

香附醇提物抗神经炎症活性及化学成分分析

张康丽¹, 李凌宇², 于 猛², 张宏武², 贾红梅^{2*}, 邹忠梅^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301600

2. 北京协和医学院 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 香附抗神经炎症活性部位确定及成分分析。方法 基于脂多糖 (LPS) 诱导 BV2 细胞炎症模型, Griess 法检测培养上清液中 NO 水平评价香附 95% 乙醇提取物 (CR-95E, 6.25、12.50、25.00、50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、50% 乙醇提取物 (CR-50E, 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、水提取物 (CR-W, 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的抗炎活性; ELISA 试剂盒法考察活性部位对模型细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 含量的影响; 采用 ELISA 法检测上清液中犬尿酸途径激活关键酶吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO) 的含量变化; 采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 技术对 CR-95E 进行化学成分定性分析, 与 NIST MS search 2.0 质谱检索数据库比对鉴定化合物结构。结果 与模型组比较, CR-95E 在 6.25~50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时可显著抑制 LPS 诱导 BV2 细胞释放 NO ($P<0.001$), 而 CR-50E 和 CR-W 无效, 说明 CR-95E 具有确切的抗神经炎作用。与模型组比较, CR-95E 可显著降低细胞上清液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 显著降低 IDO 的过量表达 ($P<0.001$)。GC-MS 分析, 从 CR-95E 中共鉴定了 34 个化合物, 主要为萜烯类和酮类成分, 相对质量分数由高到低依次为异长叶烯酮 (19.47%)、石竹烯氧化物 (4.98%)、喇叭烯氧化物-(II) (4.01%)、 α -古芸烯 (3.66%) 等。结论 香附抗神经炎症活性部位为 CR-95E, 主要含有萜烯类和酮类成分等低极性成分, 可通过抑制细胞 NO 和炎症因子的释放, 抑制 IDO 过表达发挥抗神经炎症作用。

关键词: 香附; 抗神经炎症; 炎症因子; 一氧化氮 (NO); 吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (IDO); 萜烯类; 酮类

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 08-1549-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.012

Anti-neuroinflammatory activity and chemical constituents of ethanol extract from *Cyperi rhizome*

ZHANG Kangli¹, LI Lingyu², YU Meng², ZHANG Hongwu², JIA Hongmei², ZOU Zhongmei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To evaluate the anti-neuroinflammatory activity and analyze its components of *Cyperi rhizome*. **Methods** 95% ethanol extract (CR-95E), 50% ethanol extract (CR-50E) and water extract (CR-W) of *Cyperi rhizome* were sequential prepared by heating reflux method. The anti-inflammatory activities were screened based on lipopolysaccharide (LPS) induced BV2 cells inflammation model. The content of nitric oxide (NO) and inflammatory factors (IL-1 β , TNF- α , IL-6) in supernatant of model cells were detected after the obtained active site treatment. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), the key enzyme of the kynurenine pathway rate-limiting enzyme, was detected by ELISA. The chemical constituents of the obtained active site was analyzed by GC-MS, and further identified through searching by NIST MS search 2.0. **Results** CR-95E significantly decreased the content of NO ($P < 0.001$) in LPS-induced BV2 cells at 6.25—50.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, but CR-50E and CR-W did no, which suggested that the CR-95E had a definite anti-neuroinflammation effect. Moreover, CR-95E significantly decreased the contents of NO and intracellular inflammatory factors such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α . In addition, CR-95E could significantly reduce the overexpression of IDO,

收稿日期: 2022-02-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973461); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2021-I2M-1-028)

第一作者: 张康丽 (1995—), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为中药及复方药效物质基础和作用机制研究。Tel: (010) 57833302

E-mail: m15735012385_1@163.com

*共同通信作者: 邹忠梅 Tel: (010) 57833290 E-mail: zmzou@implad.ac.cn

贾红梅 Tel: (010) 57833302 E-mail: hmjia@implad.ac.cn

suggesting that CR-95E might play a role in cell protection and regulating neuronal dysfunction through inhibiting the accumulation of toxic metabolites caused by abnormal activation of kynurenine pathway. As a result, 34 compounds were identified by NIST MS Search 2.0, including isolongifolene (19.47%), caryophyllene oxide (4.98%), ledene oxide-(II) (4.01%), α -paleobassene (3.66%).

Conclusion The anti-neuroinflammatory components of *Cyperus rotundus* concentrate on low polarity components mainly including terpenes and ketones. It plays an anti-neuroinflammation role through inhibiting the release of NO and inflammatory factor by regulating the NF- κ B inflammatory signaling pathway and kynurenine pathway. Our study provided scientific data for the discovery and mechanism of anti-neuroinflammatory components of *Cyperus rotundus*.

Key words: *Cyperus rotundus* L.; anti-neuroinflammation; inflammatory factor; nitric oxide (NO); 2, 3-dioxygenase (IDO); terpenes; ketones

香附为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎,味辛、微苦、性平,入肝、脾、三焦三经,具有行气解郁、调经止痛功效,常用于肝郁气滞、胸胁、脘腹胀痛、胸脘痞闷等症状^[1]。香附化学成分多样,主要包括挥发油、黄酮、三萜、生物碱、甾醇类、糖等成分,具有抗炎、抑菌、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、抗抑郁以及降糖等生物活性^[2-4]。关于抗炎作用,有研究报道香附甲醇提取物^[5]可通过抑制 NO 和超氧化物的产生对抗脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 RAW 264.7 细胞炎症。香附中的化学成分 α -香附酮、异香附醇和 fulgidic acid^[6-8]在 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症中可抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)和信号转导及转录激活蛋白 3(STAT3)通路。黄炳旭等^[9]采用 LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型评价和研究了香附主要成分 α -香附酮的抗神经炎症作用,发现其可通过激活蛋白激酶 B(Akt)/转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶 1(HO-1)和抑制 NF- κ B 通路来抑制模型细胞中细胞因子的产生,发挥抗神经炎症作用。已有研究显示香附具有确切的抗炎作用,但其抗炎特别是抗神经炎症相关药效成分和作用机制尚不清楚。

神经炎症指中枢神经系统中神经胶质细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞)受到刺激产生的一系列免疫反应,主要表现为神经胶质细胞的活化、增生,外周炎症细胞浸润及相关炎性细胞因子的表达^[10-11]。其中小胶质细胞是一种广泛分布在中枢神经系统内固有的免疫细胞^[12],占整个中枢神经系统胶质细胞数量的 5%~20%。BV2 小胶质细胞是 Blasi 等^[13]在 1990 年对 C57BL/6 小鼠原代小胶质细胞感染重组逆转录病毒而获得永生可传代的细胞系,适当刺激下分泌炎症因子,其具有小胶质细胞的形态和生理生化功能以及无限生长的特点。LPS 是革兰阴性细菌的突出细胞壁成分,是 Toll 样受体 4(Toll like receptors 4, TLR4)激动剂^[14]。利用 LPS 刺激 BV2 小胶质细胞诱导多种炎性细胞

因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)等的分泌,引起类似神经炎症反应,被广泛地应用于神经炎症的研究中^[15]。

本课题组前期研究发现香附可通过抑制皮质酮诱发的 PC12 细胞钙超载,降低神经细胞损伤,发挥神经细胞保护作用^[16]。而神经细胞损伤涉及到一系列的病理生理改变,其中炎症的发生发展是其主要因素。因此,本研究以 LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型,评价和筛选香附不同极性部位的抗神经炎症作用,并通过气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析活性部位的化学成分,探索其抗神经炎症的成分与机制。

1 材料

1.1 药材与主要试剂

香附购自河北百草康神药业有限公司,经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所邹忠梅研究员鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎,样品保存于国家中药化合物库(批号 SCI-NCL002773-1);实验用蒸馏水;正己烷(分析级,欧普森色谱级公司,批号 20211030);无水乙醇(分析级,天津市北联精细化学品开发有限公司,批号 20210520);DMEM 培养基(Gibco 公司,批号 8120138);胎牛血清(FBS, Gibco 公司,批号 10270-106);细胞消化液 Accutase(Invitrogen 公司,批号 E134052);二甲基亚砜(DMSO,美国 Fisher 公司,批号 D2650);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司,批号 M5655);磷酸缓冲盐溶液(PBS, Gibco 公司,批号 15140-122);Griess 试剂和 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、吲哚胺 2,3-双加氧酶(IDO)试剂盒(北京奇松生物科技有限公司,批号 QS42775、QS42899、QS42868、QS49119)。

1.2 主要仪器

CKX41 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Tecan Infinite F50 酶标仪(瑞士 R&D 公司);MCO-

153AC型CO₂恒温细胞培养箱(日本SANYO公司); ZHJH-C1115B型超净工作台(上海智成分析仪器制造有限公司); QL-901微型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 不同量程移液枪(美国Eppendorf公司); MSA125P-100-DU电子天平(德国Sartorius公司); ES-201P型电子天平(长沙湘平科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 香附不同极性部位的提取制备

取香附药材2 kg粉碎,过10号筛,加入10倍量95%乙醇,加热回流提取3次,每次1 h,合并滤液,减压浓缩,干燥得到香附95%醇提取物(CR-95E)153.2 g,提取率7.66%。药渣挥干溶剂至无醇味,加入10倍量50%乙醇,加热回流提取3次每次1 h,合并滤液,减压浓缩,干燥得到香附50%乙醇提取物(CR-50E)407.8 g,提取率20.60%。药渣挥干溶剂至无醇味,加入10倍量蒸馏水,加热回流提取3次每次1 h,合并滤液,减压浓缩,干燥得到香附水提取物(CR-W)408.4 g,提取率20.40%。

2.2 细胞培养

BV2小胶质细胞,购于北京北纳创联生物技术研究院,在含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 μg·mL⁻¹链霉素的DMEM培养液中,37℃、5% CO₂饱和湿度培养,每隔2 d传代,待细胞处于对数生长期时用于实验。

2.3 药物溶液制备

精密称取适量CR-95E、CR-50E、CR-W,采用DMSO分别将其溶解配制成质量浓度为100 mg·mL⁻¹的CR-95E、CR-50E、CR-W母液,并放置于-20℃冰箱内,密封避光保存备用。采用DMEM培养液稀释配制成所需浓度,不同浓度组药物所含的DMSO最终质量分数均为0.1%,药物现配现用。

2.4 MTT法检测细胞活力

2.4.1 MTT法检测香附不同极性部位对BV2细胞活力的影响 将处于对数生长期的BV2细胞,用胰蛋白酶消化调整细胞密度为每孔 5.0×10^4 ^[17],接种于96孔板中,设置调零溶剂组、对照组(0.1% DMSO)、CR-95E(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组、CR-50E(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组、CR-W(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组,每组设5个复孔。置37℃、含5.0% CO₂培养箱培养24 h,加入20 μL的MTT试剂(5.0 mg·mL⁻¹),继续培养4 h后,1 000 r·min⁻¹离心6 min,弃上清;每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min,

采用酶标仪于492 nm处测量各孔吸光度(A)值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{调零溶剂}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零溶剂}})$$

2.4.2 MTT法检测香附不同极性部位对LPS刺激后BV2细胞活力的影响 BV2细胞接种同“2.4.1”项,设置对照组、模型组、CR-95E(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组、CR-50E(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组、CR-W(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组,每组设5个复孔。同时加入药物和终质量浓度为0.5 μg·mL⁻¹的LPS刺激24 h。MTT法检测细胞活力的变化。

2.5 Griess法检测NO水平

依据文献报道^[18-19],分别比较了3个细胞接种密度:每孔 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 个,进行Griess法检测A值变化,最终确定细胞接种密度为每孔 2×10^5 个。BV2小胶质细胞接种到96孔板中,设置对照组、模型组、CR-95E(6.25、12.50、25.00、50.00 μg·mL⁻¹)组、CR-50E(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组、CR-W(6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μg·mL⁻¹)组,每组设5个复孔。同时加入药物和终质量浓度为0.5 μg·mL⁻¹的LPS刺激24 h。按Griess法测定上清液中NO水平,首先将Griess Reagent I和Reagent II恢复室温,在96孔板中按每孔50 μL加入培养基上清,再依次加入Griess Reagent I和Reagent II试剂各50 μL,采用酶标仪于550 nm处测定A值,根据所测结果绘制标准曲线,计算NO浓度变化。

2.6 ELISA法检测细胞上清液中炎症因子水平

细胞接种及干预操作同“2.5”项,设置对照组、模型组、CR-95E(6.25、12.50、25.00、50.00 μg·mL⁻¹)组,每组设5个复孔。收集各组细胞培养上清液,用ELISA试剂盒检测IL-1β、IL-6、TNF-α水平,具体操作步骤按ELISA试剂盒说明书进行。

2.7 ELISA法检测IDO含量

细胞接种、分组及干预同“2.6”项。收集各组细胞培养上清液,用ELISA试剂盒检测IDO浓度,具体操作步骤按ELISA试剂盒说明书进行。

2.8 GC-MS分析

2.8.1 样品处理 精密称取适量CR-95E溶于正己烷溶液中,配制质量浓度为5 mg·mL⁻¹的样品溶液,0.22 μm滤膜滤过,待测。

2.8.2 GC-MS检测参数 色谱柱为TG-5MS 30 m×0.32 mm×0.25 m弹性石英毛细管柱;初始温度为60℃,进样口的温度设置为270℃,以8℃·min⁻¹升至110℃,保持相同的速度上升至140℃,再以

2 °C·min⁻¹的速度上升至160 °C,最后以20 °C·min⁻¹上升至250 °C,保持2.5 min,高纯氦气为载气,分流比为20:1;体积流量设置为30 mL·min⁻¹,进样量2 μL。离子源为EI源;离子源温度250 °C;电子能量70 eV;溶剂延迟3.5 min;扫描范围 m/z 35~500,质谱检索标准库:NIST MS search 2.0。

2.9 数理统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 5软件处理,组间两两比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 香附不同极性部位对BV2细胞活力的影响

如图1所示,CR-50E和CR-W给药质量浓度为6.25~100.00 μg·mL⁻¹时,对BV2细胞活力不发挥抑制作用。而CR-95E给药质量浓度为100 μg·mL⁻¹时可显著降低BV2细胞活力($P < 0.001$),但不超过50 μg·mL⁻¹时对BV2细胞活力无影响。

进一步考察了香附不同极性部位对LPS处理后的BV2细胞活力的影响,结果如图2所示,CR-50E和CR-W给药质量浓度为6.25~100 μg·mL⁻¹时,对BV2细胞活力无影响。而CR-95E在质量浓度为6.25~50 μg·mL⁻¹时对BV2细胞活力无影响。

因此,后续实验中CR-95E的质量浓度设置在6.25~50 μg·mL⁻¹,CR-50E和CR-W的质量浓度设置在6.25~100 μg·mL⁻¹。

3.2 香附不同极性部位抗炎活性评价

NO合成释放增加是炎症反应的一项重要指标^[20],本研究以香附不同极性部位对NO含量的影响评价其抗炎活性。结果如图3所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中NO含量显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,仅6.25~50.00 μg·mL⁻¹的CR-95E可显著降低模型细胞上清液中NO含量($P < 0.001$),提示CR-95E为香附抗神经炎症活性部位。

3.3 CR-95E对炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α的影响

结果如图4所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中IL-1β、IL-6、TNF-α水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,CR-95E可显著降低LPS诱导BV2细胞中IL-1β、IL-6、TNF-α释放($P < 0.05$ 、0.01、0.001),且具有剂量相关性。

3.4 CR-95E对IDO表达量的影响

当中枢神经系统处于炎症、感染或创伤等病理

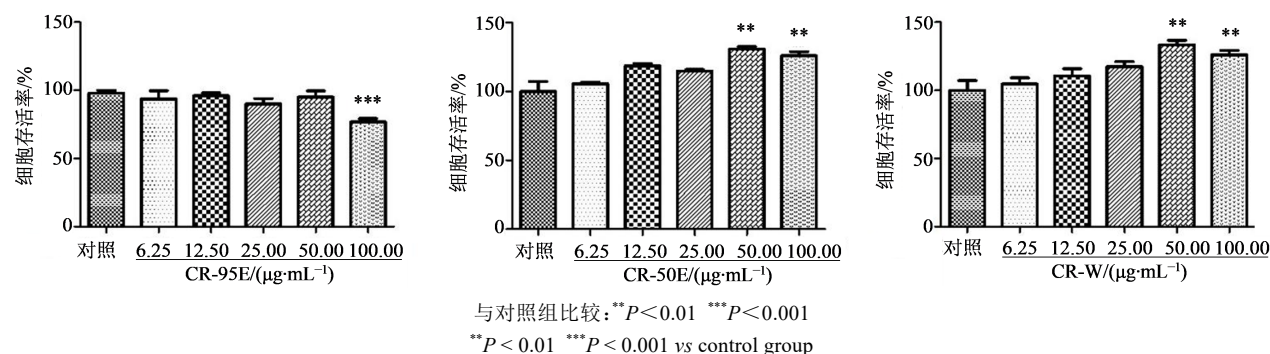


图1 CR-95E、CR-50E、CR-W对BV2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 Effects of CR-95E, CR-50E, and CR-W on cell viability in BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

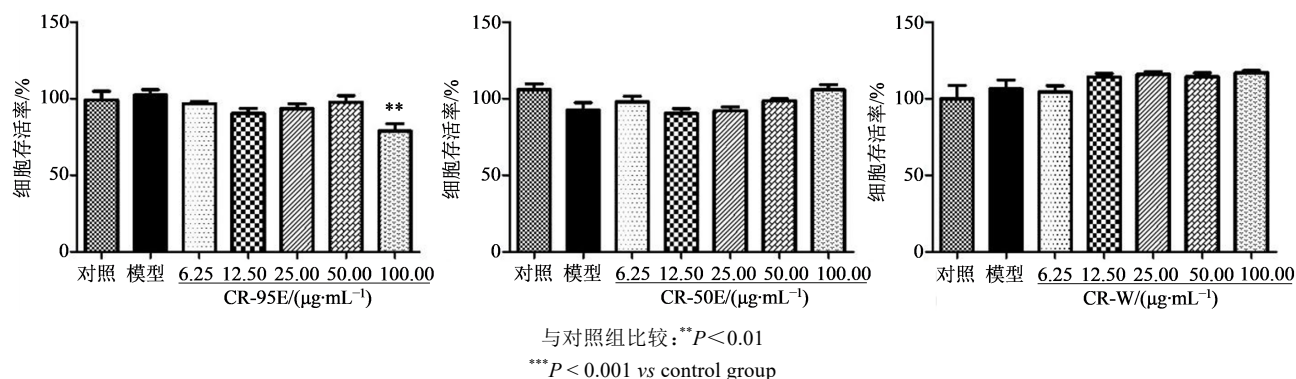
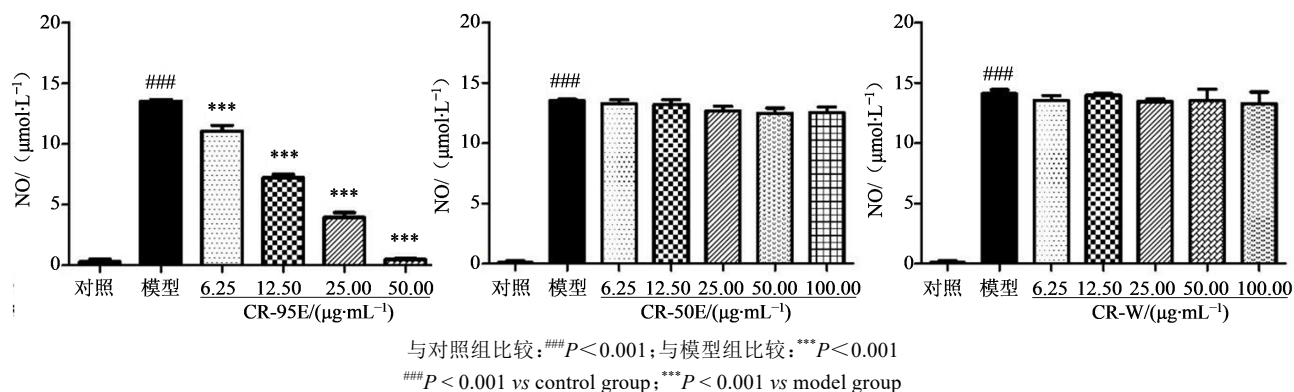
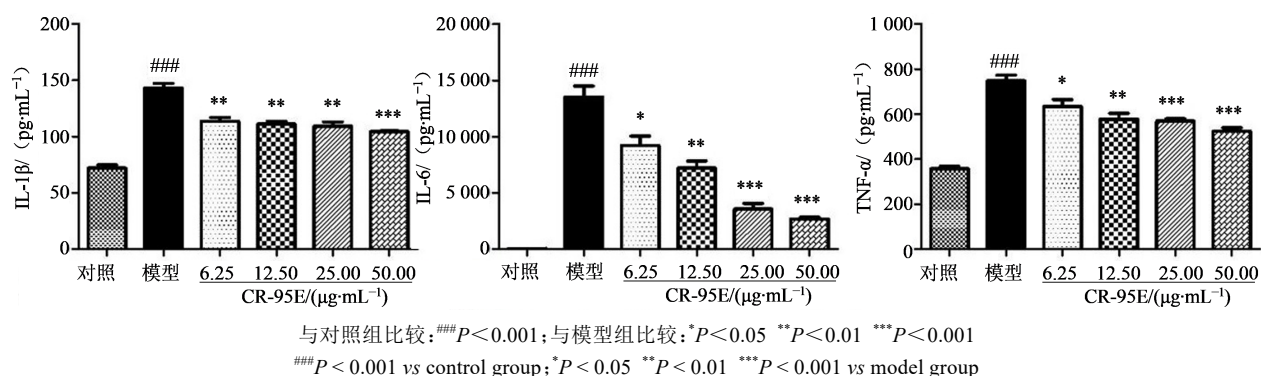


图2 CR-95E、CR-50E、CR-W对LPS诱导BV2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

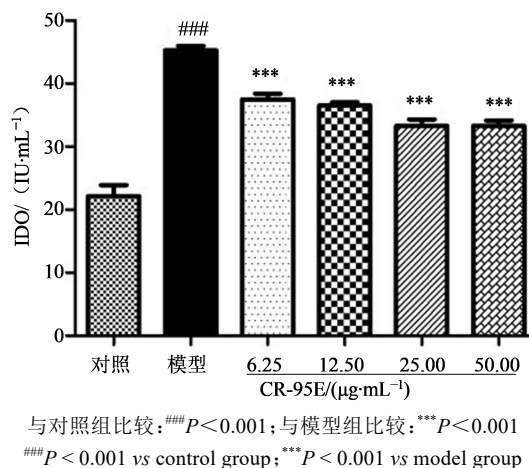
Fig. 2 Effect of CR-95E, CR-50E, CR-W on cell viability in LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

图3 香附不同极性部位对LPS诱导BV2细胞NO含量的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 3 Effect of CR-95E, CR-50E, CR-W on NO level of LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)图4 CR-95E对LPS诱导BV2细胞IL-1β、IL-6、TNF-α含量的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)Fig. 4 Effect of CR-95E on IL-1β, IL-6, TNF-α level of LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

条件下,脑内的IDO会被诱导过量表达,导致局部色氨酸浓度下降并致毒性代谢产物积聚,从而引起神经元功能异常甚至死亡。本研究采用ELISA法研究CR-95E对IDO表达量的影响,结果如图5所示,与对照组比较,模型组细胞上清液中IDO水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,CR-95E可显著降低LPS诱导BV2细胞上清中IDO水平($P < 0.001$)。表明CR-95E可能通过抑制IDO的过表达,参与抑制犬尿氨酸代谢通路异常激活导致的毒性代谢产物积聚,从而起到细胞保护和调节神经元功能的作用。

3.5 CR-95E化学成分的GC-MS分析

采用优化的GC-MS方法分析了香附抗神经炎症活性部位CR-95E的化学成分,总离子流图见图6。通过NIST MS search 2.0谱库检索及离子碎片比对,共鉴定了34个化合物的结构,结果见表1,主要为单萜类和倍半萜类成分,其中β-榄香烯、桔利酮、α-香附酮、长马鞭草烯酮已与对照品比对确认。按相对质量分数由高至低依次为异长叶烯酮(19.47%)、石竹烯氧化物(4.98%)、喇叭烯氧化物-(II)(4.01%)、α-古芸烯(3.66%)、5-甲氧基-2,2,

图5 CR-95E对LPS诱导BV2细胞IDO含量的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 5 Effect of CR-95E on IDO level of LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

6-三甲基-1-(3-甲基-1,3-丁二烯)-7-氧杂-双环[4.1.0]庚烷(3.52%)、5-羟基-1-桉叶烷烯-1-酮(3.10%)、长马鞭草烯酮(2.42%)、桔利酮(2.33%)、1,8-二甲基-8,9-环氧-4-异丙基-螺[4.5]癸烷-7-酮(1.75%)、桉油烯醇(1.70%)、α-香附酮(1.50%)等。

以保留时间为16.81 min的色谱峰为例,其结构

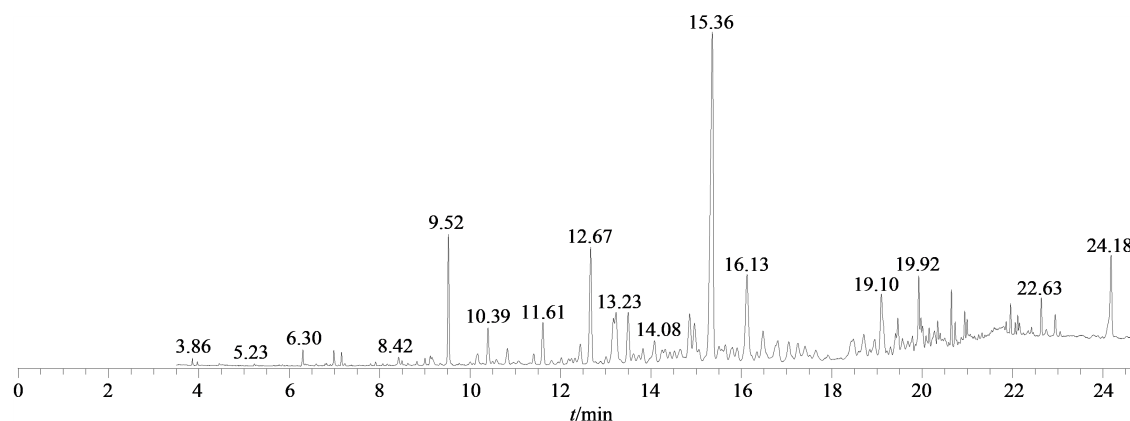


图6 CR-95E的GC-MS总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatogram of GC-MS of CR-95E

鉴定过程如下:首先提取保留时间16.81 min色谱峰的碎片离子图(图7),分子离子峰 m/z 218.11,经过质谱软件推测该化合物的分子式为 $C_{15}H_{22}O$,含有主要碎片 m/z 203.09 $[M-CH_3]$ 、 m/z 175.03 $[M-C_3H_7]$ 、 m/z 161.10 $[M-C_4H_9]$ 、 m/z 147.08 $[M-C_5H_{11}]$ 、 m/z 133.09 $[M-C_6H_{13}]$ 、 m/z 121.10 $[M-C_6H_8O]$ 、 m/z 105.06 $[M-C_7H_{13}O]$ 、 m/z 91.06 $[M-$

$C_8H_{15}O]$ 、 m/z 77.05 $[M-C_9H_{17}O]$,通过 NIST MS search 2.0 谱库检索,发现与 α -香附酮的离子碎片匹配相似度高,故推测保留时间16.81 min色谱峰的化合物为 α -香附酮,进一步将 α -香附酮的对照品按照相同的GC-MS分析方法进行检测,比对保留时间和碎片离子,最终确认了该化合物为 α -香附酮。

表1 CR-95E化学成分GC-MS分析结果

Table 1 Results of chemical constituents in CR-95E by GC-MS

序号	t/min	中文名称	英文名称	分子式	相对分子质量	相对含量/%
1	6.30	反式松香醇	<i>L</i> -pinocarveol	$C_{10}H_{16}O$	152.23	0.40
2	6.60	松香芹酮	pinocarvone	$C_{10}H_{14}O$	150.22	0.05
3	6.83	三甲基苯异丙醇	2-(4-methylphenyl)propan-2-ol	$C_{10}H_{14}O$	150.22	0.08
4	6.91	松油醇	α -terpineol	$C_{10}H_{18}O$	154.25	0.01
5	6.99	桃金娘烯醇	myrtenol	$C_{10}H_{16}O$	152.23	0.36
6	7.16	马鞭草酮	levoverbenone	$C_{10}H_{14}O$	150.22	0.25
7	7.23	反式香芹醇	trans-carveol	$C_{10}H_{16}O$	152.23	0.05
8	8.07	4-异丙基苄醇	4-isopropylbenzyl alcohol	$C_{10}H_{14}O$	150.22	0.03
9	8.17	紫苏醇	perilla alcohol	$C_{10}H_{16}O$	152.23	0.03
10	8.49	3,4,4 α ,5,6,7-六氢-1,1,4 α -三甲基-2(1 <i>H</i>)-萘酮	3,4,4 α ,5,6,7-hexahydro-1,1,4 α -trimethyl-2(1 <i>H</i>)-naphthalenone	$C_{13}H_{20}O$	192.30	0.09
11	8.82	3,4,5,6,7,8-六氢-4 α ,8 α -二甲基-萘乙酰胺2(1 <i>H</i>)	3,4,5,6,7,8-hexahydro-4 α ,8 α -dimethyl-1 <i>H</i> -naphthalen-2-one(1 <i>H</i>)	$C_{12}H_{20}O$	180.29	0.12
12	9.00	β -缬草烯	β -vatiene	$C_{15}H_{22}$	202.33	0.17
13	9.15	脱氢芳香桉烯	ehydro aromadendrene	$C_{15}H_{22}$	202.33	0.15
14	9.34	β -榄香烯	β -elemene	$C_{15}H_{24}$	204.35	0.05
15	9.53	α -古芸烯	α -gurjunene	$C_{15}H_{24}$	204.35	3.66
16	10.40	1,4,6-三甲基-1,2,3,3 α ,4,7,8,8 α -八氢-4,7-桥亚乙基萘	1,4,6-trimethyl-1,2,3,3 α ,4,7,8,8 α -octahydro-4,7-ethanoazulene	$C_{15}H_{24}$	204.35	1.31
17	11.42	δ -杜松烯	δ -cadinene	$C_{15}H_{24}$	204.35	0.40
18	11.62	桉油烯醇	(-)-spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	220.35	1.70
19	11.81	α -二氢菖蒲烯	α -calacorene	$C_{15}H_{20}$	200.32	0.18
20	12.33	异香橙烯环氧化物	isoaromadendrene epoxide	$C_{15}H_{24}O$	220.35	0.15
21	12.70	石竹烯氧化物	caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	220.35	4.98

续表1

序号	<i>t</i> /min	中文名称	英文名称	分子式	相对分子质量	相对含量/%
22	12.90	香橙烯氧化物(2)	aromadendrene oxide-(2)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	0.09
23	13.19	喇叭烯氧化物-(II)	ledene oxide-(II)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	4.01
24	13.52	桔利酮	zierone	C ₁₅ H ₂₂ O	218.33	2.33
25	13.63	苦参醇	cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37	0.33
26	14.90	长马鞭草烯酮	longiverbenone	C ₁₅ H ₂₂ O	218.33	2.42
27	15.43	异长叶烯酮	isolongifolene ketone	C ₁₅ H ₂₂ O	218.33	19.47
28	16.82	α -香附酮	α -cyperone	C ₁₅ H ₂₂ O	218.33	1.50
29	18.76	6-(1-羟基乙烯基)-4,8 α -二甲基-3,5,6,7,8,8 α -六氢萘-2(1 <i>H</i>)-酮	6-(1-hydroxymethylvinyl)-4,8 α -dimethyl-3,5,6,7,8,8 α -hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalen-2-one	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234.33	1.48
30	19.10	5-甲氧基-2,2,6-三甲基-1-(3-甲基-1,3-丁二烯)-7-氧杂-双环[4.1.0]庚烷	5-methoxy-2,2,6-trimethyl-1-(3-methyl-buta-1,3-dienyl)-7-oxa-bicyclo[4.1.0]heptane	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.35	3.52
31	19.46	1,8-二甲基-8,9-环氧-4-异丙基-螺[4.5]癸烷-7-酮	1,8-dimethyl-8,9-epoxy-4-isopropyl-spiro[4.5]decan-7-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.35	1.75
32	19.78	马兜铃烯环氧化物	sristolene epoxide	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	0.53
33	19.92	5-羟基-1-桉叶烷烯-1-酮	corymbolone	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.35	3.10
34	20.27	喇叭烯氧化物(I)	ledene oxide-(I)	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	0.78

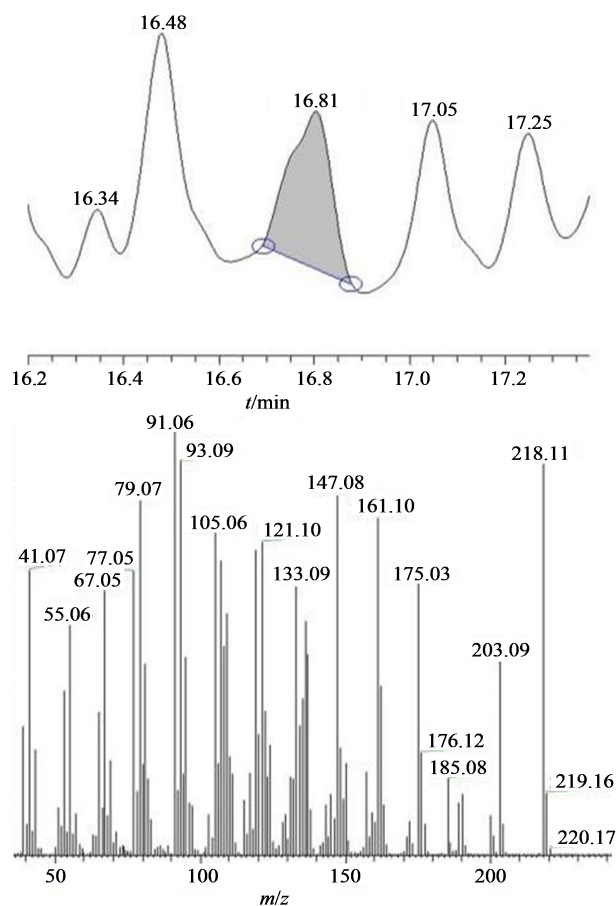


图7 CR-95E的GC-MS总离子流局部放大图和其碎片离子图

Fig. 7 Partial enlargement of total ion chromatogram of GC-MS and fragment ion peaks

4 讨论

小胶质细胞作为中枢神经系统中主要的免疫细胞,当受到LPS刺激时产生一系列促炎因子^[21],导致神经炎症的发生,进一步加重神经元和突触可塑性的损伤。其中NO是由L-精氨酸通过NO合酶(NOS)合成,受到外界刺激时,诱导型NOS(iNOS)激活使NO合成释放量增加,是炎症反应的一项重要指标^[20],可进一步激活NF- κ B信号通路。本研究发现,CR-95E是香附抗神经炎症的活性部位,可剂量相关性地降低LPS诱导BV-2细胞NO的释放量,提示CR-95E可以通过抑制NO释放发挥抗炎作用。

本研究发现CR-95E可剂量相关性地抑制模型细胞上清液中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6的升高。NF- κ B是能调节多种炎症和免疫基因表达的一种重要的转录调节因子^[22]。在细胞的炎症反应、免疫应答等过程中NF- κ B起到关键性作用。已知的NF- κ B通路激活因子有很多,包括:TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6等^[23-25],结合本研究结果分析CR-95E可能通过调控NF- κ B信号通路发挥抗炎作用,需进一步实验验证。

当中枢神经系统处于炎症、感染或创伤等病理条件下,脑内的IDO会被诱导过量表达,IDO作为色氨酸-犬尿氨酸代谢通路的第一个限速酶,它的过量表达会导致局部色氨酸浓度下降并致毒性代谢产物(喹啉酸)积聚,喹啉酸可诱导N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体持续激活,导致Ca²⁺内流增加,致

使神经元内钙超载和兴奋性氨基酸浓度过高从而加深神经毒性造成细胞坏死或凋亡,从而引起神经元功能异常甚至死亡^[15,26]。本研究发现LPS诱导BV2细胞模型中的IDO表达显著增高,CR-95E可以剂量相关性地抑制IDO表达,提示CR-95E可能通过抑制犬尿氨酸通路关键酶IDO,调节色氨酸-犬尿氨酸代谢通路发挥抗神经炎症和神经保护作用。

GC-MS分析显示CR-95E中相对质量分数较高的成分有 α -香附酮,该化合物也是药用植物香附的主要活性成分。据相关研究报道, α -香附酮通过沉默调节蛋白3(SIRT3)/活性氧(ROS)通路介导的NLRP3炎性体失活,增强了神经可塑性,发挥抗抑郁作用^[27]。文献报道提示, α -香附酮可能为香附的药效物质基础之一,故其作用值得进一步研究。

本研究采用LPS诱导BV2细胞炎症模型对香附不同极性部位抗神经炎症作用进行考察,发现CR-95E具有确切的抗神经炎症作用,可通过抑制细胞NO和炎症因子的释放,抑制IDO过表达发挥抗神经炎症作用。此外,本研究发现CR-95E的主要成分为异长叶烯酮、 α -香附酮、氧化石竹烯、喇叭烯氧化物-(II)和桉油烯醇等,推测可能是其发挥抗神经炎症的主要成分,未来将针对上述成分和相关机制通路进行深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 黄险峰,彭国平.香附的化学成分及药理研究进展[J].中药材,2003,26(1):65-68.
Huang X F, Peng G P. Advances in chemical constituents and pharmacology of *Cyperus rotundus* [J]. J Chin Med Mater, 2003, 26(1): 65-68
- [3] 潘少斌,孔娜,李静,等.香附化学成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2019,21(10):1429-1434.
Pan S B, Kong N, Li J, et al. Research progresses on chemical constituents and pharmacological activities of *Cyperus rotundus* [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(10): 1429-1434.
- [4] 刘欢,张孟历,于猛,等.醋制香附挥发油抗抑郁活性及化学成分分析[J].药物评价研究,2020,43(3):436-442.
Liu H, Zhang M L, Yu M, et al. Antidepressant activity evaluation and GC-MS analysis of volatile oil from vinegar-made *Cyperus rhizome* [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(3): 436-442.
- [5] Mohamed-Ibrahim S R, Mohamed G A, Abdullah Khayat M T, et al. Anti-inflammatory terpenoids from *Cyperus rotundus* rhizomes [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(4): 1449-1456.
- [6] Jung S H, Kim S J, Jun B G, et al. α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF- κ B signalling in RAW 264.7 cells [J]. J Ethnopharm, 2013, 147(1): 208-214.
- [7] Seo Y J, Jeong M, Lee K T, et al. Isocyperol, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced inflammatory responses via suppression of the NF- κ B and STAT3 pathways and ROS stress in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Inter Immunopharm, 2016, 38: 61-69.
- [8] Shin J S, Hong Y, Lee H H, et al. Fulgidic acid isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus* suppresses LPS-induced iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 expression by AP-1 inactivation in RAW264.7 macrophages [J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(7): 1081-1086.
- [9] Huang B X, He D W, Chen G X, et al. α -Cyperone inhibits LPS-induced inflammation in BV-2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO-1 and suppression of the NF- κ B pathway [J]. Food Funct, 2018, 9(5): 2735-2743.
- [10] Yang Q Q, Zhou J W. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells [J]. Glia, 2019, 67(6): 1017-1035.
- [11] Pajares M, Rojo A I, Manda G, et al. Inflammation in Parkinson's disease: Mechanisms and therapeutic implications [J]. Cells, 2020, 9(7): 1687.
- [12] Garaschuk O, Verkhratsky A. Physiology of microglia [J]. Methods Mol Biol, 2019, 2034: 27-40.
- [13] Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, et al. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus [J]. J Neuroimmunol, 1990, 27(2/3): 229-237.
- [14] Rodríguez-Gómez J A, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, et al. Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response [J]. Cells, 2020, 9(7): 1717.
- [15] Pedraz-Petrozzi B, Elyamany O, Rummel C, et al. Effects of inflammation on the kynurenine pathway in schizophrenia - a systematic review [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 56.
- [16] Jia H M, Liu Y, Yu M, et al. Neuroprotective effect of *Cyperus rhizome* against corticosterone-induced PC12 cell injury via suppression of Ca^{2+} overloading [J]. Metabolites, 2019, 9(11): 244.
- [17] Guo C, Yang L, Wan C X, et al. Anti-neuroinflammatory effect of Sophoraflavanone G from *Sophora alopecuroides* in LPS-activated BV2 microglia by

- MAPK, JAK/STAT and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2016, 23(13): 1629-1637.
- [18] Okorji U P, Velagapudi R, El-Bakoush A, et al. Antimalarial drug artemether inhibits neuroinflammation in BV2 microglia through Nrf2-dependent mechanisms [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(9): 6426-6443.
- [19] Ismail E N, Jantan I, Vidyadaran S, et al. Phyllanthus amarus prevents LPS-mediated BV2 microglial activation via MyD88 and NF- κ B signaling pathways [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 202.
- [20] Tenopoulou M, Doulias P T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism [J]. F1000Res, 2020. Doi: 10.12688/f1000research.19998.1.
- [21] Huang C X, Irwin M G, Wong G T C, et al. Evidence of the impact of systemic inflammation on neuroinflammation from a non-bacterial endotoxin animal model [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 147.
- [22] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a001651.
- [23] Dinarello C A. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation [J]. Eur J Immunol, 2011, 41(5): 1203-1217.
- [24] Frankola K A, Greig N H, Luo W M, et al. Targeting TNF- α to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011, 10(3): 391-403.
- [25] Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1863(6 Pt A): 1218-1227.
- [26] Huang Y S, Ogbechi J, Clanchy F I, et al. IDO and kynurenine metabolites in peripheral and CNS disorders [J]. Front Immunol, 2020, 11: 388.
- [27] Xia B M, Tong Y, Xia C B, et al. A-cyperone confers antidepressant-like effects in mice via neuroplasticity enhancement by SIRT3/ROS mediated NLRP3 inflammasome deactivation [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 577062.

[责任编辑 兰新新]



• 公益广告 •

