

皱叶香薷化学成分的分离鉴定及其抗炎活性研究

李凌轩¹, 韩 锋^{2#}, 黄 玉¹, 卢叶青¹, 冯 培³, 邓辉煌³, 李雪银², 靳 磊¹, 李润峰³, 逆慧慧^{1*}, 吴 云²

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州一品红制药有限公司, 广东 广州 510730

3. 广州医科大学附属第一医院, 呼吸内科, 呼吸疾病全国重点实验室, 国家呼吸医学中心, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心, 广州呼吸健康研究院, 广东 广州 510120

摘 要: **目的** 研究皱叶香薷 *Elsholtzia rugulosa* 的化学成分及其抗炎抗病毒活性。**方法** 采用溶剂提取法对皱叶香薷进行分级萃取, 运用多种色谱方法分离纯化, 通过核磁共振和质谱等波谱方法鉴定分离物的结构, 并通过 RT-qPCR 法进一步测定化合物对 H1N1 流感病毒诱导的炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 γ 干扰素诱导蛋白-10 (interferon- γ -inducible protein 10, IP-10) mRNA 表达水平的影响, 以评价其抗炎活性。**结果** 从皱叶香薷的 95%乙醇提取物中共分离出 14 种化合物, 分别鉴定为 5-hydroxy-4-methyl-5-(3-methylbut-2-en-2-yl)furan-2(5H)-one (**1**)、rugulolide A (**2**)、rugulolide B (**3**)、rugulolide D (**4**)、迷迭香酸 (**5**)、迷迭香酸甲酯 (**6**)、迷迭香酸丁酯 (**7**)、3'-deoxyshimobashiraside A (**8**)、木犀草素 (**9**)、木犀草苷 (**10**)、大波斯菊苷 (**11**)、植物醇 (**12**)、齐墩果酸 (**13**)、咖啡酸 (**14**)。RT-qPCR 法从 14 个化合物中筛选得出 5 个抗炎活性较好的化合物 (化合物 **1~4**、**10**), 能显著下调细胞中 H1N1 流感病毒诱导的炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 IP-10) mRNA 表达水平, 可显著抑制流感引起的炎症反应。**结论** 化合物 **1** 为 1 个新的单萜内酯类化合物, 命名为皱叶香薷内酯 E; 化合物 **2~4** 为首次从香薷属植物中分离得到。化合物 **1** 能剂量相关性地抑制流感病毒诱导的炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 IP-10) mRNA 表达水平, 从而发挥显著的抗炎抗病毒效果。

关键词: 皱叶香薷; 抗炎活性; 单萜内酯; 皱叶香薷内酯 E; rugulolide A; rugulolide B; 迷迭香酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)14-4938-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.002

Separation, identification and anti-inflammatory activity of *Elsholtzia rugulosa*

LI Lingxuan¹, HAN Feng², HUANG Yu¹, LU Yeqing¹, FENG Pei³, DENG Huihuang³, LI Xueyin², JIN Lei¹, LI Runfeng³, TI Huihui¹, WU Yun²

1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University (GDPU), Guangzhou 510006, China

2. Guangzhou Yipinhong Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 510730, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Department of Respiratory Medicine, National Key Laboratory of Respiratory Diseases, National Center for Respiratory Medicine, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Guangzhou Institute of Respiratory Health, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To study the chemical composition of *Elsholtzia rugulosa* and its anti-inflammatory and antiviral activities.

Methods *E. rugulosa* was subjected to graded extraction by solvent extraction method, separated and purified by various chromatographic methods, and the structures of the isolates were identified by spectroscopic methods such as nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS), and the compounds' anti-inflammatory and anti-viral activities against H1N1 influenza

收稿日期: 2025-03-14

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515011512)

作者简介: 李凌轩, 男, 本科生。E-mail: 280074853@qq.com

#共同第一作者: 韩 锋, 男, 副研究员, 主要从事中药新药研发。E-mail: 20400202@gdyph.com

*通信作者: 逆慧慧, 女, 副教授, 博士, 从事中药抗病毒药效及天然药物化学研究。E-mail: tihuihui@126.com

virus-induced inflammatory factors, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and Interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10) mRNA expression levels were evaluated to determine their anti-inflammatory activities.

Results A total of 14 compounds were isolated from the 95% ethanol extract of *E. rugulosa*. The compounds were identified as rugulolide E (**1**), rugulolide B (**2**), rugulolide D (**3**), rugulolide A (**4**), rosmarinic acid (**5**), methyl rosmarinate (**6**), butyl rosmarinate (**7**), 3'''-deoxyshimobashiraside A (**8**), luteolin (**9**), luteolin 7-O-glucoside (**10**), cosmosiin (**11**), phytol (**12**), oleanolic acid (**13**), Caffeic acid (**14**). RT-qPCR screening of five compounds from 14 compounds resulted in five compounds with better anti-inflammatory activity (compounds **1**–**4**, and **10**), and the compounds significantly down-regulated the expression of mRNAs of H1N1 influenza virus-induced inflammatory factors in the cells (IL-6, IL-1 β , TNF- α , and IP-10) mRNA expression levels, which could significantly inhibit influenza-induced inflammatory responses. **Conclusion** Compound **1** is a new monoterpene lactone compound named rugulolide E; Compounds **2**–**4** were isolated for the first time from *E. rugulosa*. Compound **1** significantly inhibited the mRNA expression levels of influenza virus-induced inflammatory factors (IL-6, IL-1 β , TNF- α , and IP-10) in a dose-dependent manner, thus exerting anti-inflammatory and antiviral effects.

Keywords: *Elsholtzia rugulosa* Hemsl.; composition; anti-inflammatory activity; monoterpene lactone; rugulolide E; rugulolide B; rosmarinic acid

皱叶香薷 *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. 为唇形科 (Labiales) 香薷属 *Elsholtzia* Willd. 植物, 又名野拔子、野坝蒿等。以全草入药, 是一种重要的中药材, 皱叶香薷最早记载于《丽江中草药》, 味辛, 性凉, 无毒, 归肺、胃经, 有清热解表、消食化积等功效^[1-3]。皱叶香薷被收录于《云南中草药选》, 记载其具有治疗伤风感冒、消化不良、腹痛腹胀、痢疾、咳血、风湿关节痛、外伤出血、烂疮、蛇咬伤等多种药用价值^[4-5]。香薷属植物在全球约有 40 种, 主要分布于亚洲东部。其中我国境内有 33 种, 包括白香薷 *Elsholtzia winitiana* Craib.、长毛香薷 *E. pilosa* (Benth.) Benth.、川滇香薷 *E. souliei* Lévl.、石香薷 *Mosla chinensis* Maxim. 和江香薷 *M. chinensis* Maxim. cv. *jiangxiangru* 等, 这些植物在全国范围内广泛分布^[6]。香薷属植物具有丰富的化学成分。目前已鉴定出 114 种化合物, 包括黄酮类、挥发油类、三萜类、有机酸类、甾醇类和香豆素类等。皱叶香薷的研究表明, 其主要成分为黄酮类化合物, 如芹菜素、木犀草素和木犀草苷, 这些成分已被证实具有显著的抗炎活性^[7-11]。

目前研究认为, 在流感病毒感染机体时, 疾病的严重程度与病毒和机体炎症反应的强度相关, 如体内出现过度的炎症反应, 即“细胞因子风暴”。细胞因子风暴在流感后肺炎的发病过程起着重要作用, 在流感后肺炎患者中可检测到很多炎症因子高表达, 包括干扰素 (interferon, IFN)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素 (interleukin, IL) 和趋化因子等^[12]。

为进一步探讨皱叶香薷的化学成分及其药理

作用, 本研究对皱叶香薷进行了分离和鉴定, 从地上部分 95%乙醇提取物中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为 5-hydroxy-4-methyl-5-(3-methylbut-2-enoyl) furan-2(5H)-one (**1**)、rugulolide A (**2**)、rugulolide B (**3**)、rugulolide D (**4**)、迷迭香酸 (rosmarinic acid, **5**)、迷迭香酸甲酯 (methyl rosmarinate, **6**)、迷迭香酸丁酯 (butyl rosmarinate, **7**)、3'''-deoxyshimobashiraside A (**8**)、木犀草素 (luteolin, **9**)、木犀草苷 (cynaroside, **10**)、大波斯菊苷 (cosmosiin, **11**)、植物醇 (phytol, **12**)、齐墩果酸 (oleanolic acid, **13**) 和咖啡酸 (caffeic acid, **14**)。其中, 化合物 **1**~**4** 为单萜内酯类化合物, **5**~**7** 为苯丙素类化合物, **8** 为麦芽酚苷类化合物, **9**~**11** 为黄酮苷类化合物, **12**、**13** 为萜类化合物, **14** 为羟基肉桂酸类化合物。14 个化合物的结构见图 1。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 命名为皱叶香薷内酯 E (rugulolide E)。化合物 **2**~**4** 为首次从香薷属植物中分离得到。14 个分离得到的化合物中, 化合物 **1**~**4** 和 **10** 能显著地抑制流感病毒诱导的炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 IP-10) mRNA 表达水平, 化合物 **1** 能剂量相关性地抑制流感病毒诱导的炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 IP-10) mRNA 表达水平, 从而发挥抗炎效果, 为进一步开发皱叶香薷提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

皱叶香薷 95%乙醇提取物由广州一品红制药有限公司制备并提供, 经中国科学院昆明植物研究所周培军教授鉴定为皱叶香薷 *E. rugulosa* Hemsl.,

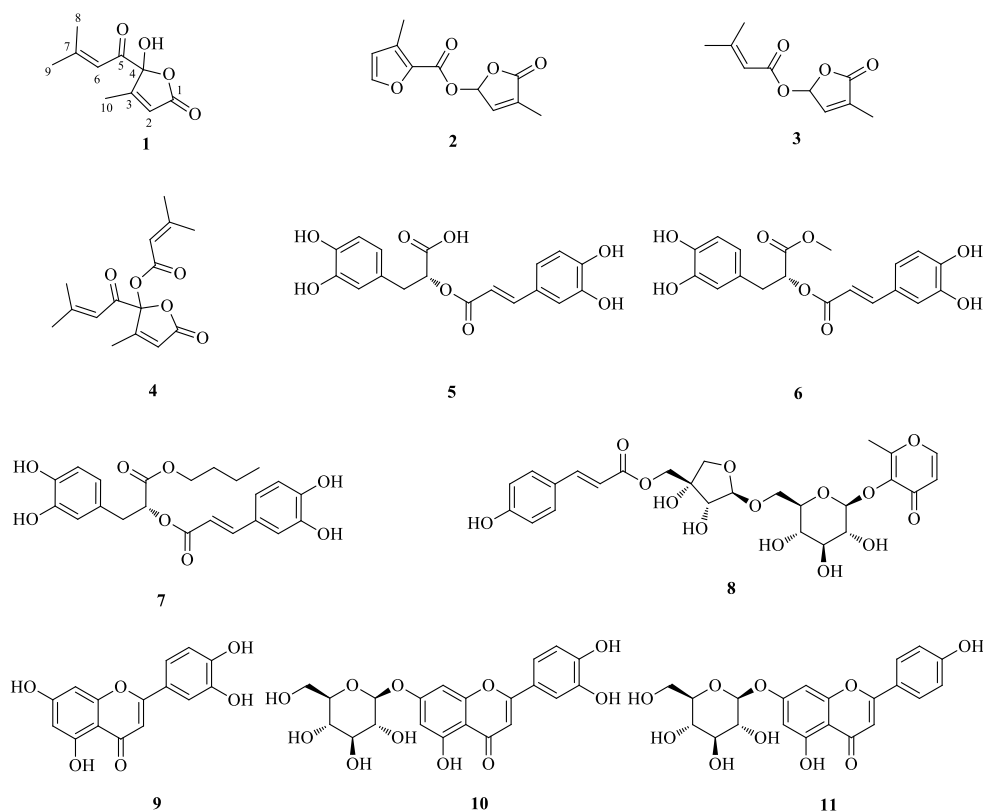


图 1 化合物 1~11 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—11

样品标本存放于广州一品红中药研究中心实验室。

A549 细胞购于美国组织细胞收藏中心(American Type Culture Collection, ATCC); 病毒株: 流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) 由广州医科大学广州呼吸健康研究所馈赠。

1.2 主要试剂、仪器

醋酸乙酯、正丁醇、石油醚、丙酮购自西陇化工有限公司; 色谱级乙腈、甲醇溶剂购自德国 Merck 公司; 磷酸盐缓冲液、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司; TRIzol 试剂购自赛默飞公司。

GF₂₅₄ 硅胶板(50~100 nm) 购于临沂市海洋化工有限公司; 柱色谱硅胶(100~200 目) 购于青岛海洋化工有限公司; Agilent 1206 型高效液相色谱仪产自美国 Agilent 公司; Water 2535 型半制备液相色谱仪产自美国 Waters 公司; Bruker avance III 600 MHz 超导核磁共振仪、Bruker DRX 500 MHz 超导核磁共振仪(德国 Bruker 公司); UPLC-Q-TOF/MS 系统购自安捷伦科技有限公司; 微孔凝胶柱(75~150 μm) 购自北京慧德易科技有限公司; FQD-96X 荧光定量 PCR 检测仪购自杭州博日科技有限公司; 恒温 CO₂ 培养箱、细胞培养板购自赛默飞公司。

2 提取与分离

皱叶香薷 46 kg, 以 95% 乙醇常温提取 3 次后, 用旋转蒸发器浓缩提取液(水浴锅温度 50 °C, 真空度 -0.05 MPa), 得到提取物 4.8 kg。将浸膏分散于 5 L 的水中, 分别用等体积醋酸乙酯和正丁醇进行萃取, 每个溶剂萃取 3 次, 合并醋酸乙酯萃取液, 萃取液减压浓缩得到醋酸乙酯相浸膏 3 000 g。

醋酸乙酯相部分经硅胶柱色谱, 石油醚-丙酮(1:0、100:1、50:1、30:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1) 梯度洗脱, 得到组分 Fr. 1~7。Fr. 2 先经凝聚柱洗脱(氯仿-甲醇 1:1), 再经高压制备液相(60% 甲醇) 分离, 得到化合物 2(18 mg)。Fr. 3 经微孔树脂(MCI) 柱色谱, 甲醇-水(60%、80%、100%) 梯度洗脱得到 3 个组分 Fr. 3-1~3-3; Fr. 3-1 经高压制备液相(57% 甲醇) 分离, 分别得到化合物 3(118 mg) 和 4(48 mg), Fr. 3-2 反复使用硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 100:1) 得到化合物 12(540 mg)。Fr. 4 经硅胶柱色谱, 用石油醚-氯仿(1:1) 等度洗脱后, 经高压制备液相(40% 甲醇) 分离及凝胶柱色谱(甲醇), 得到化合物 1(34 mg)。Fr. 5 重结晶得到化合物 13(37 mg)。Fr. 6 经硅胶柱色

谱,以氯仿-甲醇(100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、1:1)梯度洗脱得到 6 个组分 Fr. 6-1~6-6, Fr. 6-1 经高压制备液相(60%甲醇)分离,得到化合物 **6** (46 mg); Fr. 6-2 经微孔树脂(MCI)柱色谱,分别以 50%甲醇和 70%甲醇洗脱得到组分 Fr. 6-2-1 和 Fr. 6-2-2, Fr. 6-2-1 经高压制备液相(20%乙腈)纯化得到化合物 **8** (53 mg), Fr. 6-2-2 经高压制备液相(50%甲醇)纯化得到化合物 **9** (10 mg)。Fr. 7 以 18%乙腈-水为流动相,经高压制备液相分离得到化合物 **10** (20 mg)。正丁醇部分经硅胶柱色谱,氯仿-甲醇(100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1)梯度洗脱,得到组分 Fr. 1~3。Fr. 2 经微孔树脂柱色谱,经甲醇-水(1:9、4:6、6:4、7:3)洗脱得到 4 个组分 Fr. 2-1~2-4, Fr. 2-1 经高压制备液相色谱(22%甲醇)纯化得到化合物 **14** (18 mg), Fr. 2-4 经高压制备液相(60%甲醇)纯化得到化合物 **7** (96 mg)。Fr. 3 以 30%甲醇经微孔树脂柱色谱,再经凝胶柱色谱,以甲醇洗脱得到化合物 **11** (10 mg)。水相经微孔树脂柱色谱,以 10%甲醇-水洗脱,得到化合物 **5** (68 mg)。

3 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 法检测化合物对流感病毒 H1N1 诱导的炎症因子的表达

A549 细胞重悬后,将细胞重悬液接种于细胞培养板中,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 12~18 h,生长至适度密度后弃去上清培养基,并用 PBS 洗涤细胞 3 次。接着加入 1 mL 含 1 000 倍的组织半数感染量(50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 甲型流感病毒的培养液,置于培养箱孵育 2 h,待病毒吸附完成后,弃去上清。随后,加入含待测药物的病毒稀释液(含 1%TPCK 胰蛋白酶),培养箱继续孵育 24 h。培养结束后,弃上清液并用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次。使用 TRIzol 试剂裂解细胞,收集样品用于 RNA 提取。实验设置对照组、病毒感染对照组、不同剂量待测药物组(每个药物进行 2 倍稀释,设 3 个浓度梯度)和阳性对照奥司他韦(Osetamivir, Ose)组,并进行 RT-qPCR 检测各组对宿主细胞感染相关炎症因子(IL-6、IL-1β、TNF-α 和 IP-10) mRNA 表达水平的影响。引物序列见表 1。

使用 GraphPad Prism 9.2 软件等软件对数据进行统计分析和可视化,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组分析采用单因素方差分析和 LSD 事后检验评估组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
IL-6	F: CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA R: CGCTTGTGGAGAAGGAGTTCA
IL-1β	F: GCACGATGCACCTGTACGAT R: AGACATCACCAAGCTTTTTTGCT
TNF-α	F: AACATCCAACCTTCCCAAACG R: GACCCTAAGCCCCCAATTCTC
IP-10	F: GAAATTATTCCTGCAAGCCAATTT R: TCACCCCTCTTTTTCATTGTAGCA
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTG R: GAAGATGGTGATGGGATTTC

4 结果

4.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末。 $[\alpha]_D^{25}$ 0.2 (c 0.10, MeOH); HR-ESI-MS m/z : 219.062 8 $[M + Na]^+$ (calcd for 219.062 8), 分子式为 C₁₀H₁₂O₄, 不饱和度为 5; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (nm): 204, 250; 红外光谱显示, 分子结构中存在羟基(3 419 cm⁻¹), 羰基(1 784、1 758 cm⁻¹) 的共振吸收峰。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) (表 2) 显示 1 个羟基质子信号 δ_H 5.69 (1H, s)、2 个烯氢信号 δ_H 6.06 (1H, q, J = 1.6 Hz), 6.02 (1H, m)、3 个甲基信号 δ_H 2.28 (3H, d, J = 1.0 Hz), 1.99 (3H, d, J = 1.2 Hz), 1.94 (3H, d, J = 1.6 Hz)。¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) 及 DEPT 图谱显示 10 个碳原子, 包括 3 个甲基碳信号 δ_C 28.6, 22.2, 12.5; 2 个烯碳次甲基信号 δ_C 120.2, 114.6; 5 个季碳信号 δ_C 189.0, 170.6, 168.0, 164.5, 103.9。根据上述数据可推测化合物 **1** 为单萜类化合物, 经文献调研, 发现其与同样来源于植物香薷的化合物 rugulolide D^[13] 非常相似; 主要差异在于已知化合物 rugulolide D 的 4 位取代基是异戊烯酰基, 而在化合物 **1** 中则是羟基。通过进一步的二维核磁图谱分析证实上述结论。

在 HMBC 谱(图 2)中, H-8 (δ_H 2.28) 与 C-6 (δ_C 114.6), C-7 (δ_C 168.0) 和 C-9 (δ_C 28.6) 相关, H-9 (δ_H 1.99) 与 C-6, C-7 和 C-8 (δ_C 22.2) 相关, 构建了化合物侧链末端的 2-甲基丙烯片段; 同时 H-6 (δ_H 6.02) 与 C-5 (δ_C 189.0) 的相关及 H-8 和 H-9 与 C-5 的远程(弱)相关, 确定了 2-甲基丙烯与酮基相连形成 3-甲基-2-丁烯酮的侧链结构片段; 此外, H-10 (δ_H 1.94) 与 C-2 (δ_C 120.2), C-3 (δ_C 164.5) 和 C-4 (δ_C 103.9) 相关, H-2 (δ_H 6.06) 与 C-1 (δ_C 170.6), C-3, C-4, 和 C-10 (δ_C 12.5) 的相关以及 OH-4 (δ_H 5.69)

表 2 化合物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 的波谱数据 (500/125 MHz, CDCl_3)Table 2 Spectral data of ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR of compound 1 (500/125 MHz, CDCl_3)

碳位	δ_{C}	δ_{H}
1	170.6 (s)	—
2	120.2 (d)	6.06 (q, $J = 1.6$ Hz)
3	164.5 (s)	—
4	103.9 (s)	—
5	189.0 (s)	—
6	114.6 (d)	6.02 (m)
7	168.0 (s)	—
8	22.2 (q)	2.28 (d, $J = 1.0$ Hz)
9	28.6 (q)	1.99 (d, $J = 1.2$ Hz)
10	12.5 (q)	1.94 (d, $J = 1.6$ Hz)
4-OH	—	5.69 (s)

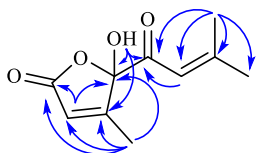


图 2 化合物 1 的关键 HMBC () 相关

Fig. 2 Key HMBC () correlation of compound 1

与 C-3, C-4 的相关验证了甲基化 α,β -不饱和 γ -内酯。最后, OH-4 与 C-5 的相关确定了侧链 (3-甲基-2-丁烯酮) 与 α,β -不饱和 γ -内酯的 γ 位相连。综上所述, 化合物 1 的化学结构确定为 5-hydroxy-4-methyl-5-(3-methylbut-2-enoyl)furan-2(5H)-one。经 SciFinder 数据库检索, 确定该化合物为新化合物, 命名为皱叶香薷内酯 E (rugulolide E)。采用 HPLC 对其进行了手性分析分离, 未见其有效分离峰。其 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 的波谱数据见表 2, 化合物的结构见图 1。

化合物 2: 白色粉末。ESI-MS m/z : 245 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.48 (1H, brd, $J = 1.7$ Hz, H-10), 7.10 (1H, m, H-4), 7.01 (1H, m, H-3), 6.41 (1H, brd, $J = 1.7$ Hz, H-9), 2.37 (3H, s, H-11), 2.02 (3H, dd, $J = 1.6, 1.3$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 171.0 (C-1), 157.1 (C-6), 146.1 (C-10), 141.9 (C-3), 138.5 (C-7), 134.8 (C-2), 134.2 (C-8), 115.6 (C-9), 92.3 (C-4), 11.7 (C-11), 10.7 (C-5)。上述数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 2 为 rugulolide A。

化合物 3: 无色油状物。ESI-MS m/z : 219 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.09 (1H, quin,

$J = 1.6$ Hz, H-3), 6.91 (1H, quin, $J = 1.4$ Hz, H-4), 5.71 (1H, m, H-7), 2.20 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-9), 1.95 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, H-10), 1.93 (3H, t-like, $J = 1.6$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 173.3 (C-1), 165.5 (C-6), 163.0 (C-8), 144.8 (C-3), 134.8 (C-2), 115.0 (C-7), 93.7 (C-4), 27.6 (C-10), 20.6 (C-9), 10.4 (C-5)。上述数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 3 为 rugulolide B。

化合物 4: 无色油状物。ESI-MS m/z : 301 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.38 (1H, m, H-5), 6.14 (1H, q, $J = 1.6$ Hz, H-2), 5.78 (1H, m, H-12), 2.15 (6H, s, H-8, 14), 2.04 (3H, d, $J = 1.6$ Hz, H-10), 1.98 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-9), 1.97 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-15); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 190.4 (C-5), 171.8 (C-1), 165.5 (C-3), 164.7 (C-11), 164.4 (C-7), 163.9 (C-13), 120.8 (C-2), 118.2 (C-6), 114.6 (C-12), 105.5 (C-4), 28.3 (C-9), 27.6 (C-15), 21.4 (C-8), 20.6 (C-14), 12.6 (C-10)。上述数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 4 为 rugulolide D。

化合物 5: 白色粉末。ESI-MS m/z : 383 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.74 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.69 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.60 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.18 (1H, dd, $J = 8.4, 4.3$ Hz, H-8'), 3.09 (1H, dd, $J = 14.4, 4.3$ Hz, H-7'a), 3.00 (1H, dd, $J = 14.4, 8.4$ Hz, H-7'b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 173.5 (C-9'), 168.4 (C-9), 149.7 (C-3), 147.7 (C-7), 146.8 (C-4), 146.1 (C-3'), 145.2 (C-4'), 129.2 (C-1'), 127.6 (C-1), 123.2 (C-6'), 121.8 (C-6), 117.5 (C-2'), 116.5 (C-5'), 116.3 (C-5), 115.2 (C-2), 114.3 (C-8), 74.6 (C-8'), 37.9 (C-7')。上述数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 5 为迷迭香酸。

化合物 6: 白色粉末。ESI-MS m/z : 397 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.70 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.69 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.56 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.18 (1H, dd, $J = 7.7, 5.2$ Hz, H-8'), 3.69 (3H, s, OCH_3), 3.05 (1H, dd, $J = 14.2, 5.3$ Hz, H-7'a), 3.01 (1H, dd, $J = 14.4, 7.7$ Hz, H-7'b); ^{13}C -

NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 172.2 (C-9'), 168.3 (C-9), 149.8 (C-3), 148.0 (C-7), 146.8 (C-4), 146.2 (C-3'), 145.4 (C-4'), 128.7 (C-1'), 127.6 (C-1), 123.2 (C-6'), 121.8 (C-6), 117.5 (C-2'), 116.5 (C-5'), 116.3 (C-5), 115.2 (C-2), 114.1 (C-8), 74.7 (C-8'), 52.7 (C-OCH₃), 37.9 (C-7'). 上述数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **6** 为迷迭香酸甲酯。

化合物 **7**: 黄色油状物。ESI-MS m/z : 439 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.04 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz, H-6), 6.77 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.71 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.69 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.57 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-6'), 6.27 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 5.15 (1H, t, J = 6.5 Hz, H-8'), 4.08 (2H, t, J = 6.4 Hz, H-1''), 3.03 (2H, d, J = 6.5 Hz, H-7'), 1.54 (2H, m, H-2''), 1.30 (2H, m, H-3''), 0.90 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-4''); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 171.8 (C-9'), 168.3 (C-9), 149.7 (C-3), 147.8 (C-7), 146.8 (C-4), 146.1 (C-3'), 145.3 (C-4'), 128.5 (C-1'), 127.5 (C-1), 123.1 (C-6'), 121.7 (C-6), 117.5 (C-2'), 116.4 (C-5'), 116.2 (C-5), 115.1 (C-2), 114.1 (C-8), 74.8 (C-8'), 66.1 (C-1''), 37.9 (C-7'), 31.5 (C-2''), 20.0 (C-3''), 13.9 (C-4'')。上述数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **7** 为迷迭香酸丁酯。

化合物 **8**: 白色粉末。ESI-MS m/z : 589 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.94 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-6), 7.64 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7'''), 7.46 (2H, dd, J = 8.7 Hz, H-2''', 6'''), 6.80 (2H, d, J = 8.7 Hz, H-3''', 5'''), 6.41 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-5), 6.35 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8'''), 4.98 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-1''), 4.76 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1'), 4.24 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-5''a), 4.21 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-5''b), 3.96 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-4''a), 3.95 (1H, dd, J = 11.3, 1.8 Hz, H-6'a), 3.87 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2''), 3.81 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-4''b), 3.61 (1H, dd, J = 11.3, 6.3 Hz, H-6'b), 3.30 ~ 3.42 (4H, overlapped, H-2' ~ 5'); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 177.1 (C-4), 168.9 (C-9'''), 164.6 (C-2), 161.4 (C-4'''), 157.2 (C-6), 147.0 (C-7'''), 143.5 (C-3), 131.3 (C-2''', 6'''), 127.1 (C-1'''), 117.3 (C-5), 116.9 (C-3''', 5'''), 114.8 (C-8'''), 110.6 (C-1''), 105.3 (C-1'), 78.9 (C-3''), 78.4 (C-3'), 77.9 (C-2''), 77.5 (C-5'), 75.3 (C-2'), 74.9 (C-4''), 71.3 (C-4'), 68.5 (C-6'), 67.4 (C-5''), 15.9 (C-7)。上述数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴

定化合物 **8** 为 3'''-deoxyshimobashiraside A。

化合物 **9**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 285 [M-H]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.38 (2H, overlapped, H-2', 6'), 6.89 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-5'), 6.53 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 181.6 (C-4), 164.1 (C-2), 163.9 (C-7), 161.5 (C-5), 157.3 (C-9), 149.7 (C-3'), 145.7 (C-4'), 121.5 (C-1'), 119.0 (C-6'), 116.0 (C-5'), 113.3 (C-2'), 103.7 (C-4a), 102.9 (C-3), 98.8 (C-6), 93.8 (C-8)。上述数据与文献报道基本一致^[17-19], 故鉴定化合物 **9** 为木犀草素。

化合物 **10**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 471 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.98 (1H, s, 5-OH), 7.44 (1H, dd, J = 8.4, 2.2 Hz, H-6'), 7.40 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.74 (1H, s, H-3), 6.43 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.07 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1''), 3.70 (1H, brd, J = 11.3 Hz, H-6''a), 3.15 ~ 3.50 (5H, overlapped, H-2'' ~ 5'', 6''b); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 181.9 (C-4), 164.5 (C-7), 162.9 (C-2), 161.1 (C-5), 156.9 (C-9), 150.1 (C-4'), 145.8 (C-3'), 121.2 (C-1'), 119.2 (C-6'), 116.0 (C-5'), 113.5 (C-2'), 105.3 (C-4a), 103.1 (C-3), 99.9 (C-1''), 99.5 (C-6), 94.7 (C-8), 77.1 (C-5''), 76.4 (C-3''), 73.1 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.6 (C-6'')。上述数据与文献报道基本一致^[17-20], 故鉴定化合物 **10** 为木犀草苷。

化合物 **11**: 黄色粉末。ESI-MS m/z : 455 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.87 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.80 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.64 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.06 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 3.93 (1H, dd, J = 12.2, 2.1 Hz, H-6''a), 3.71 (1H, dd, J = 12.2, 5.8 Hz, H-6''b), 3.54 (1H, m, H-5''), 3.38 ~ 3.50 (3H, overlapped, H-2'' ~ 4'')。上述数据与文献报道基本一致^[17-21], 故鉴定化合物 **11** 为大波斯菊苷。

4.2 化合物对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平的影响

本研究首先对皱叶香薷进行了分离提取, 成功从中分离出 14 个化合物, 并通过 RT-qPCR 法对其抗炎活性进行筛选。结果表明, 首次从皱叶香薷中分离得到的化合物 **2~4** 以及黄酮苷类化合物 **10** 对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水

平具有显著抑制作用,结果如图 3 所示。

4.3 新化合物皱叶香薷内酯 E 对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平的影响

通过 RT-qPCR 法对新的单帖内酯类化合物(化合物 1)抗炎活性进行测定,结果如图 4 所示,与模型组相比,该化合物处理后的流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子(*IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α*)和趋化因子(*IP-10*)的 mRNA 水平显著下降,且呈剂量相关性。

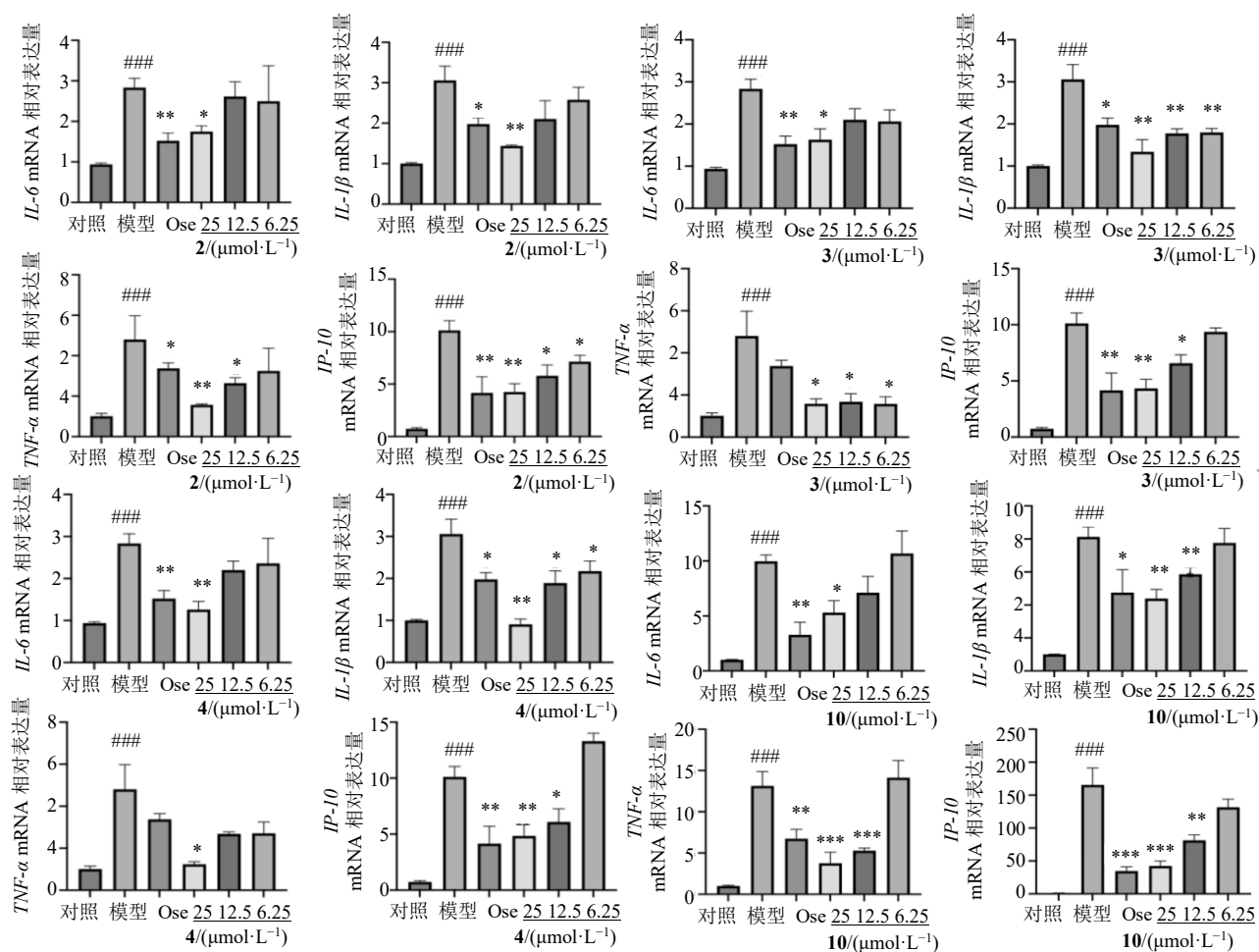
5 讨论

皱叶香薷提取物经过硅胶柱色谱、HPLC 制备等色谱分离手段,分离得到 14 个化合物。其中包括 6 个萜类化合物、5 个酚酸类化合物和 3 个黄酮类化合物。其中化合物 1 为首次从皱叶香薷中分离并鉴定得到的新单帖内酯类化合物,化合物 2~4 为首次从香薷属植物中分离得到。

在抗炎活性评价方面,本研究采用甲型流感病

毒(H1N1)诱导的 A549 细胞炎症体外模型,通过 RT-qPCR 法评估了从皱叶香薷中提取分离得到的 14 个化合物的抗炎活性。实验结果表明,首次从皱叶香薷中分离得到的化合物 2~4 以及黄酮苷类化合物 10 对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平具有显著抑制作用。并且首次从皱叶香薷中分离并鉴定得到的新单帖内酯类化合物 1 对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子同样具有抑制作用。相比于以往研究,本实验新发现的化合物在流感引起的抗炎活性中发挥着关键作用,研究结果为后续皱叶香薷在临床上开发提供了新的数据支持。

本研究通过系统分离鉴定及功能验证,首次明确了该药材抗炎活性的化学物质基础,尤其是萜类化合物和黄酮类化合物在抗炎活性中的重要作用。研究结果表明,木犀草苷等黄酮类化合物可以通过调控 NF- κ B 通路中转化生长因子 β 激活的激酶 1



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below.

图 3 化合物对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of compounds on mRNA expression of inflammatory factors in influenza virus-infected A549 cells

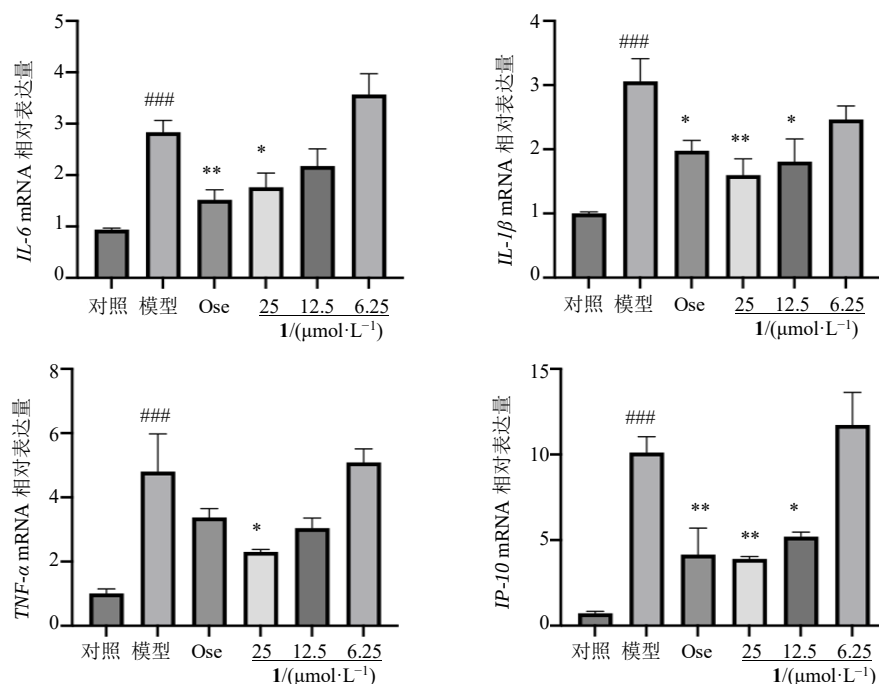


图 4 化合物 1 对流感病毒感染 A549 细胞中炎症因子 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of compound 1 on mRNA expression of inflammatory factors in influenza virus-infected A549 cells

(MAP3K7) 结合蛋白 2 [TGF- β activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 2, TAB2] 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等因子的表达,从而减少下游炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 以及 COX-2 等的转录表达,以此降低病毒感染后宿主细胞中的免疫炎症损伤^[22];而单萜内酯类化合物如小白菊内酯可以通过抑制 Keap 1 蛋白的表达,激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) /血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 信号通路磷酸化蛋白,从而抑制 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, Ptg2), 基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP13), 一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) mRNA 的表达水平^[23], 化合物 lappaceolide A 和 B 具有一定的抑菌作用^[24]。本研究进一步研究并验证了皱叶香薷在抗炎方面的药理活性及其物质基础,为皱叶香薷的机制研究奠定了一定的基础。

本研究值得注意的是,首次从皱叶香薷中新分离并鉴定得到的化合物 1 在抗炎活性方面表现出较好的效果,这提示单萜类化合物可能是皱叶香薷抗炎作用的重要活性成分。未来的研究可以进一步探讨这些化合物在体内发挥药效活性的作用机制,特

别是其在炎症信号通路中的具体作用靶点,为其作为新型抗炎药物的开发提供更多的科学依据。

皱叶香薷在民间作为药物已有广泛的应用,其治疗疾病以及抗炎方面表现出较好的疗效。但目前对于皱叶香薷中的化合物成分物质基础却研究较浅,尤其是在新化合物的发现上。本研究在此基础上,通过分离提取等方法对皱叶香薷的物质基础进行探究,并对分离物进行抗炎活性测定,从而得到 5 个抗炎效果较好的化合物 1~5。综上所述,皱叶香薷具有进一步开发为抗炎药物的潜力。本研究成果为皱叶香薷进一步药用开发和临床利用提供了重要参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng C P, Yang S F, Huang D Q, *et al.* GC-MS combined with multivariate analysis for the determination of the geographical origin of *Elsholtzia rugulosa* Hemsl. in Yunnan province [J]. *RSC Adv*, 2022, 12(33): 21287-21296.
- [2] Zhang L S, Tao A E, Zhao F Y. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* Hemsl (Labiatae) [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2020, 5(2): 1548-1549.
- [3] Zhao L, Hou L, Sun H, *et al.* Apigenin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* prevents β -amyloid

- 25–35–induces toxicity in rat cerebral microvascular endothelial cells [J]. *Molecules*, 2011, 16(5): 4005–4019.
- [4] 昆明军区后勤部卫生部. 云南中草药选 [M]. 昆明: 昆明军区后勤部卫生部, 1970: 257–258.
- [5] 刘莹, 李喜凤, 刘艾林, 等. 细皱香薷叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1356–1359.
- [6] 陈有民. 园林树木学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2011: 248.
- [7] 黄莹, 徐冠玲, 谢梦, 等. 分光光度法测定野坝子中的总黄酮 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(2): 265–267.
- [8] 刘艾林, 李铭源, 王一涛, 等. 香薷属植物的传统应用, 化学与药理学研究进展 [J]. 2007, 16(2): 73–78.
- [9] 周杨晶, 陈国强. 彝药野坝子的化学成分、药理作用及综合应用研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27(8): 53–55.
- [10] She G M, Guo Z Q, Lv H N, *et al.* New flavonoid glycosides from *Elsholtzia rugulosa* hemsl [J]. *Molecules*, 2009, 14(10): 4190–4196.
- [11] 迪明博. 野拔子总黄酮的提取、富集与化学成分研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- [12] Li Z T, Li L, Zhao S, *et al.* Re-understanding anti-influenza strategy: Attach equal importance to antiviral and anti-inflammatory therapies [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(Suppl 19): S2248–S2259.
- [13] Yang F, Pu H Y, Yaseen A, *et al.* Terpenoid and phenolic derivatives from the aerial parts of *Elsholtzia rugulosa* and their anti-inflammatory activity [J]. *Phytochemistry*, 2021, 181: 112543.
- [14] Huang L J, Li C H, Lu Z M, *et al.* Total synthesis and biological evaluation of (+)- and (-)-butyl ester of rosmarinic acid [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(6): 561–566.
- [15] Wang G C, Li T, Deng F Y, *et al.* Five new phenolic glycosides from *Hedyotis scandens* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(5): 1379–1382.
- [16] Li H Z, Nakashima T, Tanaka T, *et al.* Two new maltol glycosides and cyanogenic glycosides from *Elsholtzia rugulosa* Hemsl [J]. *J Nat Med*, 2008, 62(1): 75–78.
- [17] 徐小花, 钱士辉, 卞美广, 等. 构树叶的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(3): 190–192.
- [18] Liu B, Deng A J, Yu J Q, *et al.* Chemical constituents of the whole plant of *Elsholtzia rugulosa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(2): 89–96.
- [19] 来国防, 朱向东, 罗士德, 等. 野拔子化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 661–664.
- [20] Wang M F, Li J G, Rangarajan M, *et al.* Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*) [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(12): 4869–4873.
- [21] 戴鹏宇, 黄锦豪, 张凯惠, 等. 地锦全草化学成分研究 [J]. 中药材, 2024, 47(7): 1688–1693.
- [22] 刘晓婷, 顾立刚, 邓东沅, 等. 黄芩苷和木犀草苷在体外对流感病毒 H1N1 感染 A549 细胞中 NF- κ B 信号通路的调控作用 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1937–1941.
- [23] 王梦婷. 小白菊内酯抗炎效果及其机制研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2016.
- [24] Ragasa C Y, de Luna R D, Cruz W C Jr, *et al.* Monoterpene lactones from the seeds of *Nephelium lappaceum* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(9): 1394–1396.

[责任编辑 王文倩]