

中图分类号: R932; R284.1; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)05-0034-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.009



基于抗炎活性的香花崖豆藤化学成分研究*

姚采平¹, 邱飞^{1,2}, 郭燕华¹, 李燕华¹, 刘建锋^{1,2,Δ}

(1. 湖南医药学院第一附属医院, 湖南 怀化 418000; 2. 湖南医药学院·洞医药研究湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418000)

摘要:目的 分离香花崖豆藤中发挥抗炎活性的化学成分。方法 香花崖豆藤 70% 乙醇冷浸提取物经聚酰胺柱梯度洗脱, 得水洗脱部位(A)、40% 乙醇洗脱部位(B)、70% 乙醇洗脱部位(C)、100% 乙醇洗脱部位(D)。采用凝胶色谱、半制备高效液相色谱对抗炎有效部位进行化学成分分离。以脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞为炎性模型, 试验分为 A 组、B 组、C 组、D 组(50 μg/mL 极性洗脱部位 A, B, C, D), 阳性对照组(0.5 μmol/L 地塞米松), 模型组(10 μg/mL LPS), 空白组(常规培养基)。采用 Griess 法测定一氧化氮(NO)释放量; 采用免疫印迹(Western blot)法测定诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶 2(COX-2)的蛋白表达水平, 筛选抗炎有效部位。结果 香花崖豆藤 40% 乙醇洗脱部位经分离得到 2 个单体化合物, 分别鉴定为 5,7-二羟基-2',3',4'-三甲氧基异黄酮(化合物 1)和 5,7,4'-三羟基异黄酮(化合物 2)。与模型组比较, B 组、C 组、D 组的 NO 释放量均显著减少($P < 0.001$), B 组的 iNOS 蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论 香花崖豆藤 40% 乙醇洗脱部位具有较好的抗炎活性, 可通过抑制 iNOS 蛋白的表达而发挥抗炎作用。

关键词: 香花崖豆藤; 化学成分; 抗炎活性; 诱导型一氧化氮合酶; 环氧合酶 2

Chemical Constituents of *Millettia Dielsiana* Harms Based on Anti-Inflammatory Effects

YAO Caiping¹, QIU Fei^{1,2}, GUO Yanhua¹, LI Yanhua¹, LIU Jianfeng^{1,2}

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan, China 418000; 2. Hunan University of Medicine · Hunan Key Laboratory of Dong Medicine Research, Huaihua, Hunan, China 418000)

Abstract: Objective To isolate the chemical constituents from *Millettia dielsiana* Harms. **Methods** 70% ethanol cold-soaked extract of *Millettia dielsiana* Harms was eluted by polyamide column gradient, and water-eluting part (A), 40% ethanol-eluting part (B), 70% ethanol-eluting part (C), and 100% ethanol-eluting part (D) were obtained. Gel chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography were used to separate the chemical constituents of the anti-inflammatory effective parts of *Millettia dielsiana* Harms. RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) were used as the inflammatory models. The experiment was divided into groups A, B, C, and D (50 μg/mL polar-eluting parts A, B, C, D), positive control group (0.5 μmol/L dexamethasone), model group (10 μg/mL LPS), and blank group (conventional culture medium). Griess method was used to determine the release of nitric oxide (NO). Western blot was used to determine the expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein for screening out the anti-inflammatory effective parts. **Results** Two monomeric compounds were isolated from *Millettia dielsiana* Harms by the 40% ethanol-eluting part, and they were identified as 5,7-dihydroxy-2',3',4'-trimethoxyisoflavanone (compound 1) and 5,7,4'-trihydroxyisoflavanone (compound 2), respectively. Compared with that in the model group, the release of NO in groups B, C, and D significantly reduced ($P < 0.001$), and the expression level of iNOS protein in group B significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** The constitutions isolated from *Millettia dielsiana* Harms by the 40% ethanol-eluting part has good anti-inflammatory activity, and can play an anti-inflammatory role by inhibiting the expression of iNOS protein.

Key words: *Millettia dielsiana* Harms; chemical constituents; anti-inflammatory activity; inducible nitric oxide synthase; cyclooxygenase-2

*基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目[20A352]; 湖南省中医药科研计划项目[2021044]。

第一作者: 姚采平, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)1574797695@qq.com。

Δ通信作者: 刘建锋, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)517796553@qq.com。

- fications to Withdrawm FDA Draft Stratified Sampling Guidance[J]. J Pharm Innov, 2015, 10: 76-83.
- [10] BERGUM J, PARKS T, PRESCOTT J, et al. Assessment of Blend and content Uniformity. Technical Discussion of Sampling Plans and Application of ASTM E2709 / E2810 [J]. J Pharm Innov, 2015, 10: 84-97.
- [11] 聂忠莉, 萧茂玲, 王晓玲, 等. 阿哌沙班片的制备工艺与质量
- 标准研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(24): 2848-2853.
- [12] MARTIN A, STEWART R. Safety and efficacy of apixaban in the treatment of atrial fibrillation[J]. Clinmed Insights Cardiol, 2012, 6(1): 103-109.
- [13] 百时美施贵宝公司, 美国辉瑞有限公司. 阿哌沙班制剂: CN102770126A[P]. 2012-11-07.
- (收稿日期: 2023-05-04; 修回日期: 2023-10-20)

香花崖豆藤 *Millettia dielsiana* Harms 是豆科崖豆藤属植物的藤茎^[1], 味苦、微甘, 性温, 归肝、心、肾经, 具有行气、解热、止血、驱风除湿、通经活络功效, 常用于治疗偏头痛。研究表明, 香花崖豆藤具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、抗炎、促进造血等药理学作用^[2], 但未进行相关抗炎活性的化学成分研究。目前, 分离出的化学成分主要有黄酮类、萜类、生物碱类、甾类、甾类、有机酸或酯类、多糖等^[3-12]。本研究中评价了香花崖豆藤 70% 乙醇提取物经聚酰胺柱初分后, 不同极性部位对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型一氧化氮(NO)释放量及环氧合酶 2(COX-2)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白表达水平的影响, 并以抗炎活性为导向对有效部位进行系统的化学成分分离, 为阐明香花崖豆藤的抗炎机制提供理论依据。

1 仪器、试药与细胞

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪, WondaSil C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 均购于日本 Shimadzu 公司; Aston SC5 制备柱[(280 mm × 10 mm, 5 μm), 湖南德米特仪器有限公司]; AV-600 spectrometer 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司); Ti2-U 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司); 5702R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); FORMA STERI-CYCLE i160 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司); iMark 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Bio-Rad 1658029 型号蛋白电泳仪(伯乐生命医学产品 <上海> 有限公司); 5200Multi 型化学发光荧光成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 试药

香崖豆藤于 2017 年 11 月采自湖南省怀化市, 经湖南医药学院邓伟峰教授鉴定为正品; 聚酰胺(国药集团化学试剂有限公司, 批号分别为 20151228 <30~60 目>, 20180720 <100~200 目>); Sephadex LH-20 凝胶色谱(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号为 C2012176); 胰蛋白酶(批号为 B121103), 胎牛血清(批号为 M430984), 高糖 DMEM 培养基(批号为 K211005), L-谷酰胺(货号为 S210JV), 5 × SDS 蛋白上样缓冲液(批号为 20221214), 均购于上海源培生物科技股份有限公司; LPS(西格玛奥德里齐 <上海> 贸易有限公司, 批号为 0000189647); NO 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号为 S0023); CCK-8 试剂(批号为 20220928), 青-链霉素溶液(货号为 C100C5), RIPA 裂解液(批号为 20221107), 14-250KD 蛋白预染 marker(货号为 P9006), 超敏增强型化学发光(ECL)试剂盒(批号为 20221115), 均购于苏州新赛美生物科技有限公司; 兔抗人抗体 iNOS 一抗(货号为 Ab178954),

COX-2 抗体(货号为 Ab17988), 均购于英国 Abcam 公司; 羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(货号为 S0001), 羊抗小鼠 HRP 标记二抗(货号为 S0002), 均购于 Affinity Biosciences; 地塞米松(北京索莱宝科技有限公司, 货号为 ID0170); Greiss 试剂盒(北京百瑞极生物科技有限公司, 货号为 BN16025)。

1.3 细胞

RAW264.7 细胞系来自湖南医药学院生物医学研究中心细胞库。

2 方法与结果

2.1 提取与分离

取香花崖豆藤 4.5 kg, 加 10 倍量 70% 乙醇, 室温冷浸 15 d, 冷浸液进一步浓缩得浸膏 506 g, 浸膏用适量甲醇溶解, 经聚酰胺(30~60 目)搅拌挥干溶剂, 并装于 100~200 目聚酰胺柱, 用水、40% 乙醇、70% 乙醇、100% 乙醇洗脱, 回收溶剂后分别得水洗脱部位 96 g, 40% 乙醇洗脱部位 123 g, 70% 乙醇洗脱部位 189 g, 100% 乙醇洗脱部位 67 g。

根据抗炎活性筛选结果, 对香花崖豆藤 40% 乙醇洗脱部位进行系统分离, 依次经 Sephadex LH-20 凝胶色谱及半制备高效液相色谱分离纯化, 分别得化合物 1(21 mg) 和化合物 2(35 mg)。

2.2 化合物结构鉴定

化合物 1: 白色针状结晶, 易溶于甲醇, 不溶于水。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.23 (1H, s, 5-OH), 10.81 (1H, s, 7-OH), 6.89 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6'), 5.91 (2H, s, 6-H, 8-H), 4.46 (2H, m, H-2), 4.31 (1H, m, H-3), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.74 (3H, s, 2'-OCH₃), 3.73 (3H, s, 3'-OCH₃)。 ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 70.5 (C-2), 46.9 (C-3), 197.5 (C-4), 167.0 (C-5), 96.5 (C-6), 164.4 (C-7), 95.3 (C-8), 163.5 (C-9), 153.8 (C-10), 121.2 (C-1'), 153.8 (C-2'), 151.9 (C-3'), 142.2 (C-4'), 108.3 (C-5'), 125.2 (C-6'), 61.0 (2'-OCH₃), 60.7 (3'-OCH₃), 56.4 (4'-OCH₃)。以上波谱数据与文献[13]的报道结果基本一致, 经鉴定, 化合物 1 为 5, 7-dihydroxy-2', 3', 4'-trimethoxyisoflavanone (C₁₈H₁₈O₇)。

化合物 2: 淡黄色针状结晶, 易溶于甲醇, 不溶于水。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.96 (1H, s, 5-OH), 10.88 (1H, s, 7-OH), 9.58 (1H, s, 4'-OH), 8.33 (1H, s, H-2), 7.39 (2H, dd, *J* = 6.0 Hz, H-3', H-5'), 6.82 (2H, dd, *J* = 6.0 Hz, H-2', H-6'), 6.39 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-6), 6.22 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-8)。 ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 154.5 (C-2), 122.7 (C-3), 180.7 (C-4), 162.5 (C-5), 99.4 (C-

6), 164.8(C-7), 94.1(C-8), 158.1(C-9), 104.9(C-10), 121.7(C-1'), 115.5(C-2', C-6'), 130.6(C-3', C-5'), 157.9(C-4')。以上波谱数据与文献[14]的报道结果基本一致,经鉴定,化合物2为5,7,4'-trihydroxyisoflavanone($C_{15}H_{10}O_5$)。

2.3 抗炎活性评价

2.3.1 细胞培养

RAW264.7细胞在含10%低内毒素胎牛血清、青霉素G(10 000 U/mL)、链霉素(10 μ g/mL)、L-谷酰胺(29.2 mg/mL)的DMEM培养基中,置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中传代培养,收集对数生长期细胞。

2.3.2 CCK-8法检测细胞活力

取对数生长期的RAW264.7细胞,用培养基制成 2×10^6 个/mL的单细胞悬液,接种于96孔板,置培养箱中培养24 h。试验分为水洗脱部位组(A组)、40%乙醇洗脱部位组(B组)、70%乙醇洗脱部位组(C组)、100%乙醇洗脱部位组(D组)、阳性对照组和空白组,每组各6个复孔。吸弃各孔培养液,A组、B组、C组、D组每孔加质量浓度为50 μ g/mL的供试药液,阳性对照组加浓度为0.5 μ mol/L的地塞米松,空白组加培养基。置培养箱中继续培养24 h后,上述各组各孔分别加10 μ L质量浓度为5 mg/mL的CCK-8溶液,30 min后利用酶标仪于570 nm波长处测定吸光度值,计算细胞存活率,试验重复3次。结果在50 μ g/mL质量浓度作用24 h后,A组、B组、C组、D组细胞存活率均在80%以上,但组间无显著差异($P > 0.05$)。详见图1。

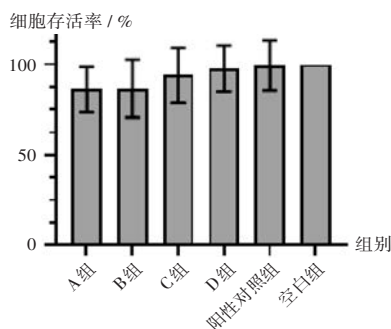


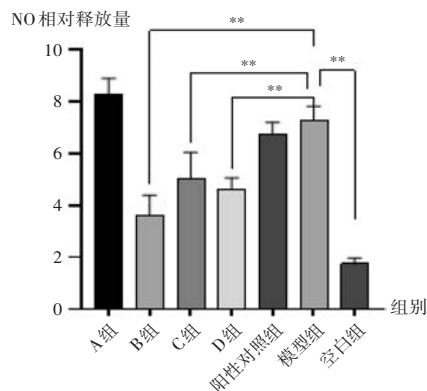
图1 不同极性部位作用下RAW264.7细胞的存活率

Fig. 1 Viability of RAW264.7 cells under different polar parts

2.3.3 Griess法检测细胞产生NO含量

试验分为A组、B组、C组、D组、阳性对照组、模型组和空白组。取对数生长期的RAW264.7细胞,用培养基制成 2×10^6 个/mL的单细胞悬液,接种于96孔板,置培养箱中培养24 h。24 h后吸弃上清液,A组、B组、C组、D组分别加入待测物溶液(质量浓度为50 μ g/mL),阳性对照组加入地塞米松(浓度为0.5 μ mol/L),模型组和空白组加入等量完全培养液。2 h后,A组、B组、C组、D组、阳性对照组加入LPS(质量浓度为10 μ g/mL)继续培养,模型组加入LPS(质量浓度为10 μ g/mL)刺

激24 h,空白组加入等量完全培养液。24 h后,取50 μ L培养基上清液,加入Greiss1试剂,室温避光振摇10 min,再加入Greiss2试剂,室温避光振摇10 min,以完全培养基加显色剂作为空白对照,利用酶标仪于540 nm波长处测定各孔的吸光度值。结果与模型组比较,A组NO释放量增多,B组、C组、D组NO释放量均显著减少($P < 0.001$),且B组减少最多,故以40%乙醇洗脱部位进行系统分离。详见图2。



注:与模型组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。图3同。

图2 不同极性部位对RAW264.7细胞产生NO的影响

Note: Compared with those in the model group,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ (for Fig. 2 - 3).

Fig. 2 Effect of different polar parts on NO production in RAW264.7 cells

2.3.4 免疫印迹(Western blot)法检测iNOS和COX-2蛋白表达

取对数生长期的RAW264.7细胞,用培养基制成 5×10^5 个/mL的单细胞悬液,接种于12孔板,置培养箱中培养24 h。试验分组及给药同2.3.3项下。24 h后,提取细胞总蛋白,采用Western blot法检测iNOS和COX-2的蛋白表达水平。结果与模型组比较,A组、B组、D组COX-2蛋白表达下调;B组iNOS蛋白表达显著下调($P < 0.01$),故以40%乙醇洗脱部位进行系统分离。详见图3。

3 讨论

本研究中以LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞炎症模型评价了侗药香花崖豆藤不同极性部位对COX-2和iNOS蛋白表达水平的影响。结果表明,其40%乙醇洗脱部位能显著降低NO的释放量,并能选择性地抑制iNOS蛋白的表达,提示40%乙醇洗脱部位可能为香花崖豆藤发挥抗炎活性的有效部位。采用凝胶柱色谱及半制备高效液相色谱对其进行系统分离,得到2个化合物,并经NMR结合文献波谱数据比对确认为5,7-dihydroxy-2',3',4'-trimethoxyisoflavanone(化合物1)和5,7,4'-trihydroxyisoflavanone(化合物2),其中化合物1为首次从香花崖豆藤中分离得到。

文献[13]报道,化合物1对LPS诱导RAW264.7细

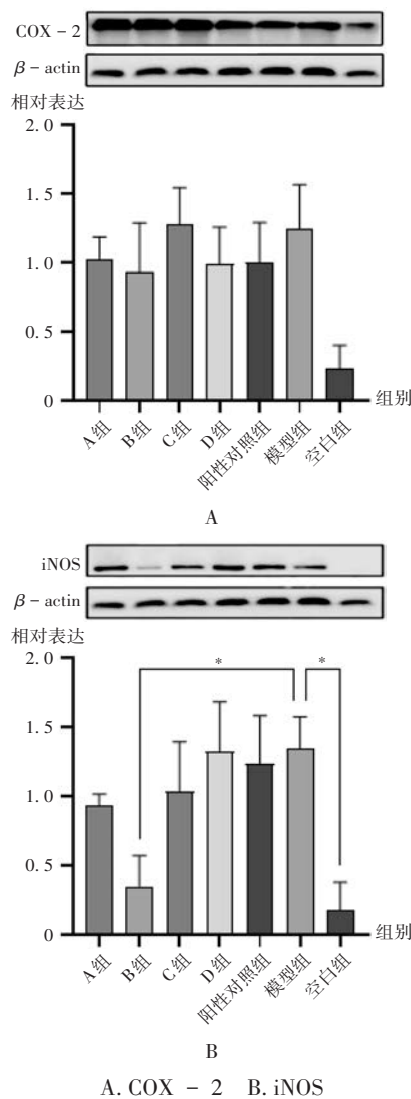


图3 不同极性部位对RAW264.7细胞COX-2和iNOS蛋白表达水平的影响
A. COX-2 B. iNOS

Fig. 3 Effect of different polar parts on the expression of COX-2 and iNOS protein in RAW264.7 cells

胞的NO生成具有较强的抑制活性,半数有效抑制浓度(IC_{50})低于50 $\mu\text{mol/L}$,而化合物2对LPS诱导RAW264.7细胞的COX-2表达有显著抑制作用^[15]。提示化合物1和化合物2可能为香花崖豆藤发挥抗炎活性的药效物质基础,并可能通过调控COX-2和iNOS蛋白的表达而发挥抗炎作用。

香花崖豆藤为治疗偏头痛的侗族常用民间药材,应用历史悠久。研究表明,偏头痛患者NO水平增加引起的氧化应激性损伤是引起偏头痛的重要原因^[16-18]。抑制一氧化氮合酶(NOS)对偏头痛的急性或预防性治疗提供了可行途径。本研究中初步探讨了香花崖豆藤40%乙醇洗脱部位通过选择性抑制iNOS蛋白的表达,以发挥治疗偏头痛作用的部分药效物质基础,可为其治疗偏头痛的药理作用研究及后续开发提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 40.
- [2] 王雯丽, 邢亚超, 汤迎湛, 等. 崖豆藤属植物化学成分和药理活性的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 633-641.
- [3] 王瑞, 耿培武. 香花崖豆藤化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 1990, 12(9): 2-3.
- [4] 宋建兴, 胡旺云, 罗士德. 香花崖豆藤化学成分的研究[J]. 西南林学院学报, 1992, 12(1): 40-43.
- [5] 巩婷. 白花油麻藤和香花崖豆藤化学成分及生物活性研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.
- [6] 巩婷, 王洪庆, 陈若芸. 香花崖豆藤中异黄酮类化合物的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2138-2140.
- [7] 冯洁, 成军, 梁鸿, 等. 崖豆藤属植物化学成分及生物活性[J]. 现代药物与临床, 2007, 22(5): 185-191.
- [8] SHUN G, JIE A, CHUAN FW, et al. Effect of amino acid residue and oligosaccharide chain chemical modifications on spectral and hemagglutinating activity of *Millettia dielsiana* Harms. ex Diels. Lectin [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2010, 37(1): 47-54.
- [9] 何可群, 李相兴. 香花崖豆藤总三萜酸的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2014(5): 1070-1071.
- [10] WANG Z, CAI T, HE X. Characterization, sulfated modification and bioactivity of a novel polysaccharide from *Millettia dielsiana* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 108-115.
- [11] GONG T, WANG XD, CHEN RY, et al. Novel benzil and isoflavone derivatives from *Millettia dielsiana* [J]. Planta Medica, 2009, 75(3): 236-242.
- [12] GONG T, ZHANG T, WANG DX, et al. Two new isoflavone glycosides from the vine stem of *Millettia dielsiana* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2013, 16(2): 181-186.
- [13] 孟慧, 夏欣怡, 马国需, 等. 降香檀心材化学成分及抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 800-806.
- [14] 王凤芹, 蒋可志, 李祖光. 银杏叶提取物中染料木素的分离纯化及结构鉴定[J]. 色谱, 2007, 25(4): 509-513.
- [15] 徐艺荣. 九种黄酮类化合物对LPS诱导的RAW264.7细胞PGE₂、COX-2表达的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- [16] OLESEN J. The role of nitric oxide(NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2008, 120(2): 157-171.
- [17] GRUBER HJ, BERNECKER C, LECHNER A, et al. Increased nitric oxide stress is associated with migraine [J]. Cephalalgia, 2010, 30(4): 486-492.
- [18] UZAR E, EVLI YAOGLU O, TOP RAK G, et al. Increased asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in patients with migraine [J]. The Journal of Headache and Pain, 2011, 12: 239-243.

(收稿日期: 2023-06-16; 修回日期: 2023-11-01)