

· 论著 ·

## 豆豉姜活性成分 9,9'-O-二-(E)-阿魏酰基-内消旋-5,5'-二甲氧基开环异落叶松树脂酚 (LCA) 抗炎作用研究

余璐瑶<sup>1</sup>, 贾丹<sup>2</sup>, 沈慧<sup>2</sup>, 孙晓蕾<sup>2</sup>, 秦路平<sup>1,2</sup>, 韩婷<sup>2</sup> (1. 上海师范大学生命科学院, 上海 200234; 2. 海军军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 对傣药豆豉姜活性成分 LCA 在动物及细胞水平上的抗炎作用进行评价。方法 采用耳肿胀和棉球肉芽肿模型进行 LCA 抗炎的体内药效学评价。采用脂多糖(LPS)诱导的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7), 通过检测其一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的分泌量以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)蛋白的表达水平, 以评价 LCA 的体外抗炎活性。结果 在小鼠耳肿胀的实验中, LCA 组的耳肿胀度明显低于模型组, 且高浓度组对小鼠耳肿胀的抑制率高于阳性药组; 在大鼠棉球肉芽肿实验中, LCA 高剂量组显著减轻了棉球肉芽肿的湿重与干重。此外, LCA 显著减少 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO、TNF- $\alpha$  的分泌, 降低 iNOS、COX-2 蛋白的表达。结论 LCA 具有显著的体内外抗炎作用, 值得进一步深入研究。

**[关键词]** LCA; 抗炎; 耳肿胀; 肉芽肿; RAW264.7 细胞

**[中图分类号]** R364.5; R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0216-05

**[DOI]** 10.12206/j.issn.1006-0111.201912159

## Anti-inflammatory study on 9,9'-O-di(E)-feruloyl-meso-5,5'-dimethoxysecosolariciresinol (LCA), an active ingredient in *Litsea cubeba* (Lour.) Pers

YU Luyao<sup>1</sup>, JIA Dan<sup>2</sup>, SHEN Hui<sup>2</sup>, SUN Xiaolei<sup>2</sup>, QIN Luping<sup>1,2</sup>, HAN Ting<sup>2</sup> (1. School of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the anti-inflammatory effects of LCA, which is the active component from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. **Methods** Pharmacodynamic evaluations of ear swelling and cotton ball granuloma models were used in animal experiments. *In vitro* experiment, lipopolysaccharide (LPS) stimulated monocyte macrophage RAW264.7 cells were used to evaluate the anti-inflammatory activity of LCA by detecting the secretions of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), the expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein. **Results** In ear swelling experiment, the extent of ear swelling was significantly lower in the LCA treated group than the model group. The inhibition rate was greater in the high LCA concentration group than the positive drug group. In addition, LCA reduced the weight of cotton ball granuloma markedly. At the cell level, LCA significantly inhibited the secretions of NO, TNF- $\alpha$  and reduced the expressions of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Conclusion** LCA has significant anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo*. The further studies are warranted for the development of anti-inflammatory drugs.

**[Key words]** LCA; anti-inflammatory; ear swelling; granuloma of cotton ball; RAW264.7 cell

炎症泛指机体受到创伤或病原体感染等刺激后所产生的生理反应, 主要表现为疼痛、红肿、发热等<sup>[1]</sup>。通常情况下, 机体受到创伤等刺激后, 所产

生的炎症反应是一种生理性保护反应, 有益于机体损伤的修复<sup>[2-3]</sup>, 但当机体内的抗炎系统过于活跃时, 会引起自身免疫系统紊乱, 对机体正常的细胞及组织进行攻击, 如系统性红斑狼疮及类风湿性关节炎等免疫疾病<sup>[4]</sup>。目前, 临床上常用的抗炎药物主要分为甾体类抗炎药(SAIDs)、非甾体类抗炎药(NSAIDs)及免疫调节药, 但这几类药物多具有副作用<sup>[5-7]</sup>, 因此, 新型抗炎药物的研发具有极高的科研前景和社会价值。豆豉姜是樟科植物山鸡椒

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81573696)

**[作者简介]** 余璐瑶, 硕士研究生, 研究方向: 植物药理学, Email: y777ly@163.com

**[通讯作者]** 秦路平, 博士, 教授, 研究方向: 中药资源与品质评价, Email: qinsmmu@126.com; 韩婷, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性物质及品质调控, Email: than927@163.com

*Litsea cubeba*(Lour.)Pers 的根及根茎,被傣医学及中医作为广泛的民间方剂,多用于祛风散寒、息肝风、消肿、治风湿痹痛的治疗。前期课题组提取分离得到新型的二苄基丁烷型木脂素 9,9'-O-二-(E)-阿魏酰基-内消旋-5,5'-二甲氧基开环异落叶松树脂酚(LCA)化学结构如图 1 所示,并发现其具有改善类弗氏完全佐剂大鼠关节炎模型中炎症症状的疗效<sup>[8]</sup>,因此,课题组推测 LCA 是豆豉姜中具有抗炎活性的天然化合物,故采用小鼠耳肿胀和棉球肉芽肿模型及 RAW264.7 细胞实验,对其抗炎作用进行研究。

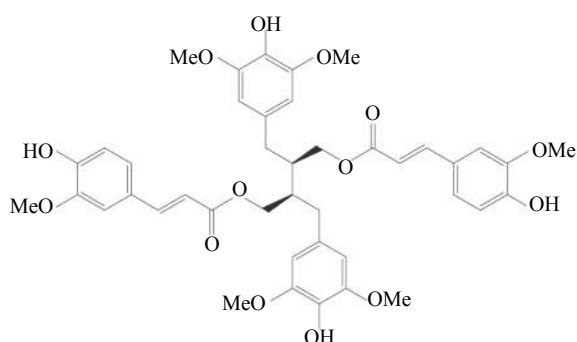


图 1 LCA 化学结构

## 1 材料

### 1.1 实验动物

二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验模型:5 周龄 SPF 级雄性昆明小鼠,体重:(20±2)g;大鼠棉球肉芽肿实验:4 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重:(120±10)g。动物由海军军医大学实验动物中心提供,并饲养于海军军医大学药学院动物房,室温控制为 24℃,12 h 光照+12 h 黑暗,水及食物充足供应。RAW264.7(海军军医大学药学院生药学教研室)。

### 1.2 试剂与器材

LCA(海军军医大学药学院有机化学教研室合成及鉴定);吡哆美辛(海军军医大学附属长海医院);二甲苯、水合氯醛、羧甲基纤维素钠 CMC-Na、对氨基苯磺酸、磷酸、N- $\alpha$ -萘乙二胺(中国医药集团);棉球(中国朝阳公司);ELISA 试剂盒(中国联科公司);iNOS、COX-2、GAPDH 抗体及二抗(CST, USA)。分析天平(MettlerToledo, USA);CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱(Sanyo, Japan);ELx 800 酶标仪(Fisher, US);凝胶成像仪(Tanon-5200 multi, 中国上海)。

## 2 方法

### 2.1 动物实验

#### 2.1.1 动物模型建立及处理

小鼠耳廓肿胀模型建立:将 60 只 5 周龄健康雄性昆明鼠安置于动物实验中心适应 1 周,按体重随机分为 4 组,各 10 只,组别标记为:模型组;LCA 组(20、40 mg/kg);吡哆美辛组(8 mg/kg)。给药以灌胃的形式每日一次,模型组则予相同体积的 0.5% CMC-Na 连续 3 d 灌胃,在末次给药 1 h 后,将二甲苯以 0.05 ml/只剂量均匀涂布于小鼠右耳廓的双面,左耳不做处理,连续刺激 45 min 后处死小鼠,用打孔器分别于左右耳廓同一位置打下圆形耳片<sup>[9]</sup>,称重,用于计算比较耳肿胀程度及耳肿胀抑制率(%)。

大鼠棉球肉芽肿模型建立:将 20 只 4 周龄健康雄性 SD 大鼠安置于动物实验中心适应 1 周,按体重随机分为 4 组:模型组;LCA 组(20、40 mg/kg);吡哆美辛组(5 mg/kg)。用水合氯醛对大鼠进行麻醉,于左右两边腋窝下切开一小口,将 2 个灭菌棉球(20 mg)分别植入小鼠左右腋窝,缝合后第 2 天给药。且以灌胃的形式每日一次,模型组则予相同体积的 0.5% CMC-Na 连续 7 d<sup>[10-11]</sup>。第 8 天处死大鼠,将腋下棉球及附着的肉芽组织剥离,称重,用于计算比较干湿重及抑制率。

#### 2.1.2 动物指标测定

耳肿胀度=右耳片重量-左耳片重量

耳肿胀抑制率(%)=(模型组平均耳肿胀度-给药组平均耳肿胀度)/模型组平均耳肿胀度×100%

平均棉球肉芽肿重量=(右侧棉球肉芽肿重量+左侧棉球肉芽肿重量)/2

棉球肉芽肿抑制率(%)=(模型组平均棉球肉芽肿重量-给药组平均棉球肉芽肿重量)/模型组平均棉球肉芽肿重量×100%

### 2.2 RAW264.7 细胞实验

#### 2.2.1 细胞培养

RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞)用 DMEM 高糖完全培养基(10% DMEM+90% FBS+1% 双抗)培养于 37℃ 恒温细胞培养箱中。

#### 2.2.2 细胞增殖检测

将 RAW264.7 细胞以 1×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板,完全培养基培养 24 h,弃上清液,给予不同浓度的 LCA 培养液(3、1.5、0.75 和 0.375  $\mu$ mol/L),并设置空白对照组,每组 5 个复孔,培养 24 h,采用

MTT 法测定 LCA 对小鼠单核巨噬细胞的增殖作用。

### 2.2.3 炎症因子水平测定

将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 24 孔板, 24 h 后弃上清液, 脂多糖(LPS)组和 LCA 组中加入 1 ml 含 2  $\mu\text{g/ml}$  LPS 的完全培养基, 刺激 2 h, 于空白组和 LPS 组中加入 1 ml 完全培养基, 给药组加入各浓度 LCA(1.5、0.75 和 0.375  $\mu\text{mol/L}$ )的完全培养基, 作用 24 h 后, 测 NO 含量: 取 100  $\mu\text{l}$  上清液与 100  $\mu\text{l}$  Griess 试剂(A 液: 对氨基苯磺酸 0.1 g, 加 5% 磷酸 10ml; B 液: N- $\alpha$ -萘乙二胺 0.01 g, 加 10ml 蒸馏水, 等体积混合)混合避光显色 30 min, 用酶标仪于 540 nm 处测各孔吸光度(A)值; 测 TNF- $\alpha$ : 取上清液, 根据 ELISA 试剂盒说明书步骤测量上清液中炎症因子 TNF- $\alpha$  的含量。

### 2.2.4 炎症相关蛋白表达检测

将 RAW264.7 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 处理组(LPS 组、LCA 组)中加入 1ml 含 2  $\mu\text{g/ml}$  LPS 的完全培养基, 刺激 2 h, 于空白组和 LPS 组中加入 1 ml 完全培养基, 给药组加入各浓度 LCA(1.5、0.75 和 0.375  $\mu\text{mol/L}$ )的完全培养基, 作用 24 h 后, 细胞裂解提取蛋白并定量, 蛋白变性后 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 转膜, 封闭, 依次用 iNOS, COX-2 及 GAPDH 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 用洗膜液(TBST)清洗 3 次后, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤后, 用化学发光试剂盒于凝胶成像仪中显影拍片。

### 2.3 统计分析

本实验指标均为定量数据, 数据以( $\bar{x} \pm s$ )形式表示。多组定量数据的比较, 采用单因素方差分析, 方差分析检验后两两比较采用 Dunnett's *t*-test 法。采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行统计学分析。结果以  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 LCA 对小鼠耳肿胀的影响

如表 1 所示, 与模型组对比, 吡罗美辛(8 mg/kg)可抑制由二甲苯造成的小鼠耳廓肿胀( $P < 0.05$ ), 抑制率为 29.80%; LCA(40 mg/kg)组显著抑制小鼠耳廓肿胀度( $P < 0.01$ ), 抑制率为 37.41%, 而 LCA(20 mg/kg)组对小鼠耳廓肿胀度的抑制无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3.2 LCA 对大鼠棉球肉芽肿的影响

如图 2, 模型组大鼠棉球肉芽肿体积较大且颜色鲜红, 吡罗美辛组的棉球肉芽肿体积小且颜色浅, 而 LCA 组的棉球肉芽肿在色泽和大小上均有

表 1 LCA 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肿胀度(m/mg)	抑制率(%)
模型组	3.02 $\pm$ 0.63	—
LCA组(20 mg/kg)	2.52 $\pm$ 0.29	16.56
LCA组(40 mg/kg)	1.89 $\pm$ 0.54**	37.41
吡罗美辛组(8 mg/kg)	2.12 $\pm$ 0.61*	29.80

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与模型组比较。

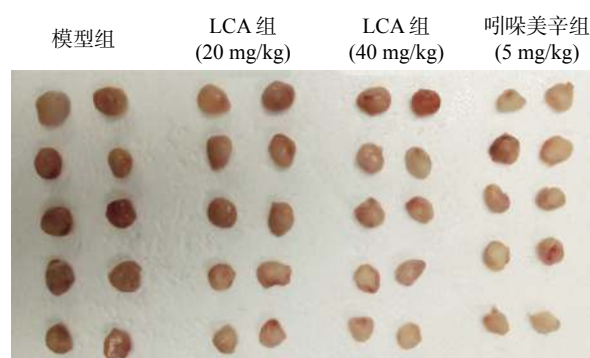


图 2 各组大鼠棉球肉芽肿对比

别于模型组。数据分析显示(表 2、表 3), 与模型组相比, 阳性药组吡罗美辛明显抑制大鼠的棉球肉芽肿( $P < 0.001$ ), 且干重、湿重的抑制率分别为 48.73% 和 44.19%; LCA 高剂量组也可明显减少棉球肉芽肿的干重及湿重( $P < 0.01$ ), 且抑制率达到 23.89% 和 29.90%。

表 2 LCA 对大鼠棉球肉芽肿湿重的影响 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	棉球肉芽肿湿重(m/mg)	抑制率(%)
模型组	300.1 $\pm$ 53.26	—
LCA组(20 mg/kg)	256.0 $\pm$ 36.36	14.70
LCA组(40 mg/kg)	228.4 $\pm$ 51.16***	23.89
吡罗美辛组(5 mg/kg)	167.5 $\pm$ 15.74***	44.19

\*\*\* $P < 0.001$ , 与模型组比较。

表 3 LCA 对大鼠棉球肉芽肿干重的影响 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	棉球肉芽肿干重(m/mg)	抑制率(%)
模型组	48.1 $\pm$ 10.05	—
LCA组(20 mg/kg)	42.32 $\pm$ 10.19	12.05
LCA组(40 mg/kg)	33.73 $\pm$ 7.10**	29.90
吡罗美辛组(5 mg/kg)	24.67 $\pm$ 7.39***	48.73

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与模型组比较。

### 3.3 LCA 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症因子分泌的影响

如图 3 所示, LCA 的安全剂量不高于 3  $\mu\text{mol/ml}$ ,

且在 0.75 和 1.5  $\mu\text{mol/ml}$  浓度下显著降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞分泌的 NO 和 TNF- $\alpha$  浓度, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4 LCA 对炎症相关的蛋白表达的影响

如图 4 所示, LCA 在 1.5  $\mu\text{mol/ml}$  浓度下显著抑制了炎症相关蛋白 iNOS、COX-2 蛋白的表达 ( $P < 0.001$ )。

## 4 讨论

据报道<sup>[12]</sup>, 许多从中药中提取的活性天然化合物可以达到抗炎效果, 包括黄芩苷、青藤碱和大黄素等, 多为甘草次酸酰胺类衍生物。LCA 不同于这些抗炎药物, 它具有新颖的二苄基丁烷型结构, 本研究从体内、体外两方面对它进行较为系统的抗炎药效评价。

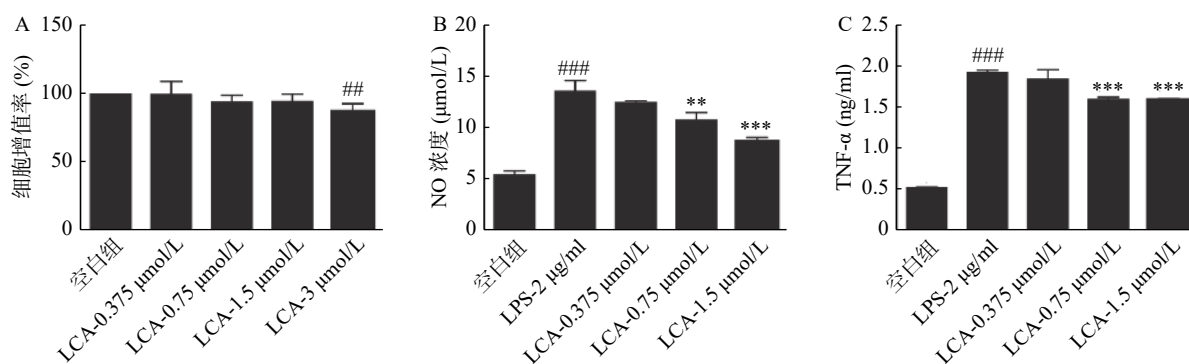


图3 LCA 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞增殖、NO 和 TNF- $\alpha$  分泌量的影响 ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A. 细胞增殖率; B. NO 浓度; C. TNF- $\alpha$  浓度; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 与 LPS 组比较; #  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , 与空白组比较。

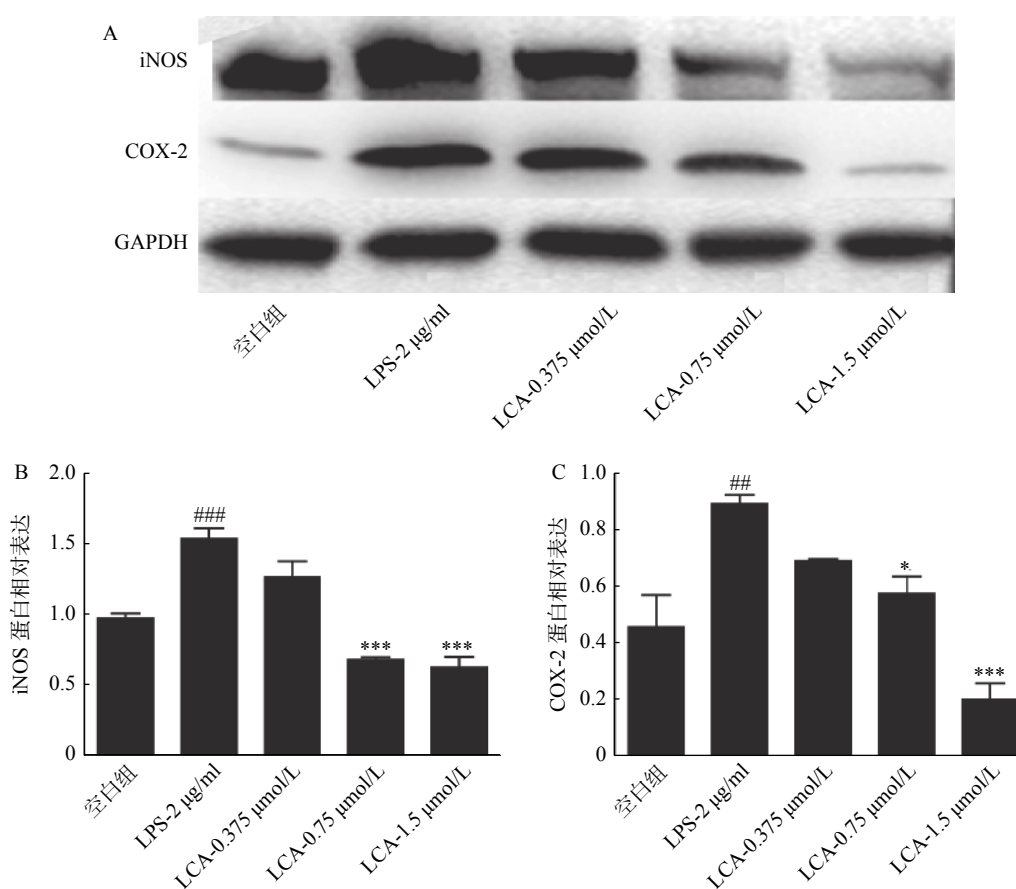


图4 LCA 对炎症相关蛋白表达的作用 ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

A. Western blotting 检测 iNOS、COX-2 蛋白的表达水平; B. iNOS/GAPDH 比值; COX-2/GAPDH 比值; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 与 LPS 组比较; #  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ , 与空白组比较。

二甲苯诱导的小鼠耳肿胀模型是评价药物体内抗炎活性的急性炎症模型之一<sup>[13]</sup>,本实验模型组中二甲苯作为致炎剂刺激小鼠耳廓皮肤,促进血管舒张、增加血管通透性致使炎性物质渗出,耳片重量明显高于未经处理的耳片重量,LCA组能明显改善小鼠耳部的炎性渗出及肿胀程度,且高浓度组的抑制率高于阳性药吡哆美辛组(由于吡哆美辛高浓度有强烈的胃肠道反应,故根据临床用药剂量换算出实验动物的剂量,并参考相关文献确定用量<sup>[13]</sup>,即8 mg/kg),表明LCA对急性炎症有显著作用。在慢性炎症期,由于巨噬细胞和纤维母细胞等增生而形成肉芽组织,棉球肉芽肿实验可模拟炎症病理过程中炎性细胞浸润和肉芽组织的增生<sup>[14]</sup>。结果显示LCA降低棉球肉芽肿的湿重与干重,表明LCA可以控制慢性炎症过程中炎性渗出物的转移,同时抑制棉球外侧小血管和结缔组织的增生,证明LCA可以减少慢性炎症进程中肉芽组织的形成。结合上述两个动物实验可知LCA对急性炎症以及慢性炎症都具有一定的抑制作用。

炎症的普遍特征是病灶区域有大量炎症细胞的浸润,并释放大量炎症因子和介质,如IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、前列腺素(PG)、组织胺和NO等。其中,NO可激活NF- $\kappa$ B信号通路,诱导促炎因子(IL-6、TNF- $\alpha$ 等)的分泌,引起机体组织损伤以及血管扩张;TNF- $\alpha$ 可刺激细胞免疫中T细胞产生炎症因子,进而诱导炎症的加重和扩大。iNOS可介导产生的大量NO并参与炎症反应;COX-2介导产生的前列腺素与慢性炎症的发展和持续有关,致使白细胞聚集和浸润,引起微血管内皮细胞的损伤。在本研究中,LPS刺激后,RAW264.7细胞分泌的NO和TNF- $\alpha$ 含量,以及细胞内iNOS和COX-2蛋白水平明显增高,LCA浓度为1.5  $\mu$ mol/ml时显著抑制激活状态下NO和TNF- $\alpha$ 炎症介质的分泌,同时下调iNOS及COX-2蛋白的表达水平。由此进一步证实LCA具有抗炎作用。然而,LCA抗炎的具体作用机制尚不明确,有待今后进行更深层次的研究探讨。

#### 【参考文献】

[1] ANTONISAMY P, DURAI PANDIYAN V, IGNACIMUTHU

S, et al. Anti-diarrhoeal activity of friedelin isolated from *Azizma tetracantha* lam. in wistar rats[J]. *Sijbs*, 2015, 1(1): 34.

[2] CHEN M, FU Q T, SONG X, et al. Preparation of resveratrol dry suspension and its immunomodulatory and anti-inflammatory activity in mice[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 8-15.

[3] ANTONISAMY P, AGASTIAN P, KANG C W, et al. Anti-inflammatory activity of Rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L. and possible underlying mechanisms[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(1): 96-104.

[4] 翁丽丽, 邱金文, 宋启印. 榆耳发酵液醇沉物抗炎作用[J]. *吉林中医药*, 2007, 27(10): 56.

[5] MEIRA N A, KLEIN L C Jr, ROCHA L W, et al. Anti-inflammatory and anti-hypersensitive effects of the crude extract, fractions and triterpenes obtained from *Chrysophyllum cainito* leaves in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(2): 975-983.

[6] RATHI M A, MEENAKSHI P, GOPALAKRISHNAN V K. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Alysicarpus vaginalis* against nitrobenzene-induced hepatic damage in rats[J]. *Sijbs*, 2015, 1(2): 60.

[7] WANG J W, CHEN S S, ZHANG Y M, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity based on polymorphism of cedrol in mice[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 68: 13-18.

[8] LIN B, ZHANG H, ZHAO X X, et al. Inhibitory effects of the root extract of *Litsea cubeba* (lour.) pers. on adjuvant arthritis in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 327-334.

[9] BOOTS A W, WILMS L C, SWENNEN E L, et al. *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers[J]. *Nutrition*, 2008, 24(7-8): 703-710.

[10] 刘玉明, 刘慧民, 蒋定文, 等. 复方苦参酊剂对炎症小鼠和大鼠的抗炎作用研究[J]. *中国药师*, 2019, 22(11): 2108-2110.

[11] LI Z P, HU J F, SUN M N, et al. Anti-inflammatory effect of IMMLG5521, a coumarin derivative, on Sephadex-induced lung inflammation in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(2): 145-149.

[12] 张志锋, 吴允娇, 陈丽, 等. 藏药材白花刺参总皂苷的抗炎作用及机制[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(5): 49-52.

[13] LIU X B, YANG B X, ZHANG L, et al. An *in vivo* and *in vitro* assessment of the anti-inflammatory, antinociceptive, and immunomodulatory activities of *Clematis terniflora* DC. extract, participation of aurantiamide acetate[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 287-294.

[收稿日期] 2019-12-30 [修回日期] 2020-01-11

[本文编辑] 李睿曼