

# 山茱萸抗过敏活性组分的筛选及其对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的作用

张歌珂,刘学\*,杨成,孙亚娟

江南大学化学与材料工程学院 合成与生物胶体教育部重点实验室,无锡 214122

**摘要:**为研究山茱萸中抗过敏活性成分,采用透明质酸酶抑制实验对山茱萸中活性组分进行初步筛选;采用细胞脱颗粒抑制实验对透明质酸酶抑制活性较高的组分进一步评估;采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)进行成分分析。结果表明山茱萸石油醚部位(petroleum ether extract of Corni Fructus, COPE)具有显著透明质酸酶抑制活性,其 $IC_{50}$ 值为 3.11 mg/mL;经硅胶柱层析分离得到 4 个透明质酸酶抑制活性更高的组分,其中组分 COPE-8 对 RBL-2H3 细胞脱颗粒抑制作用更显著,呈剂量依赖形式且具低细胞毒性。经 20  $\mu$ g/mL COPE-8 处理后,RBL-2H3 细胞脱颗粒释放的组胺和 $\beta$ -氨基己糖苷酶分别减少 46% 和 39%;经 GC-MS 分析,COPE-8 中主要活性物质为萜类物质,包括 $\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇和香紫苏醇。结果表明 COPE-8 具有显著的抗过敏活性,在抗过敏活性物开发方面具有一定的应用价值。

**关键词:**山茱萸;抗过敏;透明质酸酶抑制;细胞脱颗粒;GC-MS

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)7-1196-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.7.013

## Screening of anti-allergic components from Corni Fructus and their effects on RBL-2H3 cells degranulation

ZHANG Ge-ke, LIU Xue\*, YANG Cheng, SUN Ya-juan

Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** In the present study, the potential anti-allergic constituents in Corni Fructus were investigated. The anti-allergic components of Corni Fructus were preliminarily screened by hyaluronidase inhibition assay. The fractions with high hyaluronidase inhibition activity were further evaluated by the degranulation inhibition test of RBL-2H3 cells *in vitro*. The anti-allergic components were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that the petroleum ether extract of Corni Fructus (COPE) had a significantly anti-hyaluronidase activity with an  $IC_{50}$  value of 3.11 mg/mL. Four fractions with higher anti-hyaluronidase activity were separated by silica gel column chromatography, among which COPE-8 had a more significant inhibitory effect on RBL-2H3 cell degranulation in a dose-dependent manner and showed low cytotoxicity. After treatment with 20  $\mu$ g/mL COPE-8, the histamine and  $\beta$ -hexosaminidase released from RBL-2H3 cells were reduced by 46% and 39%, respectively. The main active components in COPE-8 were  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, and sclareol, by GC-MS analysis. These findings signpost that COPE-8 has remarkable anti-allergic activity and has potential application in the development of anti-allergic active substances.

**Key words:** Corni Fructus; anti-allergy; anti-hyaluronidase; cell degranulation; GC-MS

过敏疾病是世界卫生组织列入 21 世纪重点研究和防治的疾病之一,在世界范围内的发病率已达到 20% ~ 30%,故寻找有效抗过敏药物是目前的研究

热点。目前抗过敏化学药物有很多,但大多具有作用环节单一,且副作用较大的特点<sup>[1]</sup>,而植物提取物是具有不同结构和来源的天然化合物的复杂混合物<sup>[2]</sup>,具有多靶点的抗过敏能力,对过敏反应的不同关键步骤均有影响,且作用缓和,副作用小<sup>[3]</sup>。我国中药资源丰富,为抗过敏天然物质的研究提供

收稿日期:2022-02-17

接受日期:2022-05-11

基金项目:国家自然科学基金(51903108)

\*通信作者 Tel:86-013382888538; E-mail: xueliu@jiangnan.edu.cn

了较好的基础。

山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)是我国的一种药食同源植物,含有环烯醚萜及其苷、三萜类、黄酮类等物质,在中医理论中,具有良好的补益功效,常用于治疗虚症、肝肾疾病和生殖系统疾病<sup>[4]</sup>。山茱萸具有多种生物活性,如抗过敏、抗炎、抗氧化、抗糖尿病、抗骨质疏松、血管舒张等活性<sup>[5,6]</sup>。

Kim 等<sup>[7]</sup>研究发现山茱萸水提取物可抑制 OVA 诱导的哮喘模型中的肺过敏反应,具有一定的抗过敏功效。Kao 等<sup>[8]</sup>发现含有山茱萸的中药组方可有效缓解过敏原 Der-p 诱导的过敏性哮喘症状,降低血清中 IgE 水平。Li 等<sup>[9]</sup>究发现含有山茱萸的中药制剂(山茱萸占比 11%)对皮肤瘙痒、PCA 反应和皮肤功能障碍有明显的抑制作用。特应性皮炎是一种过敏性皮肤疾病,Mechesso 等<sup>[10]</sup>报道了 C2RPL 提取物(山茱萸:多花玫瑰:胡枝子:侧柏:锥栗比例为 4:1:1:1 的组方)可改善特应性皮炎症状,呈浓度依赖形式减少  $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放,表明其具有抗过敏活性。Quah 等<sup>[6]</sup>发现山茱萸 70% 乙醇提取物能减少抗 DNP IgE 诱导的  $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放,表明具有抗过敏功效。

目前,对山茱萸提取物中起抗过敏作用的具体成分尚未见有报道。故本文在前期研究的基础上进一步对山茱萸中抗过敏活性成分进行探究,旨在发现山茱萸中具有抗过敏活性的确切成分。过敏反应根据其机理分为 I、II、III、IV 型,由化学介质如组胺、前列腺素、白三烯、炎症因子等诱发<sup>[11]</sup>,研究表明,绝大部分 I 型过敏疾病与体内透明质酸酶(HAase)活性相关,且 HAase 是直接控制肥大细胞脱颗粒(与 IV 型过敏反应相关)的靶酶之一<sup>[12]</sup>,因而透明质酸酶抑制实验和肥大细胞脱颗粒抑制实验常用于体外抗过敏研究。

本文以透明质酸酶抑制活性为指标筛选山茱萸中的抗过敏组分,通过 MTT 法和细胞脱颗粒抑制实验进一步考察其抗过敏活性,得到抗过敏活性最高的组分,最后采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)对其进行分析鉴定,以明确山茱萸中具有抗过敏活性的成分,为综合开发利用山茱萸中抗过敏活性成分提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc.)果实材

料购于北京同仁堂,批号 471201201;透明质酸(HA,分子量 1 000 000,批号 H0443562)购于天津希恩思生化科技有限公司;透明质酸酶来源于牛睾丸(50 KU,批号 H128644)、牛血清白蛋白(纯度 96%,批号 A116563)、芹菜素(纯度  $\geq 98\%$ ,批号 A106676)、钙离子载体 A23187(纯度  $\geq 97\%$ ,批号 C137844)、邻苯二甲醛(OPA,纯度 98%,批号 P108632)、4-硝基苯基-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(PNAG,纯度 98%,批号 N107918)和组胺(纯度 96%,批号 H111796)购于上海阿拉丁生化科技有限公司(中国);Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM,批号 SH30284.01)购于 Hyclone 公司;双抗(批号 15140122)和胰蛋白酶(批号 25200056)购于 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA);胎牛血清(批号 FBS-PN500)购于 Newzerum(Upper Riccarton, Christchurch, New Zealand);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,纯度 99%,批号 M2128)购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;二甲基亚砜(DMSO,批号 20210310)、磷酸氢二钠(批号 20201012)、磷酸二氢钠(批号 20201112)、氯化钠(批号 20210310)、冰醋酸(批号 20201127)、石油醚(60~90℃,批号 20200412)、正丁醇(批号 20200412)、乙酸乙酯(批号 20200812)购于国药集团,试剂均为分析纯。

旋转蒸发器(德国 IKA 公司);CYTATION 5 多功能微孔板酶标仪(美国 Bio Tek 公司);快速制备色谱仪(Isolera One 瑞典 Biotage 公司);QP2010Ultra 型气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 山茱萸不同极性部位的制备

将山茱萸果实烘干,粉碎后准确称取山茱萸粉末 100 g,按 1:15(g/mL)的比例加入 75% 乙醇溶液,40℃ 超声处理 40 min,抽滤,滤渣继续重复提取 3 次,合并滤液,滤液用 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤后,旋蒸至无醇味,加入去离子水分散均匀,依次用石油醚(60~90℃)、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,静置过夜,萃取液分别减压旋蒸至干,得到石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和水提取物,分别命名为 COPE、COEE、CONE 和 COWE,4℃ 储存备用。

#### 1.2.2 COPE 分离纯化

采用快速制备色谱对 COPE 进一步分离纯化,将 COPE 以干法上样于硅胶柱顶端,首先用石油醚

洗脱,再以石油醚和乙酸乙酯进行梯度洗脱(石油醚/乙酸乙酯 100:0→0:100),最后用乙醇洗脱。对洗脱流分进行薄层色谱分析(TLC),根据 TLC 分析结果合并流分,得到 18 个组分,依次命名为 COPE-1~COPE-18。将各组分在 30 °C 下减压旋蒸至干,称重后用石油醚定容,-20 °C 储存备用。

### 1.2.3 透明质酸酶(HAase)抑制实验

参照文献<sup>[13]</sup>方法并适当改善,测定样品对 HAase 活性的抑制作用。简述如下:分别取 100 μL HAase(20 mmol/L 溶于磷酸缓冲液 pH 7)与 5 μL 样品加入离心管中,混匀后 37 °C 反应 10 min;加入 100 μL 透明质酸溶液(0.05%,溶于 300 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH 5.35),37 °C 反应 45 min;加入 1 mL 酸性白蛋白溶液(0.1% 牛血清白蛋白溶于醋酸缓冲液 pH 3.75)使未分解的透明质酸沉淀,室温下反应 10 min 后立即用酶标仪在 600 nm 处测定吸光值。对照组将 HAase 替换为 100 μL 磷酸缓冲液。空白组将样品替换为 5 μL 水。阳性对照品为芹菜素,阴性对照为样品溶剂,每组样品重复 3 次。IC<sub>50</sub> 值为抑制率为 50% 时的样品浓度。HAase 抑制率计算公式如下:

透明质酸酶抑制率 =

$$\left[ \left( 1 - \frac{A_s - B_s}{A_w - B_w} \right) - \frac{A_n - B_n}{A_w - B_w} \right] \times 100\%$$

式中: $A_s$  为不含 HAase 的样品的吸光值; $B_s$  为含 HAase 的样品的吸光值; $A_n$  为不含 HAase 的样品溶剂的吸光值; $B_n$  为含 HAase 的样品溶剂的吸光值; $A_w$  为不含 HAase 的空白组的吸光值; $B_w$  为含 HAase 的空白组的吸光值。

### 1.2.4 MTT 法测定活性组分的细胞毒性

RBL-2H3 细胞在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养,细胞培养液使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM。在细胞长至 80%~90% 时,在 96 孔板以  $1.5 \times 10^5$  个/mL 的密度接种细胞。细胞活力通过 MTT 实验进行,具体步骤如下所述<sup>[14]</sup>,细胞在 96 孔板中孵育 24 h 后,加入样品 100 μL 再次孵育 24 h,弃培养液加入 100 μL 0.05% MTT 溶液,避光培养 4 h,小心吸去溶液,加入 100 μL DMSO,酶标仪振荡后测定 490 nm 处的吸光值,按下述公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \times 100\%$$

式中: $A_s$  为样品组吸光值; $A_b$  为对照组吸光值;

$A_b$  为空白组吸光值。

### 1.2.5 细胞脱颗粒抑制实验

采用钙离子载体 A23187 刺激细胞脱颗粒。RBL-2H3 细胞与样品于 37 °C 孵育 30 min 后,加入钙离子载体(400 ng/mL,溶于台式液)37 °C 孵育 30 min。收集上清液,-20 °C 储存备用。

#### 1.2.5.1 β-氨基己糖苷酶释放检测

β-氨基己糖苷酶释放依据文献<sup>[3]</sup>方法测定。取 30 μL 上清液至 96 孔板中,加入 50 μL PNAG(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 pH 4.5,1.3 mg/mL)混匀,37 °C 反应 60 min。然后加入 80 μL 0.5 mol/L NaOH。酶标仪测定反应液在 405 nm 处的吸光度。

#### 1.2.5.2 组胺释放检测

组胺释放的测定参考文献<sup>[15]</sup>并适当改善。通过将组胺转化为荧光组胺-OPA-产物间接测定组胺含量。250 μL 上清液中加入 50 μL 1 mol/L NaOH 和 12.5 μL 1% OPA,将组胺转化为荧光组胺 OPA 产物。室温反应 4 min 后,加入 25 μL 3 mol/L HCl 终止反应。通过酶标仪测定荧光强度,激发波长为 360 nm,发射波长为 450 nm。组胺释放率以样品组吸光值与最大释放组吸光值的比值表示。

### 1.2.6 GC-MS 分析

GC-MS 分析条件参考文献<sup>[16,17]</sup>,并适当调整。

气相色谱条件:色谱柱(RTX-5MS 30 m × 0.25 mm,0.25 μm);载气为氦气,进样量 1 μL;流速为 1.1 mL/min;分流比 30:1;柱箱温度设置为 100 °C,保持 1 min,然后升至 220 °C,再以 30 °C/min 的速度升至 300 °C,保持 10 min。

质谱条件:离子源 EI 200 °C;电子能量 70 eV;倍增电压 1 000 V;质量扫描范围:34~850 amu;采集方式:扫描。采用峰面积归一化法确定组分的相对含量;以标准谱库 NIST11 作为质谱数据库。

## 2 结果与分析

### 2.1 山茱萸不同极性部位的透明质酸酶抑制作用

透明质酸酶抑制实验结果显示 COPE 的透明质酸酶抑制活性最高(IC<sub>50</sub> 值为 3.11 mg/mL),其次是 COWE(IC<sub>50</sub> 值为 13.31 mg/mL)和 COEE(IC<sub>50</sub> 值为 18.16 mg/mL),CONE 的抑制活性较低,IC<sub>50</sub> 值为 65.47 mg/mL。山茱萸中极性较小的物质的抗过敏活性更高。因此,对 COPE 进一步分离纯化。

### 2.2 COPE 分离纯化及透明质酸酶抑制作用

经硅胶柱色谱分离纯化共获得 55 个流分,分别标记为石油醚洗脱流分、1~53 和乙醇洗脱流分,1

~53 号流分的 TLC 分析结果如图 1 所示,综合紫外光灯(365 nm)下检识的结果和 10% 硫酸乙醇溶液显色检识的结果,将具有相同  $R_f$  值且颜色相同的点进行合并,分别将合并的流分进行减压浓缩,最终得

到 18 个组分,依次命名为 COPE-1 ~ COPE-18。其中,COPE-1 的产率最高,为 21.2%,其次是 COPE-18(19.2%)和 COPE-4(13.8%)。

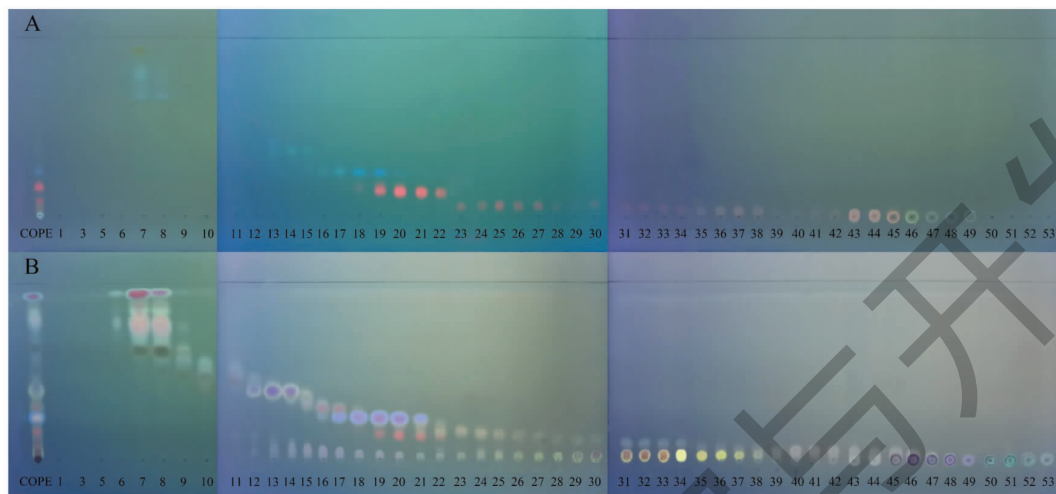


图 1 COPE 流分薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of fractions of COPE

注:A;紫外光灯显色(365 nm);B:10%硫酸乙醇溶液显色。Note:A;Coloration results under UV lamp (365 nm); B;Coloration results of 10% sulfuric acid ethanol solution.

本实验采用同为天然化合物的芹菜素作为阳性对照品,其是一种已知的透明质酸酶抑制剂<sup>[18,19]</sup>。COPE-1 ~ COPE-18 的透明质酸酶抑制活性如图 2

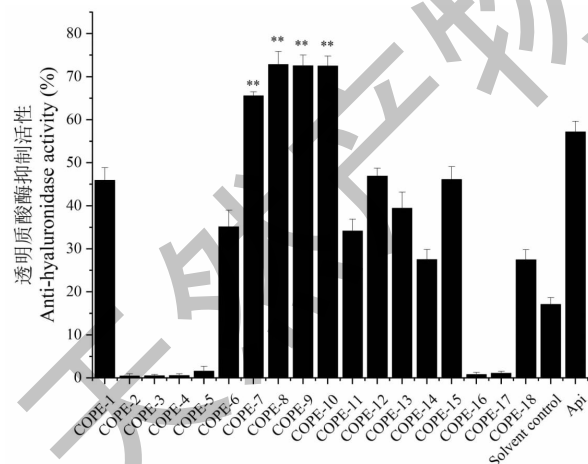


图 2 石油醚部位组分的透明质酸酶抑制活性

Fig. 2 Anti-hyaluronidase activity of 18 fractions of COPE  
注:COPE-1 ~ COPE-18 浓度为 2.5 mg/mL; Api 为芹菜素,浓度为 2.5 mg/mL; Solvent control 为样品溶剂(20% DMSO)对照;与芹菜素相比, \*\*  $P < 0.01$ 。Note: The concentrations of COPE-1- COPE-18 are 2.5 mg/mL; Api is apigenin (2.5 mg/mL); Solvent control is the solvent of sample (20% DMSO); Compared with Api, \*\*  $P < 0.01$ .

所示,其中有 12 个组分与溶剂对照存在显著差异, COPE-8、COPE-9、COPE-10 在 2.5 mg/mL 的浓度下对透明质酸酶抑制作用相当, COPE-7 抑制作用略低,但它们都优于同浓度的阳性对照品芹菜素。COPE-7、COPE-8、COPE-9、COPE-10 对透明质酸酶的  $IC_{50}$  值分别为 1.12、1.07、0.87、1.04 mg/mL,均低于芹菜素的  $IC_{50}$  值(2.02 mg/mL),表明它们均具有优异的透明质酸酶抑制活性,具有较好的抗过敏潜力。继续通过细胞脱颗粒抑制实验考察 4 个组分对 RBL-2H3 细胞脱颗粒释放组胺和  $\beta$ -氨基己糖苷酶的抑制作用作进一步筛选。

## 2.3 山茱萸抗过敏组分的脱颗粒抑制作用

### 2.3.1 山茱萸抗过敏组分的细胞毒性

采用 MTT 法检测不同组分对 RBL-2H3 细胞活力的影响,结果如图 3 ~ 6 所示, COPE-7 在所有测试浓度下,对细胞均无毒性(细胞活力  $\geq 90\%$ ); COPE-8 在不高于 20  $\mu\text{g/mL}$  的浓度下没有明显的细胞毒性; COPE-9 和 COPE-10 在不高于 1.25  $\mu\text{g/mL}$  的浓度下,没有明显的细胞毒性。

### 2.3.2 山茱萸抗过敏组分对组胺和 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放的抑制作用

RBL-2H3 细胞脱颗粒已广泛应用于过敏和免

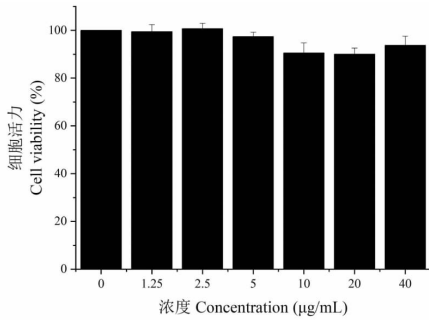


图3 COPE-7的细胞毒性

Fig. 3 Cytotoxicity of COPE-7

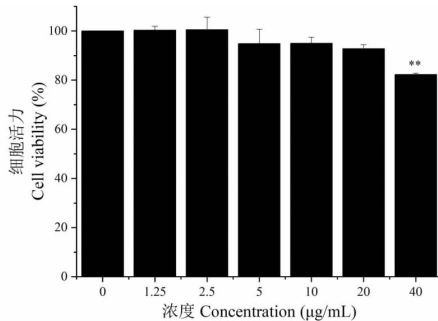


图4 COPE-8的细胞毒性

Fig. 4 Cytotoxicity of COPE-8

注:与对照组(样品浓度为0 µg/mL)相比, \*\*  $P < 0.01$ ,下同。

Note: Compared with control (the concentration of sample is 0 µg/mL), \*\*  $P < 0.01$ , the same below.

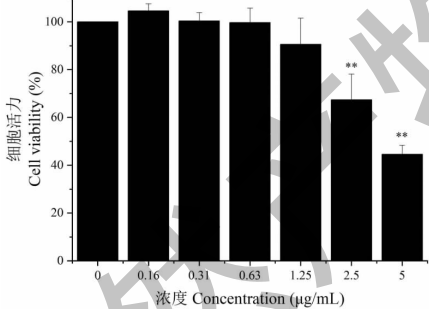


图5 COPE-9的细胞毒性

Fig. 5 Cytotoxicity of COPE-9

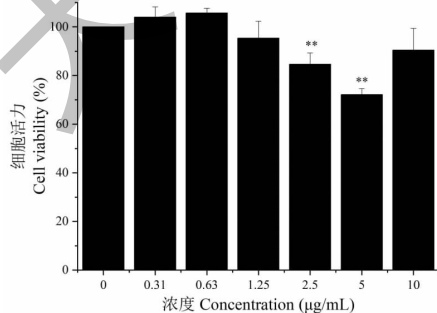


图6 COPE-10的细胞毒性

Fig. 6 Cytotoxicity of COPE-10

疫学研究,特别是在筛选分离的化合物和天然提取物的抗过敏特性方面得到了广泛的应用<sup>[3]</sup>。刺激物钙离子载体 A23187 在不高于 400 ng/mL 的浓度时无细胞毒性,因此实验使用 400 ng/mL 的 A23187 对 RBL-2H3 细胞进行刺激。脱颗粒抑制实验结果如图 7 ~ 10 所示,4 个组分均呈浓度依赖形式抑制 A23187 刺激的细胞脱颗粒水平。COPE-7、COPE-8、COPE-9、COPE-10 在无细胞毒性的最高浓度下分别将组胺水平降至  $(47.6 \pm 1.9)\%$ 、 $(54.3 \pm 0.9)\%$ 、 $(67.0 \pm 2.3)\%$  和  $(73.3 \pm 2.7)\%$ ; 将  $\beta$ -氨基己糖苷酶水平降至  $(55.3\% \pm 1.2)\%$ 、 $(60.8\% \pm 3.3)\%$ 、 $(72.6\% \pm 3.4)\%$  和  $(82.0 \pm 1.6)\%$ 。由结果看出,与 COPE-7 相比,同浓度条件下 COPE-8 的抑制作用最好,分别将组胺水平和  $\beta$ -氨基己糖苷酶水平降低

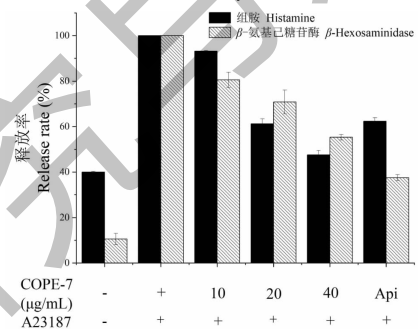


图7 COPE-7对组胺和β-氨基己糖苷酶释放的抑制作用

Fig. 7 The effect of COPE-7 on  $\beta$ -hexosaminidase and histamine release

注:Api 为芹菜素,浓度为 20 µg/mL; A23187 为刺激物钙离子载体 A23187,浓度为 400 ng/mL;“+”表示添加,“-”表示不添加;与“样品(-), A23187(+)”相比, \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ,下同。Note: Api is apigenin (20 µg/mL); A23187 is calcium ionophore A23187 (400 ng/mL); ‘+’ means to add; ‘-’ means not to add; Compared with ‘sample (-), A23187 (+)’, \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ . The same below.

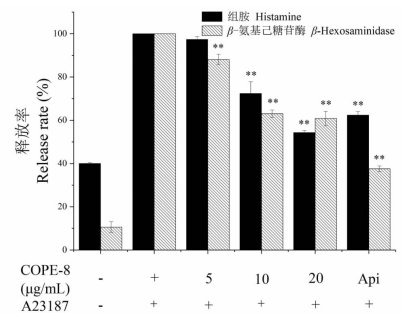


图8 COPE-8对组胺和β-氨基己糖苷酶释放的抑制作用

Fig. 8 The effect of COPE-8 on  $\beta$ -hexosaminidase and histamine release

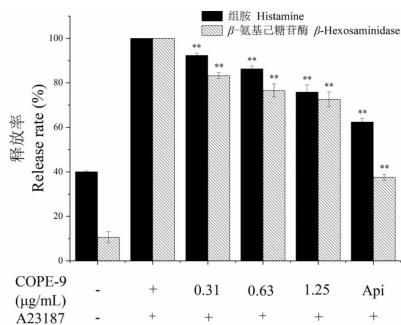


图9 COPE-9对组胺和β-氨基己糖苷酶释放的抑制作用

Fig. 9 The effect of COPE-9 on β-hexosaminidase and histamine release

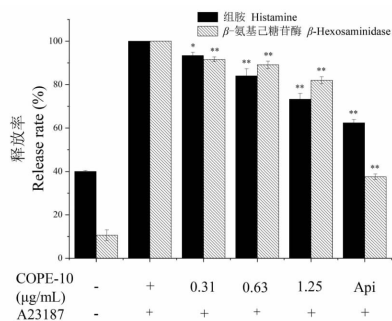


图10 COPE-10对组胺和β-氨基己糖苷酶释放的抑制作用

Fig. 10 The effect of COPE-10 on β-hexosaminidase and histamine release

了46%和39%。因此,推测 COPE-8 为山茱萸中最主要的抗过敏活性物质。

### 2.4 COPE-8 的化学成分分析

4个活性组分中,COPE-9和COPE-10的细胞毒性较高,与COPE-7相比,COPE-8对RBL-2H3细胞脱颗粒抑制作用最好,且得率相对较高(6.5%),成分组成相对较少,故对COPE-8进行GC-MS分析,

得到的 COPE-8 总离子流色谱图见图 11,利用峰面积归一法对各成分的相对含量进行计算,与标准谱库 NIST11 的质谱峰进行比对共鉴定出 12 个化合物,由表 1 可见,已鉴定成分占总 COPE-8 的 96.01%,其主要成分为 α-香树脂醇(19.12%)、6a,14a-甲醇烯,全氢-1,2,4a,6b,9,9,12a-七甲基-10-羟基(16.71%)、n-棕榈酸(16.38%)、δ-14-千层塔烯(13.1%)和 β-香树脂醇(11.94%)。α-香树脂醇和 β-香树脂醇都是五环三萜类化合物,结构非常相似,已有研究表明两种三萜类化合物的混合物显示出免疫刺激、抗炎、抗焦虑和抗抑郁活性<sup>[20]</sup>,其中 β-香树脂醇具有较好的透明质酸酶抑制活性,其 IC<sub>50</sub> 值为 33.98 μg/mL<sup>[21]</sup>。据 Oliveira 等报道,α-香树脂醇和 β-香树脂醇可有效抑制小鼠的抓挠行为,且显著抑制化合物 48/80 诱导的肥大细胞脱颗粒,抑制率高达 86%<sup>[22]</sup>,表明 α-香树脂醇和 β-香树脂醇具有一定的抗过敏活性。香紫苏醇可显著减轻特异性皮炎症状,减少肥大细数量<sup>[23]</sup>,且能通过减少炎症细胞因子的表达和提高抗氧化酶的活性表现出对 LPS 刺激的巨噬细胞的抗炎活性<sup>[24]</sup>。

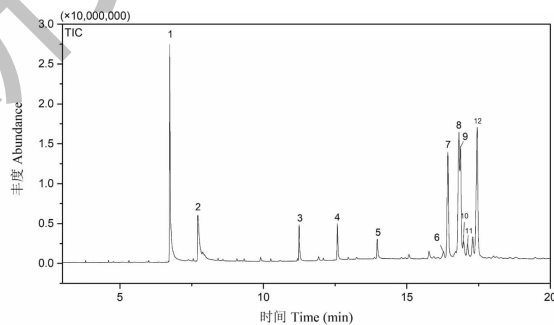


图11 COPE-8 的总离子流图

Fig. 11 Total ion chromatogram of the COPE-8

表 1 COPE-8 化学成分

Table 1 The chemical composition of the COPE-8

序号 No.	保留时间 t <sub>R</sub> (min)	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound
1	6.737	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	16.38	n-棕榈酸 n-Hexadecanoic acid
2	7.712	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	7.84	9,12-十八碳二烯酸 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)
3	11.246	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	2.64	正二十四醇-1 n-Tetracosanol-1
4	12.579	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O	2.75	1-二十七烷醇 1-Heptacosanol
5	13.97	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O	1.18	1-三十烷醇 1-Triacontanol
6	16.272	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	0.79	桦木醇 Betulin
7	16.43	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	13.1	δ-14-千层塔烯 δ-14-Serratene

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound
8	16.818	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	16.71	6a,14a-甲醇烯,全氢-1,2,4a,6b,9,9,12a-七甲基-10-羟基 6a,14a-Methanopipene, perhydro-1,2,4a,6b,9,9,12a-heptamethyl-10-hydroxy
9	16.871	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	11.94	$\beta$ -香树脂醇 $\beta$ -Amyrin
10	16.978	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	2.12	香紫苏醇 Sclareol
11	17.116	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	1.44	乙酸柏木酯 Cedryl acetate
12	17.453	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	19.12	$\alpha$ -香树脂醇 $\alpha$ -Amyrin

### 3 结论与讨论

本文通过比较山茱萸不同极性部位的透明质酸酶抑制活性,发现山茱萸石油醚部位活性显著高于其他部位,表明山茱萸中极性较小的物质抗过敏活性更高。据 Li 等<sup>[9]</sup>报道,含有山茱萸的中药组方提取物在 3 mg/mL 时对透明质酸酶的抑制率为 70%,具有较好的抗过敏作用,而本文通过硅胶柱色谱法分离得到的组分 COPE-8 仅在 2.5 mg/mL 时就表现出超过 70% 的透明质酸酶抑制率,表明其具有更高的抗过敏活性。

肥大细胞活化后分泌和释放介质及炎症因子等引发过敏反应,此过程称为肥大细胞脱颗粒,是机体发生过敏的重要环节<sup>[25]</sup>。在释放的促炎介质中,组胺是最具特征和最有效的血管活性介质,并被认为是脱颗粒的标志<sup>[26]</sup>。故本实验通过评价 4 个活性组分对组胺和  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放的影响评价其抗过敏活性,进一步筛选得到活性最好的 COPE-8 组分,其在 20  $\mu$ g/mL 时将组胺和  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放水平分别降低 46% 和 39%,而以山茱萸为主的组方 C2RLP 提取物在 30  $\mu$ g/mL 时仅将  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放水平降低 24%<sup>[10]</sup>,此外山茱萸 70% 乙醇提取物在 30  $\mu$ g/mL 时也仅将  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放水平降低 18%<sup>[6]</sup>,进一步说明组分 COPE-8 在抗过敏活性方面的优势。

本研究首次以透明质酸酶抑制活性为导向探索山茱萸中抗过敏活性成分。通过对山茱萸提取物的系统分离纯化,得到具有显著抑制透明质酸酶活性和细胞脱颗粒作用的 COPE-8 组分,其能显著降低钙离子载体 A23187 诱导的组胺和  $\beta$ -氨基己糖苷酶的释放,且优于目前已报道的山茱萸粗提取物或组方提取物,表明其具有较强的抗过敏活性。通过 GC-MS 分析明确了 COPE-8 中的抗过敏活性物质主要为萜类化合物,包括  $\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇和香紫

苏醇,且它们还具有抗炎、抗氧化等作用<sup>[20,24,27]</sup>,表明其具有广泛的生物活性。

综上所述,山茱萸中具有抗过敏活性的成分为  $\alpha$ -香树脂醇、 $\beta$ -香树脂醇和香紫苏醇,其具有较强的抗过敏活性,且兼具抗炎和抗氧化等生物活性,具有广泛的应用前景。

### 参考文献

- Li EC, Fan XY, Lin L, et al. Clinical application of anti-allergic drugs: research advances [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2018, 45(3): 176-181.
- Perez SA, Barrajon CE, Herranz LM, et al. Nutraceuticals for skin care: a comprehensive review of human clinical studies [J]. Nutrients, 2018, 10(4): 403.
- Barbosa M, Lopes G, Valentao P, et al. Edible seaweeds' phlorotannins in allergy: a natural multi-target approach [J]. Food Chem, 2018, 265(1): 233-241.
- Gao X, Liu Y, An Z, et al. Active components and pharmacological effects of *Cornus officinalis*: literature review [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 633447.
- Fan Q, Cheng XB, Rong L, et al. Research progress on chemical constituents, bioactivities, formula applications and quality control of *Cornus officinalis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1244-1258.
- Quah Y, Lee SJ, Lee EB, et al. *Cornus officinalis* ethanolic extract with potential anti-allergic, anti-inflammatory, and antioxidant activities [J]. Nutrients, 2020, 12(11): 3317.
- Kim SH, Kim BK, Lee YC. Effects of *Corni Fructus* on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma [J]. J Inflamm, 2012, 9(1): 9.
- Kao ST, Wang SD, Lin CC, et al. Jin Gui Shen Qi Wan, a traditional Chinese medicine, alleviated allergic airway hyper-sensitivity and inflammatory cell infiltration in a chronic asthma mouse model [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 227: 181-190.

- 9 Li L, Wang XY, Meng H, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic effects of an extract of a traditional Chinese medicine preparation [J]. *Biomed Dermatol*, 2017, 1(1):5.
- 10 Mechesso AF, Lee SJ, Park NH, et al. Preventive effects of a novel herbal mixture on atopic dermatitis-like skin lesions in BALB/C mice [J]. *BMC Complem Altern M*, 2019, 19(1):25.
- 11 Sugiura Y, Matsuda K, Okamoto T, et al. The inhibitory effects of components from a brown alga, *Eisenia arborea*, on degranulation of mast cells and eicosanoid synthesis [J]. *J Funct Foods*, 2009, 1:387-393.
- 12 Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33:642-646.
- 13 Abdullah NH, Thomas NF, Sivasothy Y, et al. Hyaluronidase inhibitory activity of pentacyclic triterpenoids from *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schum: isolation, synthesis and QSAR study [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2):143.
- 14 Park CH, Min SY, Yu HW, et al. Effects of apigenin on RBL-2H3, RAW 264. 7, and HaCaT cells: anti-allergic, anti-inflammatory, and skin-protective activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13):4620.
- 15 Pinho BR, Sousa C, Valentao P, et al. Modulation of basophils' degranulation and allergy-related enzymes by monomeric and dimeric naphthoquinones [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e90122.
- 16 Li GY, Yao YX, Ding X. Studies on chemistry component and the biological activity of petroleum ether extraction from pre- and post-processed of *Cornus officinalis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2010, 33:192-195.
- 17 Bai CK, Peng ML, Wang ZZ. Analysis of fat-soluble components in *Cornus officinalis* flesh and seeds by GC-MS [J]. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28(11):493-496.
- 18 Yingprasertchai S, Bunyasrisawat S, Ratanabanangkoon K. Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms [J]. *Toxicon*, 2003, 42:635-646.
- 19 Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55(1):80-86.
- 20 Okoye NN, Ajaghaku DL, Okeke HN, et al. Beta-amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52:1478-1486.
- 21 Maity N, Nema NK, Abedy MK, et al. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137:1300-1305.
- 22 Oliveira FA, Lima JR, Cordeiro WM, et al. Pentacyclic triterpenoids,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 78:719-725.
- 23 Wu PC, Chuo WH, Lin SC, et al. Sclareol attenuates the development of atopic dermatitis induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice [J]. *Immunopharm Immunot*, 2019, 41(1):109-116.
- 24 Guan JH, Chun HP, Chieh HW. Sclareol exhibits anti-inflammatory activity in both lipopolysaccharide-stimulated macrophages and the  $\lambda$ -carrageenan-induced paw edema model [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(1):54-59.
- 25 Reuter S, Stassen M, Taube C. Mast cells in allergic asthma and beyond [J]. *Yonsei Med J*, 2010, 51:797-807.
- 26 Le QT, Li Y, Qian ZJ, et al. Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga *Ecklonia cava* on histamine release [J]. *Process Biochem*, 2009, 44(2):168-176.
- 27 Viet TD, Xuan TD, Anh H. Alpha-amyrin and beta-amyrin isolated from *Celastrus hindsii* leaves and their antioxidant, anti-xanthine oxidase, and anti-tyrosinase potentials [J]. *Molecules*, 2021, 26(23):7248.