RAW 264.7细胞密度调整为 10^6 个/mL,以2 mL接种于6孔板中,设置空白组、LPS组、Dex组及LPS+ML麻欠精油处理组、LPS+MW麻欠精油处理组、LPS+MX麻欠精油处理组,每组3个平行。培养24 h后,各麻欠处理组分别用不同浓度的麻欠精油(v/v,0、0.0005%、0.001%、0.002%、0.004%)预处理30 min,Dex组

用10 μ mol/L Dex。之后LPS组,Dex组与精油处理组均用1 μ g/mL LPS刺激细胞24 h。收集6孔板各孔细胞培养液,10000 rpm,4 $^{\circ}$ C离心10 min,收集上清液按照ELISA检测试剂盒说明书测定TNF- α 的含量。

2.6 数据分析

实验数据采用Graph Prism 5.0软件进行分析并进行图像处理。应用One-way ANOVA进行统计处理,两组之间采用Dunnett's t-test分析,实验结果采用Mean \pm SD表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 西双版纳三个地点麻欠精油的化学成分

勐仑、勐旺、勐醒的得率分别是(g/g)2.17%、1.25%、1.73%。三个地点的麻欠精油均为具有芳香气味的淡黄色油状液滴,得到化合物占总峰面积:勐仑68.70%、勐旺71.30%、勐醒64.05%。

麻欠果实精油成分由表2可知:三个地点的麻欠精油共检出21种化合物,且最高成分均为D-柠檬烯。麻欠精油化学成分大体相同,多以醇、烯类物质组成,其中勐仑与勐醒的各化合物之间含量相似,与勐旺麻欠精油差异较大,如:对伞花烯-8-醇,勐仑6.44%、勐醒7.72%,勐旺则为痕量;桉烯,勐仑5.71%、勐醒5.31%、勐旺为0.43%。

表2 西双版纳州三个地点麻欠精油的化学成分

Table 2 Chemical composition of the essential oil obtained from Maqian collected in three locations of Xishuangbanna

序号 No.	保留时间 Rt(min)	保留指数 RI	英文名称 English name	中文名称 Chinese name	分子式 Chemical formula	百分含量(%) Content (%)		
						勐仑 ML	勐旺 MW	勐醒 MX
1	9.304	929	α -Thujene	α -崖柏烯	$C_{10}H_{16}$	tr	tr	0.24
2	9.557	938	α -Pinene	α -蒎烯	$C_{10}H_{16}$	3.72	4.86	2.89
3	10.742	977	Sabinen	桉烯	$C_{10}H_{16}$	5.71	0.43	5.31
4	11.186	991	Myrcene	月桂烯	$C_{10}H_{16}$	1.05	1.11	0.93
5	11.825	1008	α -Phellandrene	α -水芹烯	$C_{10}H_{16}$	tr	tr	tr
6	12.052	1014	δ -3-Carene	δ -3-萹烯	$C_{10}H_{16}$	tr	tr	tr
7	12.583	1026	o-Cymene	邻伞花烯	$C_{10}H_{14}$	12.01	13.94	10.51
8	12.792	1031	D-Limonene	D-柠檬烯	$C_{10}H_{16}$	18.15	36.36	13.54
9	12.854	1032	β -Phellandrene	β -水芹烯	$C_{10}H_{16}$	tr	tr	tr
10	14.403	1068	n-Octanol	正辛醇	$C_8H_{18}O$	tr	0.77	tr
11	15.821	1101	Linalool	芳樟醇	$C_{10}H_{18}O$	5.01	3.64	4.26
12	17.717	1189	Terpinen-4-ol	松油烯-4-醇	$C_{10}H_{18}O$	2.73	0.35	3.75

序号 No.	保留时间 Rt(min)	保留指数 RI	英文名称 English name	中文名称 Chinese name	分子式 Chemical formula	百分含量(%) Content(%)		
						勐仑 ML	勐旺 MW	勐醒 MX
13	17.803	1193	p-Cymen-8-ol	对伞花烯-8-醇	C ₁₀ H ₁₄ O	6.44	tr	7.72
14	17.883	1197	Cryptone	隐酮	C ₉ H ₁₄ O	2.55	5.21	1.82
15	17.919	1198	α-Terpineol	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	8.29	1.22	8.58
16	18.058	1208	n-Decanal	正癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	0.37	0.75	0.77
17	18.105	1212	Acetic acid octyl ester	乙酸辛酯	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.63	0.87	1.14
18	18.901	1275	n-Decanol	正癸醇	C ₁₀ H ₂₂ O	tr	0.45	-
19	19.976	1386	Geranyl acetate	乙酸香叶酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.04	1.34	2.14
20	20.198	1414	n-Dodecanal	月桂醛	C ₁₂ H ₂₄ O	tr	-	tr
21	20.648	1478	1-Dodecanol	月桂醇	C ₁₂ H ₂₆ O	tr	tr	0.45

注:“-”未检测到;“tr”微量。

Note:“-”indicated under detectable level;“tr” indicated trace.

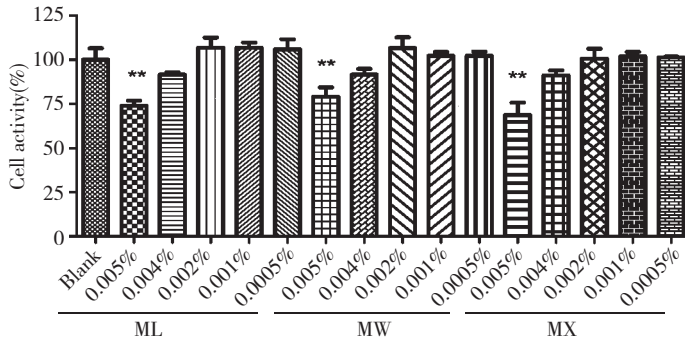


图1 西双版纳三个地点麻欠精油对 RAW264.7 细胞活性的影响

Fig. 1 Effect of the essential oil obtained from Maqian collected in three locations of Xishuangbanna on cell activity in RAW264.7 cells

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$

Note: Compared with Blank group, ** $P < 0.01$

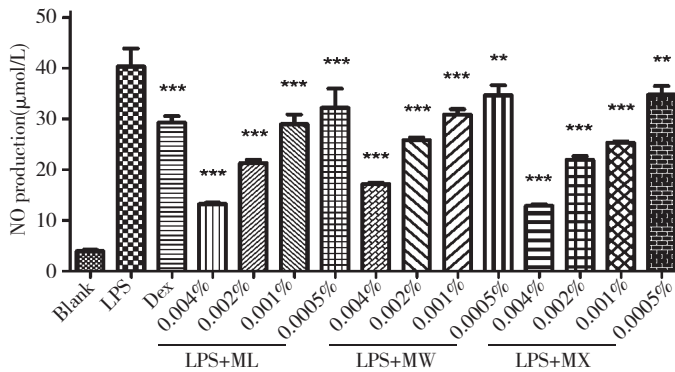


图2 西双版纳三个地点麻欠精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的影响

Fig. 2 Effect of the essential oil obtained from Maqian collected in three locations of Xishuangbanna on NO production in RAW264.7 cells stimulated by LPS

注:与 LPS 组相比, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Note: Compared with LPS group, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

3.2 三个地点麻欠精油对 RAW264.7 细胞活性的影响

从图 1 可以看出,在 0.005% (v/v) 时,ML、MW、MX 麻欠精油作用于 RAW264.7 cells 细胞株 24 h,表现出明显的细胞生长抑制效应,细胞活力分别下降至 73.85%、79.08%、68.79%;在 0.0005% ~ 0.004% (v/v) 时,与正常组相比对细胞生长无明显影响。因此,后面的精油抗炎活性测定,浓度选 0.0005% ~ 0.004% (v/v)。

3.3 西双版纳三个地点麻欠精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生 NO 的影响

ML、MW、MX 三地不同浓度麻欠精油对 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 NO 能力的影响结果见图 2。空白组的 RAW264.7 细胞液中 NO 浓度为 $3.94 \pm 0.25 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。LPS 刺激 24 h 后,NO 浓度增加到 $40.35 \pm 3.56 \mu\text{mol}/\text{L}$ 。而在刺激前 0.5 h 加入 ML、MW、MX 三地浓度为 0.0005% ~

0.004% (v/v) 的麻欠精油预处理过的 RAW264.7 细胞,发现其对 NO 的释放均具有显著抑制作用,并呈浓度依赖性。且 ML、MW 在浓度 0.002%、0.004%,MX 在浓度 0.001%、0.002%、0.004% 时,抑制 NO 效果均好于 Dex 组 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。

3.4 西双版纳三个地点麻欠精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF- α 产生的影响

ML、MW、MX 三地不同浓度麻欠精油对 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 刺激的 RAW264.7 细胞释放 TNF- α 能力的影响结果见图 3。与空白组相比,LPS 刺激 RAW264.7 细胞释放了大量 TNF- α 。与 LPS 组比较,ML、MW、MX 三地的麻欠精油在 0.001% ~ 0.004% 浓度预处理过的 RAW264.7 细胞对抑制 TNF- α 产生均有极显著抑制作用 ($P < 0.001$),且 ML、MW、MX 三地抑制 TNF- α 作用均呈现良好的剂量依赖关系。但抑制的能力弱于 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松组。

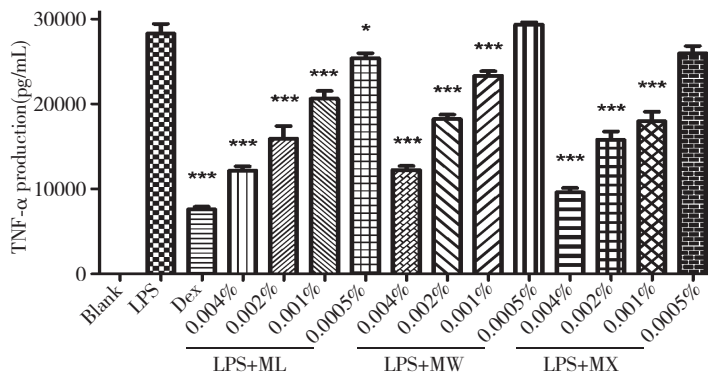


图 3 西双版纳三个地点麻欠精油对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF- α 产生的影响

Fig. 3 Effect of the essential oil obtained from Maqian collected in three locations of Xishuangbanna on TNF- α production in RAW264.7 cells stimulated by LPS

注:与 LPS 组相比,* $P < 0.05$;*** $P < 0.001$

Note:Compared with LPS group,* $P < 0.05$;*** $P < 0.001$

4 结论

本研究首次分析了从西双版纳州不同产地采集的麻欠果实所提取的精油化学成分和含量的差异,并发现三个地点的麻欠精油均具有相似的抗炎效果。这为采用西双版纳不同地区的麻欠提取精油制定质量标准以及精油产品开发提供了依据。本研究发现勐仑与勐醒所产精油成分含量相似,与勐旺所产精油差异较大。勐旺精油成分与之前的研究有所差异:李仁等人测定的麻欠精油成分柠檬烯含量达 67.07%,而本研究中柠檬烯含量 36.36%;甘小青

等人测定的精油成分中, α -水芹烯 25.09%、 β -水芹烯 20.05%^[4,5],而本研究中 α -水芹烯和 β -水芹烯的含量都是微量。差异的出现可能,与麻欠采集年份、贮存环境及样品预处理方式不同有关。

有研究发现在麻欠精油为 0.004% (v/v) 时,对 RAW264.7、THP-1 细胞活力没有影响^[4,5],这与本研究相吻合,三个地点的麻欠精油在 0.004% 时,对细胞均没有显著毒性。

NO 和 TNF- α 是细胞之间信息传递的调节因子,过量的 NO 及其稳定性衍生物过氧亚硝基阴离子对细胞具有毒性作用;过量的 TNF- α 会加重炎症

损伤和诱导其它细胞因子的生成。本研究 LPS 作用 24 h 后,与空白组相比 NO 和 TNF- α 的产量明显升高,加入麻欠精油预处理的勐仑、勐醒、勐旺实验组 NO 和 TNF- α 的产量较 LPS 组均降低,而且降低程度依赖于麻欠精油剂量。

抗炎活性是精油中化合物的作用结果,很多研究多方面已经证明 D-柠檬烯和芳樟醇具有抗炎作用^[6-9],李生茂等人采用灰色关联度分析法研究显示化合物与抗炎活性相关性,其中芳樟醇、 α -松油醇、D-柠檬烯、月桂烯、 α -蒎烯与抗炎均有关^[10]。而这五种化合物在麻欠精油成分中比例很大,分别占总已鉴定的化合物 52.72% (勐仑)、66.12% (勐旺)、47.15% (勐醒)。三个地点精油的成分、含量不同,但是对 NO、TNF- α 产量抑制程度却相当,表明一定范围内精油成分的变化对其抗炎活性没有显著影响,同时说明除上述五种抗炎化合物外,麻欠精油中可能还存在其他成分发挥抗炎活性,确切的抗炎活性成分还需要进一步研究。不同地区麻欠精油抗炎活性的相对稳定性表明麻欠精油抗炎作用的确是“多成分”共同起效的结果^[11]。

致谢:部分实验测定在中国科学院西双版纳热带植物园中心实验室完成,对中心实验室工作人员表示由衷的感谢。

参考文献

- 1 Flora of China Editorial of Committee of Chinese Academy of Sciences(中国科学院植物志编辑委员会). Flora of China(中国植物志). Beijing: Science Press, 1997. 43(2), 37.
- 2 State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China(中华人民共和国国家中医药管理局). Traditional Chinese Materia Medica of Dai Nationality(傣药志). Shanghai: Shanghai Science and Technology-Press(上海科技出版社), 2005.
- 3 Ji KL, Gan XQ, Xu YK, et al. Protective effect of the essen-

tial oil of *Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* against dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation in mice. *Phytomedicine*, 2016, 23: 883-890.

- 4 Gan XQ(甘小青), Guo J(郭娟), Zhang HX(张红霞), et al. Effect of maqain (*Zanthoxylum myriacanthum* var. *pubescens* Huang) essential oil oxidative stress in THP-1 cells stimulated by LPS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 833-838.
- 5 Li R, Yang JJ, Shi YX, et al. Chemical composition, antimicrobial and anti-inflammatory activities of the essential oil from Maqian (*Zanthoxylum myriacanthum*, var. *pubescens*) in Xishuangbanna, SW China. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158: 43-48.
- 6 Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, et al. D-limonene suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and inflammation via repression of COX-2, iNOS, and NF κ B in kidneys of Wistar rats. *Exp Biol Med*, 2014, 239: 465-476.
- 7 D'Alessio PA, Ostan R, Bisson JF, et al. Oral administration of d-Limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans. *Life Sci*, 2013, 92: 1151-1156.
- 8 Li Y, Lv O, Zhou F, et al. Linalool Inhibits LPS-Induced Inflammation in BV2 Microglia Cells by Activating Nrf2. *Neurochem Res*, 2015, 40: 1520-1525.
- 9 Deepa B, Anuradha CV. Effects of linalool on inflammation, matrix accumulation and podocyte loss in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Mech Method*, 2013, 23: 223-234.
- 10 Li SM(李生茂), Zeng BY(曾滨阳), Ye Q(叶强). Correlation analysis between GC-MS fingerprint of essential oil of *AmomiFructus* and anti-inflammatory activity. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 133-136.
- 11 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 446-475.

(上接第 424 页)

- 17 Zhang L(张良), Zhang YK(张玉奎), Chen Y(陈艳), et al. Isoflavones in leaves of *Belamcanda chinensis*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 69-71.
- 18 Bashir A, Hamburger M, Msonthi JD, et al. Isoflavones and xanthenes from *polygala virgata*. *Phytochemistry*, 1992, 31:

309-311.

- 19 Moriyasu M, Igi Y, Ichimaru M, et al. New isoflavones from *Belamcandae Rhizoma*. *J Nat Med*, 2007, 61: 329-333.
- 20 Tahara S, Ingham JL, Nakahara S, et al. Fungitoxic dihydrofuranisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry*, 1984, 23: 1889-1900.