

白菊木树皮和枝叶甲醇提取物及化学成分的体外抗炎活性研究

刘 兰, 刘燕芳, 李宝才, 张 敏^①

(昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

Study on *in vitro* anti-inflammatory activities of methanol extracts from barks, branches and leaves and chemical constituent of *Gochnatia decora* LIU Lan, LIU Yanfang, LI Baocai, ZHANG Mi^① (Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(4): 101-103

Abstract: Effects of methanol extracts from barks, branches and leaves and 15 β -hydroxy-*ent*-16-kaur-19-oic- β -D-glucopyranosyl ester (Gd-1) of *Gochnatia decora* (Kurz) A. L. Cabrera on viability of mouse RAW264.7 macrophages and production of NO, reactive oxygen species (ROS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in mouse RAW264.7 macrophages were studied by using the model of lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse RAW264.7 macrophages. The results show that 0.39, 1.56, 6.25, 25 and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ methanol extracts from barks, branches and leaves, and 0.39, 1.56, 6.25, 25 and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gd-1 of *G. decora* have no obvious effect on growth of mouse RAW264.7 macrophages; compared with the model control group, methanol extracts from barks, branches and leaves and Gd-1 of *G. decora* can inhibit NO and ROS production, and high dosage group has significant effects on TNF- α and IL-6. It is suggested that methanol extracts from barks, branches and leaves and Gd-1 of *G. decora* all have some anti-inflammatory activities, and Gd-1 can serve as a target product for further isolation, purification, and activity study.

关键词: 白菊木; 抗炎活性; 活性氧(ROS); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 白细胞介素-6(IL-6)

Key words: *Gochnatia decora* (Kurz) A. L. Cabrera; anti-inflammatory activity; reactive oxygen species (ROS); tumor necrosis factor- α (TNF- α); interleukin-6 (IL-6)

中图分类号: Q946; R282.71.05; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)04-0101-03
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.04.11

白菊木属(*Gochnatia* H. B. K.)为菊科(Compositae)中2个木本植物属之一,其中绝大部分种分布于美洲的温带和热带,仅2种分布于中国和东南亚的热带^[1-4],白菊木[*G. decora* (Kurz) A. L. Cabrera]为其一,在中国主要分布于云南南部。白菊木树皮可用于治疗肺热喘咳和枪伤刀伤^[5],但至今鲜有其化学成分和药理活性方面的研究。作者所在课题组采用多种柱色谱分离手段首次从白菊木树皮甲醇提取物的石油醚和乙酸乙酯萃取物中分离获得30余个化合物,主要为对映-贝壳杉烷型二萜类成分,并采用脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞RAW264.7(以下简称RAW264.7细胞)产生一氧化氮(NO)模型对分离得到的化学成分进行活性测试,结果表明:白菊木树皮甲醇提取物及部分单体化合物的NO抑制活性良好^[6-7]。在此基础上,本文研究了白菊木树皮和枝叶甲醇提取物及其中1个单体化合物15 β -hydroxy-*ent*-16-kaur-19-oic- β -D-glucopyranosyl ester(Gd-1)对一些炎症因子的影响,以期对白菊木的后续成分研究和活性评价提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试RAW264.7细胞购自中国科学院昆明动物研究所。供试白菊木的树皮和枝叶分别于2013年7月和2014年7月采自云南省西双版纳傣族自治州勐腊县勐仑镇银厂村石灰山,经中国科学院西双版纳热带植物园周仕顺助理研究员鉴定。样品自然风干。凭证标本保存于昆明理工大学生命科学与技术学院天然产物制药实验室。

分别将200 g白菊木树皮和枝叶的干样剪碎,每次用600 mL甲醇冷浸提取7 d,共3次。加压回收甲醇提取液后分别得到树皮和枝叶甲醇提取物浸膏。Gd-1的分离及鉴定参考文献[6]。树皮和枝叶甲醇提取物浸膏及Gd-1先用二甲基亚砜(DMSO)配置成一定浓度的母液,然后用DMEM高糖液体培养基稀释,备用。

收稿日期: 2018-05-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31500287)

作者简介: 刘 兰(1991—),女,四川眉山人,硕士研究生,主要从事天然产物抗炎活性方面的研究。

^①通信作者 E-mail: midylee@126.com

主要试剂:DMEM 高糖液体培养基(美国 HyClone 公司);NO 硝酸还原酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);胎牛血清(美国 Gibco 公司);LPS、噻唑蓝(MTT)、Griess 试剂盒和地塞米松(DXM)(美国 Sigma 公司);TNF- α 和 IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(美国 BD 公司);总 NOS 抑制剂 L-N^G-monomethyl arginine citrate(L-NMMA,上海碧云天生物技术有限公司);PBS(pH 7.2 至 pH 7.4,上海索莱宝生物科技有限公司);其他试剂均为分析纯。

主要仪器:MK3 型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan 公司);Thermo Forma 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);BHC-1300 II B2 型生物安全柜(苏州金净净化设备公司);CKX1 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞培养于含体积分数 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM 高糖液体培养基中,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期细胞接种于新的培养瓶继续培养,根据细胞状态以细胞悬液体积比 1:3~1:6 进行传代。

1.2.2 MTT 实验 以每孔 2×10^4 个 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,每孔体系 100 μ L,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,分别加入树皮和枝叶甲醇提取物(终质量浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹)以及 Gd-1(终浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ mol $\cdot$ L⁻¹),以未加树皮和枝叶甲醇提取物以及 Gd-1 的孔为空白孔;处理 24 h 后,显微镜下观察细胞形态;然后每孔加入 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ MTT 20 μ L,孵育 4 h,吸弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 15 min,于波长 490 nm 处测定吸光度值。根据公式“细胞存活率=(检测孔吸光度值/空白孔吸光度值) $\times$ 100%”^[8]计算细胞存活率。

1.2.3 细胞内 NO 检测 采用 Griess 法^[9]检测,以每孔 1×10^5 个 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,每孔体系 100 μ L,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养,设置正常对照组、模型对照组、处理(树皮或枝叶甲醇提取物+LPS)组和阳性药(L-NMMA+LPS)组,每组 3 个复孔;24 h 后,分别加入树皮和枝叶甲醇提取物(终质量浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹)以及 L-NMMA(终浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ mol $\cdot$ L⁻¹);孵育 1 h 后,各组加入 LPS 至终质量浓度为 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹,正常对照组不做任何处理;孵育 24 h,收集上清液,按照 Griess 试剂盒说明进行检测,于波长 540 nm 处测定吸光度值。用标准品溶液的吸光度值和浓度绘制标准曲线,得到回归方程,计算得到各待测样品中 NO 的浓度。

1.2.4 RAW264.7 细胞产生活性氧(ROS)检测 参考 DCFH-DA 荧光探针法^[10],取对数生长期的 RAW264.7 细胞,以每孔 1×10^5 个细胞接种于不透光的棕色 96 孔板,每孔体系 100 μ L,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,分别加入树皮和枝叶甲醇提取物(终质量浓度 0.625、2.5、10 μ g $\cdot$ mL⁻¹)、Gd-1(终浓度 0.625、2.5、10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)以及

阳性药 DXM(终质量浓度 2.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹);孵育 1 h 后,各组加入 LPS 至终质量浓度为 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹,模型对照组只加入 LPS 至终质量浓度为 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹,正常对照组不做任何处理;继续培养 24 h 后,吸弃孔中液体,每孔加入 100 μ L PBS,清洗 3 次,每孔加入终浓度 20 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的 DCFH-DA 荧光探针 100 μ L;继续培养 30 min 后,去除含有 DCFH-DA 荧光探针的培养基,每孔加入 100 μ L PBS,清洗 3 次,去除残留 DCFH-DA 荧光探针,最后每孔加入 100 μ L PBS;使用 MK3 型酶标仪(激发波长 485 nm,发射波长 530 nm)测定检测孔(处理组或模型对照组)和空白孔(正常对照组)吸光度值,根据公式“ROS 相对含量=检测孔吸光度值/空白孔吸光度值 $\times$ 100%”计算 ROS 相对含量。

1.2.5 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)含量检测 参考 ELISA 法^[11],取对数生长期 RAW264.7 细胞,以每孔 4×10^5 个细胞接种于 24 孔板中,每孔体系 1 mL,置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,分别加入树皮和枝叶甲醇提取物(终质量浓度 0.625、2.5 和 10 μ g $\cdot$ mL⁻¹)、Gd-1(终浓度 0.625、2.5 和 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)以及阳性药 DXM(终浓度 2.5 μ mol $\cdot$ L⁻¹);孵育 1 h 后,各组加入 LPS 至终质量浓度为 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹,正常对照组不做任何处理,继续孵育 12 h,收集上清液,分别按 TNF- α 和 IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒说明书进行检测。

1.3 数据处理和分析

采用 SPSS 21.0 统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),应用 LSD(L) test 检测方差齐性,应用 Tamhane's T2(M) test 检测方差不齐性。

2 结果和分析

2.1 对 RAW264.7 细胞的活力及其产生 NO 的影响

白菊木树皮和枝叶甲醇提取物(终质量浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹)以及 Gd-1(终浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ mol $\cdot$ L⁻¹)与 RAW264.7 细胞共同孵育后细胞存活率较空白组未明显降低,且空白组和处理组的细胞形态均良好,无明显差异,未观察到白菊木树皮和枝叶甲醇提取物以及 Gd-1 在供试浓度下的细胞毒性。

终质量浓度 0.39、1.56、6.25、25 和 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 白菊木树皮和枝叶甲醇提取物与 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹ LPS 共培养时,对 RAW264.7 细胞毒性的半抑制浓度大于 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹,对细胞生长无明显影响,Gd-1 对细胞毒性的半抑制浓度为 88.346 μ mol $\cdot$ L⁻¹,对细胞生长的影响较弱。据此确定安全给药浓度范围分别为:白菊木树皮和枝叶甲醇提取物的质量浓度低于 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹,Gd-1 浓度低于 50 μ mol $\cdot$ L⁻¹。

结果显示:所有处理组均抑制 NO 产生,白菊木树皮和枝叶甲醇提取物抑制 NO 产生的半抑制浓度分别为 21.11 和 27.15 μ g $\cdot$ mL⁻¹。

2.2 对 RAW264.7 细胞产生 ROS、TNF- α 和 IL-6 的影响

结果(表1)显示:模型对照组的 ROS 相对含量显著($P<0.001$)升高。与模型对照组相比,各处理组的 ROS 相对含量均有所降低,且 2.5 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白菊木树皮和枝叶甲醇提取物处理组显著($P<0.01$)降低。

与正常对照组相比,模型对照组的 TNF- α 和 IL-6 含量显著($P<0.001$)升高。与模型对照组相比,各处理组的 TNF- α 和 IL-6 含量均有一定程度降低,且高剂量组较显著。

表1 白菊木树皮和枝叶甲醇提取物及 Gd-1 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生活性氧(ROS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的影响($\bar{X} \pm \text{SD}, n=3$)¹⁾

Table 1 Effects of methanol extracts from barks, branches and leaves and Gd-1 of *Gochnatia decora* (Kurz) A. L. Cabrera on production of reactive oxygen species (ROS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) in mouse RAW264.7 macrophages ($\bar{X} \pm \text{SD}, n=3$)¹⁾

处理组 Treatment group	ROS 相对含量/% ROS relative content	TNF- α 含量/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) TNF- α content	IL-6 含量/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) IL-6 content
NCK	100.00 $\pm$ 5.41	272.86 $\pm$ 5.10	1.32 $\pm$ 0.65
MCK	226.67 $\pm$ 28.32 ###	1 163.21 $\pm$ 25.84 ###	588.50 $\pm$ 11.34 ###
2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DXM	68.16 $\pm$ 4.49 ***	797.22 $\pm$ 26.81 ***	184.72 $\pm$ 7.06 ***
0.625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SP	181.16 $\pm$ 35.74	1 140.43 $\pm$ 35.38	545.00 $\pm$ 23.98 *
2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SP	82.61 $\pm$ 3.28 ***	1 110.84 $\pm$ 13.75	530.18 $\pm$ 4.86 **
10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ SP	70.58 $\pm$ 12.23 ***	925.46 $\pm$ 14.74 **	412.95 $\pm$ 10.73 ***
0.625 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZY	185.82 $\pm$ 21.08	1 089.81 $\pm$ 5.77	544.84 $\pm$ 29.86
2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZY	89.33 $\pm$ 6.26 **	1 086.27 $\pm$ 29.42	454.16 $\pm$ 4.74 ***
10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ZY	90.91 $\pm$ 4.32 **	965.06 $\pm$ 41.10 **	356.26 $\pm$ 8.84 ***
0.625 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gd-1	107.25 $\pm$ 11.86 **	1 140.49 $\pm$ 88.63	519.75 $\pm$ 26.52 *
2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gd-1	93.26 $\pm$ 10.42 **	1 135.91 $\pm$ 27.29	520.71 $\pm$ 18.96 *
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gd-1	94.55 $\pm$ 12.16 **	989.75 $\pm$ 51.91 **	411.89 $\pm$ 16.38 ***

¹⁾NCK: 正常对照 The normal control; MCK: 模型对照 The model control; DXM: 地塞米松 Dexamethasone; SP: 白菊木树皮甲醇提取物 Methanol extracts from barks of *Gochnatia decora* (Kurz) A. L. Cabrera; ZY: 白菊木枝叶甲醇提取物 Methanol extracts from branches and leaves of *G. decora*. #: 与 NCK 组相比 Compared with NCK group; *: 与 MCK 组相比 Compared with MCK group. ***, ###: $P<0.001$; **, #: $P<0.01$; *, #: $P<0.05$.

3 讨论和结论

LPS 诱导 RAW264.7 细胞模型广泛用于筛选潜在抗炎活性天然产物。该细胞受到 LPS 刺激后,能够释放 ROS、TNF- α 、IL-6 及 NO 等炎症递质,从而启动抵抗炎症反应的功能^[12-13]。NO 是体内一种重要的生理递质和化学信使,其过量产生会引起炎症反应和机体损伤,因此,能否抑制 NO 产生常作为评估待测药物是否具有潜在的抗炎活性并值得进一步研究的重要指标。白菊木树皮和枝叶甲醇提取物均可一定程度上抑制 NO 产生,而 Gd-1 抑制 NO 产生的效果更好,其抑制 NO 产生的半抑制浓度为 2.58 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。而对 TNF- α 、IL-6 及 NO 而言,白菊木树皮和枝叶甲醇提取物以及 Gd-1 的影响差异较小,且均为高剂量组效果最佳。总体上看,白菊

木树皮和枝叶提取物以及 Gd-1 均具有潜在的抗炎活性。Gd-1 为对映-贝壳杉烷型二萜类成分,该类成分可作为目标产物从白菊木树皮与枝叶中进行分离纯化及活性研究。

参考文献:

- [1] BOHLMANN F, JAKUPOVIC J, ROBINSON H, et al. Five germacranolides from *Gochnatia discoidea* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20: 109-112.
- [2] BOHLMANN F, ZDERO C, SCHMEDA-HIRSCHMANN G, et al. Dimeric guaianolides and other constituents from *Gochnatia* species [J]. *Phytochemistry*, 1986, 25: 1175-1178.
- [3] BOHLMANN F, AHMED M, JAKUPOVIC J, et al. Dimeric sesquiterpene lactones and kolavane derivatives from *Gochnatia paniculata* [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22: 191-195.
- [4] BOHLMANN F, ZDERO C. Neue germacranolide und andere inhaltsstoffe aus vertretern der subtribus Gochnatiinae [J]. *Phytochemistry*, 1979, 18: 95-98.
- [5] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志: 第十三卷[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 624.
- [6] ZHANG M, ZHAO C, DAI W, et al. Anti-inflammatory entkaurenoic acids and their glycosides from *Gochnatia decora* [J]. *Phytochemistry*, 2017, 137: 174-181.
- [7] 赵晨星, 戴伟峰, 李宝才, 等. 白菊木树皮的化学成分及其抗炎活性研究[J]. *热带亚热带植物学报*, 2017, 25(4): 394-398.
- [8] 张东芳, 肖 鹏, 韩晨露, 等. 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯抑制脂多糖诱导的巨噬细胞促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 基因表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(4): 402-408.
- [9] KIM Y-S, AHN C-B, JE J-Y. Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF- κ B and MAPK pathways[J]. *Food Chemistry*, 2016, 202: 9-14.
- [10] LEE A Y, LEE S, KIM H Y, et al. Anti-inflammatory effects of luteolin and luteoloside from *Taraxacum coreanum* in RAW264.7 macrophage cells[J]. *Applied Biological Chemistry*, 2016, 59: 1-8.
- [11] PAN Y, SHEN B, GAO Q, et al. Caspase-1 inhibition attenuates activation of BV2 microglia induced by LPS-treated RAW264.7 macrophages[J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2016, 30: 225-233.
- [12] MANIMTIM W M, HASDAY J D, HESTER L, et al. *Ureaplasma urealyticum* modulates endotoxin-induced cytokine release by human monocytes derived from preterm and term newborns and adults[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69: 3906-3915.
- [13] LU S H, HSU W L, CHEN T H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway involves the anti-inflammatory activity of magnolol in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated mouse RAW 264.7 macrophages [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 29: 770-778.

(责任编辑: 张明霞)