

鸦胆子中黄酮及其抗炎、抗补体活性的研究

何 潸¹, 郭文静¹, 吴佳辉¹, 熊紫微¹, 谭 婷¹, 冯育林^{1,2}, 杨世林², 温 泉^{1*}

¹江西中医药大学; ²创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室,南昌 330006

摘要:研究鸦胆子中的黄酮类成分及其抗炎、抗补体的活性。采用正反相硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、制备液相及重结晶等方法从鸦胆子中分离纯化出一系列黄酮,利用 NMR 和质谱解析黄酮类成分的结构。采用 Griess 法及 CCK-8 法方法测定黄酮单体的抗炎及细胞毒活性,采用体外溶血方法测定黄酮类成分补体经典途径 CH_{50} 的活性。从鸦胆子果实乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离得到 12 个骨架类型一致的黄酮类化合物,分别鉴定为:木犀草素(1)、芹菜素(2)、木犀草素 7-O- β -D-葡萄糖苷(3)、7-甲氧基木犀草素(4)、槲皮素-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷(5)、木犀草素-3'-O- β -D-葡萄糖苷(6)、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖苷(7)、芹菜素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(8)、3'-甲氧基木犀草素(9)、野漆树苷(10)、芦丁(11)、异牡荆素(12),其中化合物 1,2,4,6,7,8,11,12 首次从鸦胆子中分离得到。活性测试表明,化合物 1,2,3,4,5,9,11 表现出显著抑制 NO 生成,除化合物 4,9 外,其余 10 个化合物均具有一定程度的抗补体活性,且构效关系明显。

关键词: 鸦胆子; 黄酮; 抗炎活性; 抗补体活性

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)12-2094-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.12.014

Anticomplement and anti-inflammatory flavones from the seeds of *Brucea javanica*

HE Xiao¹, GUO Wen-jing¹, WU Jia-hui¹,
XIONG Zi-wei¹, TAN Ting¹, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin², WEN Quan^{1*}

¹ Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine;

² State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China

Abstract: Flavonoids from the seeds of *Brucea javanica* and their anti-inflammatory and anticomplement activities were studied. The compounds were isolated and identified by chromatographic and spectroscopic methods. The anti-inflammatory and cytotoxic activities of the compounds were determined by Griess method and CCK-8 method. Determination of CH_{50} activity of classical complement pathway of flavonoids by hemolysis method. Compounds (1-12) obtained from the ethyl acetate fraction of the ethanol extract were identified as luteolin (1), apigenin (2), luteolin-7-O- β -D-glucoside (3), 7-methoxy-luteolin (4), quercetin-3-O- α -L-rhamnoside (5), luteolin-3'-O- β -D-glucoside (6), kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside (7), apigenin-7-O- β -D-glucoside (8), 3'-methoxy-luteolin (9), apigenin-7-O-neohesperidoside (10), rutin (11) and isovitexin (12). Compounds 1,2,4,6,7,8,11 and 12 were obtained from this species for the first time. The results of screening demonstrated that compounds 1,2,3,4,5,9 and 11 showed moderate NO inhibitory effects, while all the compounds, except for compounds 4 and 9, possessed anticomplement activity and exhibited well structure-activity relationship.

Key words: *Brucea javanica* (L.) Merr; flavonoid; anti-inflammatory activity; anticomplement activity

鸦胆子是苦木科鸦胆子 *Brucea javanica* (L.) Merr. 的干燥成熟果实, 主要分布于我国的广东、广西等地区。全世界鸦胆子属植物有 6 种, 我国有 2

收稿日期:2020-07-28 接受日期:2020-10-23

基金项目:国家自然科学基金(81860684);国家重点研发计划(2019YFC1712302);江西省教育厅项目(GJJ190689);江西省中药学一流学科建设(JXSYLXKZHYA0016)

*通信作者 Tel:86-791-87119633; Email:qwen12@fudan.edu.cn

种,为鸦胆子和柔毛鸦胆子,均不同程度地作为民间传统用药,具有多种药理活性。据 2020 版《中国药典》记载,鸦胆子具有良好的清热解毒、截疟、止痢、腐蚀赘疣等作用,内用治疗各种疟疾、痢疾,外用治疗赘疣、鸡眼等^[1]。现代药理活性研究表明,鸦胆子有抗炎、拒食、抗疟、抗病毒、抗溃疡、降血糖和除草等多方面的作用^[2]。鸦胆子含有丰富的化学成

分,主要包括苦木内酯类、三萜类、生物碱类、黄酮类、脂肪酸类等化合物,文献报道及研究发现鸦胆子中的黄酮类化合物主要以木犀草素及其衍生物为主^[3]。虽然之前已有文献报道过相关黄酮类成分的抗炎及抗补体活性^[4],但大多是非同一骨架类型之间的活性比较,而本研究对从鸦胆子中分离得到一系列木犀草素骨架类型的黄酮进行分析,这对于阐明这类黄酮的抗炎、抗补体活性构效关系具有重要参考意义。

目前,有关黄酮类化合物体外抗炎作用机制的研究主要集中在小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7),而对小鼠肺泡巨噬细胞(MH-S)的研究鲜有报道。肺泡巨噬细胞是急性肺损伤发病使动环节的关键靶细胞,是抵御外来入侵者进入肺组织的第一道防线,研究发现,肺泡巨噬细胞可以调节气道中的促炎和抗炎反应,对肺部炎症起着关键性作用^[5]。本文首次研究了鸦胆子果实中木犀草素骨架类型黄酮化合物在MH-S细胞中的抗炎效果,阐明其构效关系,并研究了黄酮的抗补体活性及其构效关系,为进一步阐明木犀草素骨架类型黄酮的抗炎与抗补体之间的关系提供了研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker Avance 600型核磁共振仪(德国布鲁克公司);Triple TOF 5600高分辨质谱仪(美国AB Sciex公司);HPLC:LC-XR20(日本岛津公司);Agilent 1100 Series 制备液相色谱(美国 Agilent 公司);HP20 大孔吸附树脂(日本三菱公司);Sephadex LH-20 凝胶(美国 GE Healthcare 公司);YMC-Pack ODS-A HPLC 半制备柱(250 mm×20 mm,5 μm,日本);YMC-Pack ODS-A HPLC 半制备柱(250 mm×10 mm,5 μm,日本);柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂分厂)。

小鼠肺泡巨噬细胞株(MH-S);CCK-8(大连美伦生物技术有限公司);磺胺(Sigma 公司,美国);N-1-萘乙二胺盐酸盐(Sigma 公司,美国);96 孔细胞培养板;1640 培养基(Solarbio 公司,美国);PBS(Solarbio 公司,美国);胰蛋白酶(Solarbio 公司,美国);BI 血清(FBS,澳洲);脂多糖(LPS,Sigma 公司,美国);95% 磷酸(国药)。

鸦胆子药材来自广西省(2016 年 11 月),由江西中医药大学钟国跃教授鉴定为苦木科鸦胆子属植物鸦胆子的干燥成熟果实,标本(YD20161107)保存

于江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心。

1.2 实验方法

1.2.1 提取分离

取鸦胆子药材 20 kg,粉碎后用石油醚脱脂 3 次,待药渣挥干石油醚后,用 95% 乙醇进行提取,每次 2 h,合并提取液,滤过,减压浓缩至无醇味,得粗浸膏。浸膏加适量蒸馏水溶解,用乙酸乙酯萃取得 459 g 浸膏,之后上样于 HP-20 大孔吸附树脂,依次用水和 30%、60%、95% 乙醇洗脱,取 60% 乙醇洗脱部位浸膏 157 g,经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(20:1,10:1,5:1,2:1,1:1,0:1)梯度洗脱后,各部位再经制备液相(乙腈-0.1% 甲酸水 36:64)分离,得化合物 2(8.9 mg)、4(10.6 mg)、9(4.4 mg),经制备液相(乙腈-0.1% 甲酸水 28:72)分离,得化合物 1(3.4 mg)、5(6.8 mg)、7(20.0 mg),经制备液相(乙腈-0.1% 甲酸水 33:67)分离,得化合物 3(3.5 mg)、6(10.8 mg)、11(9.8 mg),经制备液相(乙腈-0.1% 甲酸水 18:82)分离,得化合物 8(6.7 mg)、10(9.0 mg)、12(7.8 mg)。

1.2.2 活性测定

CCK-8 法细胞毒性试验:取对数生长期的 MH-S 细胞接种于 96 孔板中(1×10^4 个细胞/孔),37 °C、5% CO₂ 培养过夜,弃去上清,将含不同药物浓度化合物 1~12(100,50,25,12.5,6.25 μmol/L)的细胞培养液 100 μL/孔加入 96 孔板中,另设正常细胞对照组中加入无药物的细胞培养液,每组 6 个副孔。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后,弃去上清液加入 10% 的 CCK-8 溶液,每孔 100 μL,酶标仪 450 nm 处测定吸光度(OD 值),计算细胞活力。

1.2.3 NO 抑制试验

采用 Griess 法检测对 LPS 刺激下的 MH-S 细胞分泌 NO 的抑制作用。取对数生长期 MH-S 细胞接种于 96 孔板中(5×10^4 个细胞/孔),37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,弃去旧培养基,给药组每孔加入 100 μL 含药 1640 完全培养基,模型组每孔加入 100 μL 空白 1640 完全培养基,空白对照组每孔加入 200 μL 空白 1640 完全培养基,培养 1 h 后,除空白对照组外,每孔加入 100 μL 的 LPS(2 μg/mL)溶液,继续培养 24 h,24 h 后,取出 96 孔板于显微镜下观察细胞状态,后每孔吸取 100 μL 上清液于新的 96 孔板中,加入 Griess I 液 50 μL,放置到细胞培养箱中培养 10 min,取出,再加入 Griess II 液 50 μL,

放置培养箱中 10 min, 取出, 摆床振摇 5 min, 用酶标仪在 550 nm 处测其 OD 值, 计算 NO 抑制率。

1.2.4 补体经典途径测试

将样品溶于 DMSO, 不同浓度的样品(BBS 缓冲液稀释)加入临界浓度的补体(1:1 稀释的豚鼠血清), 溶血素和 2% 绵羊红细胞(SRBC)。根据文献^[6], 配制中药测定组、中药对照组、补体组以及全溶血组样品。放置 37 ℃ 水浴 30 min 后, 低温(4℃)离心(3 000 rpm)5 min 后, 分别取每个样品上清 0.2 mL 于 96 孔板, 用酶标仪在 405 nm 下测定吸光度(A)值。计算出不同浓度的中药测定组的各溶血抑制率, 以供试品浓度为横坐标(X), 溶血抑制率为纵坐标(Y), 利用 Graphpad Prism 7.0 软件, 计算半数抑制溶血浓度(CH_{50})。

$$\text{抑制率} = [1 - (A_{\text{中药测定}} - A_{\text{中药对照}})/A_{\text{补体}}] \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 结构鉴定

化合物 1 黄色针晶(甲醇); mp. 325 ~ 327 ℃, ESI-MS: m/z 287 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ: 7.40 (2H, m, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.17 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ: 165.6 (C-2), 103.7 (C-3), 182.5 (C-4), 162.9 (C-5), 99.7 (C-6), 164.6 (C-7), 94.6 (C-8), 158.3 (C-9), 104.8 (C-10), 122.7 (C-1'), 114.4 (C-2'), 147.6 (C-3'), 151.5 (C-4'), 116.6 (C-5'), 119.3 (C-6')。以上波谱数据与文献^[7]报道的基本一致, 故鉴定化合物 1 为木犀草素, 结构见图 1。

化合物 2 淡黄色粉末(甲醇); mp. 340 ~ 341 ℃, ESI-MS: m/z 271 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ: 7.93 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2', H-6'), 6.94 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', H-5'), 6.76 (1H, s, H-3), 6.18 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.53 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 12.89 (1H, s, 5-OH); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ: 164.7 (C-2), 103.3 (C-3), 182.2 (C-4), 157.8 (C-5), 99.3 (C-6), 164.2 (C-7), 94.4 (C-8), 161.9 (C-9), 104.1 (C-10), 121.6 (C-1'), 128.9 (C-2', C-6'), 116.4 (C-3', C-5'), 161.7 (C-4')。以上波谱数据与文献^[8]报道的基本一致, 故鉴定化合物 2 为芹菜素。

化合物 3 黄色无定型粉末(甲醇); mp. >300 ℃, ESI-MS: m/z 449 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz,

DMSO- d_6) δ: 7.62 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.40 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.75 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.88 (1H, s, H-3), 6.60 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.62 (1H, d, J = 7.3 Hz, H-1''), 4.33 ~ 4.68 (6H, m, Sugars-H); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ: 165.0 (C-2), 103.8 (C-3), 182.6 (C-4), 162.3 (C-5), 100.3 (C-6), 163.7 (C-7), 95.0 (C-8), 157.6 (C-9), 106.3 (C-10), 122.4 (C-1'), 114.4 (C-2'), 147.6 (C-3'), 151.7 (C-4'), 116.6 (C-5'), 119.4 (C-6'), 101.5 (C-1''), 74.6 (C-2''), 79.0 (C-3''), 70.9 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.1 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[9]报道的基本一致, 故鉴定化合物 3 为木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 4 黄色粉末(甲醇); mp. 328 ~ 330 ℃, ESI-MS: m/z 287 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ: 12.88 (1H, s, 5-OH), 9.68 (1H, s, 3'-OH), 9.38 (1H, s, 4'-OH), 6.93 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.35 (1H, s, H-2'), 7.28 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.88 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.52 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 3.69 (3H, s, 7-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ: 164.6 (C-2), 103.3 (C-3), 182.1 (C-4), 161.9 (C-5), 99.3 (C-6), 164.3 (C-7), 94.3 (C-8), 157.7 (C-9), 104.1 (C-10), 121.9 (C-1'), 113.8 (C-2'), 146.2 (C-3'), 150.2 (C-4'), 116.5 (C-5'), 119.4 (C-6'), 49.5 (7-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[10]报道的基本一致, 故鉴定化合物 4 为 7-甲氧基木犀草素。

化合物 5 棕黄色粉末(甲醇); mp. 178 ~ 180 ℃, ESI-MS: m/z 449 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ: 7.22 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.68 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 7.37 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.72 (1H, s, H-3), 6.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.24 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 5.38 (1H, s, H-1''), 3.05 ~ 3.77 (4H, m, Rha-H), 1.35 (3H, d, J = 6.2 Hz, RhaCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ: 156.9 (C-2), 134.6 (C-3), 178.2 (C-4), 161.7 (C-5), 99.2 (C-6), 164.7 (C-7), 94.1 (C-8), 157.7 (C-9), 104.5 (C-10), 121.6 (C-1'), 115.9 (C-2'), 145.7 (C-3'), 148.9 (C-4'), 116.1 (C-5'), 121.2 (C-6'), 102.3 (C-1''), 70.8 (C-2''), 71.1 (C-3''), 71.6 (C-4''), 70.5 (C-5''), 18.0 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[11]报道的基本一致, 故鉴定化合物 5 为槲皮

素-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物 6 黄色粉末(甲醇); mp. 244 ~ 246 °C, ESI-MS: m/z 447 [M-H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.59 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.32 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.88 (1H, s, H-3) 6.22 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.27 (1H, s, H-1''), 12.93 (1H, s, 5-OH), 4.90 (1H, d, *J* = 7.2, H-1'); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.6 (C-2), 103.7 (C-3), 182.2 (C-4), 161.8 (C-5), 99.3 (C-6), 163.9 (C-7), 94.6 (C-8), 157.8 (C-9), 104.2 (C-10), 122.2 (C-1'), 114.8 (C-2'), 146.1 (C-3'), 151.0 (C-4'), 116.9 (C-5'), 122.2 (C-6'), 102.3 (C-1''), 73.8 (C-2''), 76.4 (C-3''), 70.5 (C-4''), 77.8 (C-5''), 61.3 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[12]报道的基本一致, 故鉴定化合物 6 为木犀草素-3'-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 7 黄色针晶(甲醇); mp. 210 ~ 212 °C, ESI-MS: m/z 455 [M + Na]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.69 (1H, s, 5-OH), 7.83 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.99 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.47 (1H, br s, H-8), 6.26 (1H, br s, H-6), 5.44 (1H, br s, H-1''), 3.92 (1H, br s, H-2''), 3.36 (1H, dd, *J* = 8.8, 3.2 Hz, H-3''), 3.15 ~ 3.23 (1H, m, H-4'', H-5''), 0.86 (3H, d, *J* = 5.2 Hz, -CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 157.0 (C-2), 134.6 (C-3), 178.1 (C-4), 161.7 (C-5), 99.3 (C-6), 165.1 (C-7), 94.3 (C-8), 157.0 (C-9), 104.4 (C-10), 120.9 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 115.8 (C-3', 5'), 160.5 (C-4'), 102.2 (C-1''), 70.8 (C-2''), 71.1 (C-3''), 71.6 (C-4''), 70.5 (C-5''), 17.9 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[13]报道的基本一致, 故鉴定化合物 7 为山柰酚-3-O- α -L-吡喃鼠李糖苷。

化合物 8 黄色粉末(甲醇); mp. 228 ~ 230 °C, ESI-MS: m/z 432 [M]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.88 (1H, s, 5-OH), 10.49 (1H, s, 4'-OH), 7.92 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.91 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.81 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.84 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 5.35 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, H-1''), 3.32 ~ 3.81 (5H, m, Sugars-H); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.4 (C-2), 103.5 (C-3), 182.5 (C-4), 157.4 (C-5), 99.9 (C-6), 164.7 (C-7), 95.3 (C-8), 161.6 (C-9), 105.8 (C-

10), 121.4 (C-1'), 129.1 (C-2'), 116.5 (C-3'), 161.9 (C-4'), 116.5 (C-5'), 129.1 (C-6'), 100.3 (C-1''), 73.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 69.9 (C-4''), 77.6 (C-5''), 61.0 (C-6'')。以上波谱数据与文献^[14]报道的基本一致, 故鉴定化合物 8 为芹菜素-7-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 9 淡黄色粉末(甲醇); mp. 252 ~ 255 °C, ESI-MS: m/z 299 [M-H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.92 (1H, s, 5-OH), 7.40 (2H, m, H-2', 6'), 6.81 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.25 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.11 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.91 (3H, s, 3'-OCH₃); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 164.3 (C-2), 104.0 (C-3), 182.5 (C-4), 162.9 (C-5), 99.7 (C-6), 165.7 (C-7), 94.7 (C-8), 158.3 (C-9), 104.8 (C-10), 122.3 (C-1'), 110.1 (C-2'), 148.7 (C-3'), 152.2 (C-4'), 116.7 (C-5'), 121.1 (C-6'), 55.8 (-OCH₃)。以上波谱数据与文献^[15]报道的基本一致, 故鉴定化合物 9 为 3'-甲氧基木犀草素。

化合物 10 黄色粉末(甲醇); mp. 262 ~ 264 °C, ESI-MS: m/z 579 [M + H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 6.84 (1H, s, H-3), 6.18 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8), 7.33 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3', 5'), 5.25 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-1''), 5.12 (1H, br s, H-1'''), 1.30 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'''); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 165.1 (C-2), 101.2 (C-3), 197.1 (C-4), 163.3 (C-5), 96.4 (C-6), 163.6 (C-7), 79.3 (C-8), 157.7 (C-9), 103.5 (C-10), 127.8 (C-1'), 129.4 (C-2', 6'), 115.0 (C-3', 5'), 163.3 (C-4'), 42.6 (-OCH₃), 97.9 (C-1''), 77.8 (C-2''), 77.5 (C-3''), 70.0 (C-4''), 76.7 (C-5''), 60.8 (C-6''), 95.3 (C-1'''), 70.7 (C-2'''), 70.8 (C-3'''), 72.5 (C-4'''), 68.6 (C-5'''), 16.8 (C-6''')。以上波谱数据与文献^[16]报道的基本一致, 故鉴定化合物 10 为野漆树苷。

化合物 11 黄色粉末(甲醇); mp. 177 ~ 178 °C, ESI-MS: m/z 609 [M-H]⁺, ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 6.18 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 7.43 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-2'), 6.82 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 7.54 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, H-6'), 5.35 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-1''), 4.39 (1H, br s, H-1'''), 3.05 ~ 3.78 (10H, Sugars-H), 12.63 (1H, br s, 5-OH), 9.68 (3H, br s, 7,

$3',4'$ -OH); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 156.1 (C-2), 133.2 (C-3), 177.1 (C-4), 162.3 (C-5), 98.4 (C-6), 163.6 (C-7), 93.3 (C-8), 157.7 (C-9), 103.5 (C-10), 121.8 (C-1'), 115.4 (C-2'), 144.0 (C-3'), 148.3 (C-4'), 116.5 (C-5'), 121.4 (C-6'), 101.9 (C-1''), 74.8 (C-2''), 76.5 (C-3''), 70.0 (C-4''), 76.7 (C-5''), 68.8 (C-6''), 100.3 (C-1'''), 70.7 (C-2'''), 70.8 (C-3'''), 72.5 (C-4'''), 68.6 (C-5'''), 17.8 (C-6''').以上波谱数据与文献^[17]报道的基本一致,故鉴定化合物**11**为芦丁。

化合物 12 黄色粉末(甲醇);mp. 218~220 °C, ESI-MS: m/z 431 [M-H]⁻, ^1H NMR (600 MHz,

DMSO- d_6) δ : 6.48 (1H, s, H-6), 6.85 (1H, s, H-8), 8.05 (2H, d, J =8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82 (2H, d, J =8.5 Hz, H-3', 5'), 4.66 (1H, d, J =9.6 Hz, H-1''), 3.35~3.78 (6H, m, sugars-H), 13.22 (1H, br s, 5-OH); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.1 (C-2), 102.2 (C-3), 182.1 (C-4), 156.3 (C-5), 104.4 (C-6), 162.6 (C-7), 98.3 (C-8), 161.7 (C-9), 104.5 (C-10), 121.8 (C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 115.0 (C-3', 5'), 160.3 (C-4'), 73.9 (C-1''), 70.8 (C-2''), 78.5 (C-3''), 70.0 (C-4''), 81.7 (C-5''), 61.8 (C-6'')。

以上波谱数据与文献^[17]报道的基本一致,故鉴定化合物**12**为异牡荆素。

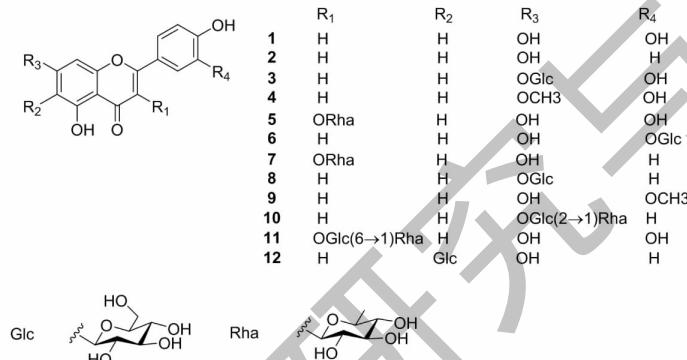


图 1 化合物 1~12 化学结构
Fig. 1 Structures of compounds 1-12

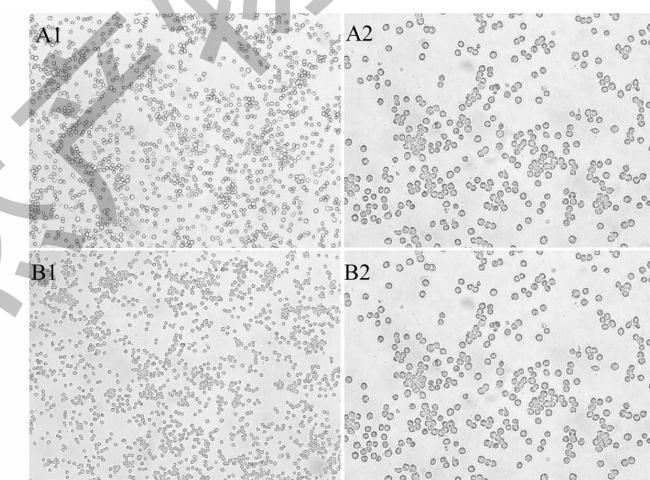


图 2 正常 MH-S 细胞与 LPS 诱导的 MH-S 细胞的形态

Fig. 2 The MH-S morphology of normal cell and LPS induction cell

注:A1. 正常 MH-S 细胞(100 \times);A2. 正常 MH-S 细胞(200 \times);B1. LPS 诱导 MH-S 细胞(100 \times);B2. LPS 诱导 MH-S 细胞(200 \times)。

Note: A1. Normal MH-S (100 \times); A2. Normal MH-S(200 \times); B1. MH-S LPS induction (100 \times); B2. MH-S LPS induction (200 \times).

2.2 细胞毒性及抗炎活性

显微镜下观察发现(正常 MH-S 细胞与 LPS 诱

导 MH-S 细胞的形态见图 2),正常 MH-S 细胞和 LPS 诱导 MH-S 细胞均半悬浮生长,细胞呈圆形或

不规则形; LPS 造模后细胞悬液较为浑浊, 细胞生长

浓度不会对细胞生长造成影响。

状态未见明显差别, 说明本次实验所用的 LPS 造模

表 1 化合物 1~12 对 LPS 诱导的小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 的细胞毒性和一氧化氮产生的抑制效果

Table 1 Cytotoxicity and inhibitory effects of compounds 1~12 against LPS-induced

NO production in mouse alveolar macrophage MH-S cells

化合物 Compound	细胞存活率 Cell viability (in 50 μmol/L) (%)	NO 抑制率 NO inhibition rate (in 50 μmol/L) (%)
1	94.36	57.45
2	96.7 (in 12.5 μmol/L)	44.08 (in 12.5 μmol/L)
3	98.22	48.11
4	86.27	52.55
5	100.52	52.74
6	94.84	31.89
7	227.67	34.00
8	97.77 (in 12.5 μmol/L)	8.30 (in 12.5 μmol/L)
9	83.12	53.58
10	89.3 (in 100 μmol/L)	3.43 (in 100 μmol/L)
11	112.16	42.08
12	94.2 (in 100 μmol/L)	32.42 (in 100 μmol/L)
氨基胍 Aminoguanidine	96.12	60.45

注: NO 抑制率测试均选取最佳给药浓度进行试验。以氨基胍为阳性对照。

Note: The best administration for concentrating was selected for inhibitory effects. Aminoguanidine was used as the positive control.

由表 1 可知, 化合物 1、3、4、6、9、11 在 50 μmol/L 浓度下对 MH-S 细胞 24 h 的细胞毒性较小, 细胞存活率高, 化合物 2、8 毒性较大, 浓度为 12.5 μmol/L 时细胞存活率较高, 化合物 10、12 毒性较小, 在 100 μmol/L 浓度下细胞存活率较高, 化合物 5、7 基本无毒性, 且具有明显的促进细胞增殖的生物活性。

对化合物 1~12 在最佳给药浓度下进行抗炎活性筛选, 发现被测试化合物对 LPS 诱导的 MH-S 细胞均有一定的抗炎活性, 化合物 1、3、4、5、9、11 在浓度为 50 μmol/L 时均表现出了较好的抑制 NO 生成的活性, 化合物 2 在浓度为 12.5 μmol/L 时表现出了较好的抗炎活性, 对于这些化合物的潜在抗炎活性还有待进一步研究, 化合物 8、10 基本无抗炎活性。构效关系分析结果表明不论在 A 环还是 B 环, 酚羟基有助于抗炎活性的增强, 无羟基化合物几乎无抗炎活性; 酚羟基糖基化后, 活性有所降低, 甚至消失; B 环邻位羟基取代时, 活性显著增强; 羟基甲氧基化后其抗炎活性显著增强。

2.3 抗补体活性结果

抗补体活性实验结果显示, 12 个黄酮类化合物除化合物 4、9 外均具有一定的抗补体活性, 其中化合物 1、6 和 10 活性最好, 化合物 7、8 活性较差(见表 2), 分析其构效关系可知, 黄酮类化合物抗补体

表 2 鸭胆子中黄酮抗补体活性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 The anticomplementary activity of flavones from the seeds of *Brucea javanica* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物 Compound	CH ₅₀ (mg/mL)
1	0.445 ± 0.046
2	0.559 ± 0.078
3	0.622 ± 0.032
4	NE
5	0.678 ± 0.018
6	0.415 ± 0.015
7	1.172 ± 0.012
8	1.656 ± 0.089
9	NE
10	0.320 ± 0.019
11	0.639 ± 0.034
12	0.595 ± 0.065
肝素钠 Heparin sodium *	0.085 ± 0.133

注: * 阳性对照。

Note: * Positive control.

活性主要是由于其含有多个酚羟基, 一般情况下酚羟基越多活性越好, 这与文献报道一致^[4]; 当黄酮 C-3、C-7 位双糖苷取代后, 黄酮抗补体活性略有增

强;当黄酮 C-3、C-7 位单糖昔取代同时 C 环邻羟基取代时,化合物抗补体活性明显增强;甲氧基取代后,活性显著下降,基本无活性;B 环糖取代后,活性显著增强。

3 结论

巨噬细胞是吞噬细胞的一种,是机体抵抗外来病原体入侵的重要组成部分,其主要功能是对病原体进行吞噬并激活免疫细胞进而引起炎症反应。肺泡巨噬细胞(MH-S)长期存在于肺泡中,是肺抵御外部侵袭的重要防线,在肺部免疫系统中发挥至关重要的作用^[19]。肺部在受到外界致病因素的刺激时,会释放大量炎症因子,引起多种肺部疾病,如急性肺损伤、急性支气管哮喘、肺纤维化等。炎症反应是抵御病原微生物入侵机体的一种重要防御反应,LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁中的一种成分,能够诱导巨噬细胞释放大量炎症介质。本文基于 LPS 诱导的 MH-S 细胞模型,对鸦胆子果实中黄酮类化学成分进行抗炎及抗补体活性筛选研究。结果表明,化合物 **1**、**3**、**4**、**6**、**9**、**11** 在 50 μmol/L 浓度下对 MH-S 细胞 24 h 的细胞毒性较小,细胞存活率高,化合物 **2**、**8** 毒性较大,浓度为 12.5 μmol/L 时细胞存活率较高,化合物 **10**、**12** 毒性较小,在 100 μmol/L 浓度下细胞存活率较高,化合物 **5**、**7** 基本无毒性,且具有明显的促进细胞增殖的生物活性。被测化合物均表现出一定的一氧化氮(NO)抑制活性,构效关系明显,酚羟基越多活性越好,甲氧基化后,抗炎活性显著增强,糖基化后,活性略有降低;B 环羟基取代对化合物抗炎活性影响最大,2 个羟基时活性最好,1 个羟基次之,无羟基几乎无抑制作用,邻位羟基取代时,活性显著增强。此外,本实验还对化合物 **1~12** 进行了抗补体活性筛选,分析其构效关系可知,其抗补体活性主要与化合物所连接酚羟基的数目有关,一般情况下酚羟基越多活性越好;当黄酮 C-3、C-7 位双糖昔取代后,黄酮抗补体活性略有增强,当黄酮 C-3、C-7 位单糖昔取代同时 C 环邻羟基取代时,化合物抗补体活性明显增强;甲氧基取代后,活性下降,基本无活性;B 环被糖取代后,活性增强。本文进一步丰富了苦木科鸦胆子属植物的研究内容,发现鸦胆子中成分通过抑制 MH-S 细胞的炎症效应,可能对急性肺损伤有一定的治疗作用,为鸦胆子的后期研究提供了一定的参考。

参考文献

1 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 Press, 2020:299.
- 2 Luo Y, Shen HY, Zhang M, et al. Chemical constituents from the dregs of *Brucea javanica* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2019, 27:294-298.
 - 3 Zhao L, Li C, Zhang Y, et al. Phytochemical and biological activities of an anticancer plant medicine: *Brucea javanica* [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14:440-458.
 - 4 Ding F, Hang LT, Gao HW, et al. Isolation of chemical ingredients from *Aster ageratoides* and their anticomplement and antiinflammat activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:2028-2035.
 - 5 Zhu GJ, Yu ZB, Li SJ, et al. Effect of diallyl trisulfide on production of cytokines in mice lung alveolus macrophage cell line MH-S cells treated with lipopolysaccharide [J]. Chin J Crit Care Med(中国急救医学), 2006, 26:680-682.
 - 6 Xu X, Wu B, Zhan YZ, et al. Steroids from herbs of *Reineckia carnea* and their anticomplement activities [J]. Nat Prod Res, 2019, 33:1570-1576.
 - 7 Chen L, Wang Q, Wu B, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Disporum cantoniense* (Ⅱ) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:4803-4807.
 - 8 Wen JH, Ni FY, Li M, et al. Chemical constituents from *Salvia plebeian* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41: 2393-2397.
 - 9 Wang ZY, Yang ML, Wang JT, et al. Chemical constituents and anti-tumor activity from the leaves of *Cynara scolymus* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42:1301-1305.
 - 10 Lu Y, Dai JM, Li YH, et al. Study on the flavonoids from *Hemiphragma heterophyllum* Wall [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2017, 26(18):21-24.
 - 11 Shang YL, Shi RJ. Phenolic glycosides from the fruits of *Illiocitum verum* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38: 107-110.
 - 12 Zhang W, Ge DD, Xue J, et al. Isolation and identification of flavonoids of whole plant of *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2011, 28:186-189.
 - 13 Li YZ, Li ZL, Hua HM, et al. Studies on flavonoids from stems and leaves of *Calophyllum inophyllum* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32:692-694.
 - 14 Liang S, Lu SH, Wu XC, et al. Chemical constituents from *Ixeridium chinese* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2019, 41:2126-2130.

(下转第 1991 页)