

# 兖州卷柏的肽类化学成分及对低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤的保护作用

龙红萍<sup>1</sup>, 李福双<sup>1</sup>, 杨中保<sup>1</sup>, 徐康平<sup>1</sup>, 李 静<sup>1</sup>, 赵兰芳<sup>1</sup>,  
喻 凯<sup>1</sup>, 谭蕾红<sup>1</sup>, 彭 军<sup>1</sup>, 谭桂山<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中南大学药学院, 长沙 410013; <sup>2</sup>中南大学湘雅医院, 长沙 410008

**摘要:** 采用聚酰胺、硅胶柱层析、Sephadex LH-20 和制备液相等分离方法对卷柏属植物兖州卷柏的化学成分进行分离纯化, 根据理化性质和现代波谱技术鉴定了 11 个化合物: aurantiamide (**1**)、aurantiamide acetate (**2**)、N-benzoyl-L-phenylalaninol (**3**)、neochinin A (**4**)、5,7-二羟基色原酮(**5**)、3-(3-羟基-苯基)-丙酸(**6**)、3-(3-羟基-苯基)-丙酸甲酯(**7**)、肉桂酸(**8**)、(1H-indol-3-yl) oxoacetamide (**9**)、3-甲醛-1H-吡啶 (**10**)、3-甲酸-1H-吡啶 (**11**), 以上 11 个化合物首次从该植物中分离得到, 且为首次从卷柏属植物中得到。采用 Hoechst Staining 法评价化合物 **1~4** 四个肽在低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤中的保护作用, 结果表明 4 个肽类化合物在低氧复氧诱导的 PC-12 中表现出较强的抗氧化作用, 并具有剂量依赖性, 对低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤呈现出一定的保护作用。

**关键词:** 兖州卷柏; 化学成分; 二肽; 低氧/复氧; PC-12 细胞

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Peptide Chemical Constituents from *Selaginella involvens* Spring and Their Protective Effects on Anoxic /Reoxygenation-Induced PC-12 Cell Damage

LONG Hong-ping<sup>1</sup>, LI Fu-shuang<sup>1</sup>, YANG Zhong-bao<sup>1</sup>, XU Kang-ping<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>,  
ZHAO Lan-fang<sup>1</sup>, YU Kai<sup>1</sup>, TAN Lei-hong<sup>1</sup>, PENG Jun<sup>1</sup>, TAN Gui-shan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China;

<sup>2</sup>Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

**Abstract:** Eleven compounds were isolated and purified from *Selaginella involvens* Spring by polyamide, macroporous resin and Sephadex LH-20 column chromatography, and their structures were elucidated as aurantiamide (**1**), aurantiamide acetate (**2**), N-benzoyl-L-phenylalaninol (**3**), neochinin A (**4**), 5,7-dihydroxy Chromone (**5**), 3-(3-hydroxy-phenyl) propionic acid (**6**), 3-(3-hydroxy-phenyl) methyl propionate (**7**), cinnamic acid (**8**), (1H-indol-3-yl) oxoacetamide (**9**), 1H-Indole-3-carboxaldehyde (**10**), 1H-indole-3-carboxylic acid (**11**) by chemical and modern spectroscopic methods. The eleven compounds were isolated from genus *Selaginella* for the first time. The protective effects of compounds **1-4** on anoxic/reoxygenation-induced PC-12 cell damage were evaluated by Hoechst Staining method. The four compounds showed strong antioxidant effect on the PC-12 cell damage induced by anoxic/reoxygenation, and had a dose dependent effect. Compounds **1-4** showed moderate protective effects on the PC-12 cell damage induced by anoxic/reoxygenation.

**Key words:** *Selaginella involvens* Spring; chemical constituents; dipeptide; anoxic/reoxygenation PC-12 cell

兖州卷柏 (*Selaginella involvens* Spring) 为蕨类植物门卷柏科植物兖州卷柏的全草, 又名金不换、金扁桃、金扁柏等。近年来卷柏属植物因其独特的基因

学特征引起国内外学者的广泛关注, 2011 年美国 Purdue 大学著名的植物学家 Bank JA 教授对卷柏属植物的基因测序研究结果提示卷柏可能会产生一些结构独特而新颖的次生代谢产物<sup>[1]</sup>。研究表明卷柏属植物含有黄酮类、呋喃类、萜类、生物碱等多种化学成分, 药理学研究结果表明该属植物具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老等药理活性<sup>[2]</sup>。

收稿日期: 2013-12-04 接受日期: 2014-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370370); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20100162110057); 湖南科学技术厅科技计划项目(2013SK5077); 湖南省卫生计生厅中医药科研计划项目(2010004, 201153)

\* 通讯作者 Tel: 86-731-82650395; E-mail: tgs395@aliyun.com

兖州卷柏具有抗病毒作用在民间使用,目前对于兖州卷柏的化学成分研究报导较少,为了进一步探讨兖州卷柏的活性成分及药效学物质基础,本实验对其 75% 乙醇提取物进行化学成分研究,分离得到 11 个化合物,11 个化合物都为首次从卷柏属植物中得到,其中二肽类结构类型为首次从卷柏属植物中分离得到。进一步采用 Hoechst Staining 法评价主要成分在低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤中的保护作用,结果显示化合物 1~4 四个肽对低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤呈现出一定的保护作用。

## 1 仪器与试剂

Buchi-540 熔点测定仪(瑞士 Buchi 公司);UV Probe-2540 紫外可见分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);Nicolet AVATAR360 FT-IR 红外光谱仪,KBr 压片(美国 Nicolet 公司);Varian-INOVA-400FT 型核磁共振仪( $^1\text{H}$  NMR 400 MHz, $^{13}\text{C}$  NMR 100 MHz, TMS 为内标,美国 Varian 公司);Finnigan LCQ-Advantage 质谱仪(美国 Thermo 公司);Agilent1100 制备色谱仪(美国安捷伦公司)。

聚酰胺购于国药集团化学试剂有限公司,薄层色谱用硅胶(GF<sub>254</sub>)及柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产,Sephadex LH-20 购自 pharmacia 公司。所用试剂均为分析纯。

实验药材采自于广西壮族自治区兴安县,由厦门大学生命科学院李振基教授鉴定为卷柏科植物兖州卷柏的全草,样品保存于中南大学药学院药物化学教研室。

大鼠 PC-12(高分化)细胞系购自上海中科院细胞库。

## 2 提取与分离

兖州卷柏全草(5 kg)粉碎后经 75% 乙醇回流提取 2 次(40 L/1h,40 L/1h),真空干燥后得兖州卷柏提取物(400 g)。提取物拌样上大孔树脂 HP-20,分别用水、40% 乙醇、70% 乙醇和 95% 乙醇梯度洗脱,得四个部位。40% 部位上聚酰胺(60~80 目),用水、40% 乙醇、70% 乙醇和 95% 乙醇梯度洗脱得 80 个流份,Fr. 15~32 经 Sephadex LH-20、HW-40 得化合物 **1**(20 mg)、**2**(30 mg)、**3**(100 mg)、**4**(100 mg);Fr. 33~51 经 Sephadex LH-20 反复纯化和制备液相得化合物 **5**(10 mg)、**6**(20 mg)、**7**(10 mg)、**8**(10 mg);Fr. 51~64 经 Sephadex LH-20 反复

纯化、氯仿重结晶得化合物 **9**(10 mg)、**10**(10 mg)、**11**(10 mg)。

## 3 结构鉴定

**化合物 1** 白色针晶,mp. 176.7~178.2 °C。(+)ESI-MS:403[M+H]<sup>+</sup>,结合 NMR 信息,确定分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;IR  $\nu_{\text{KBr max}}$ (cm<sup>-1</sup>):3312(NH),1660 和 1632(CONH),1592,1580,1524,1488,1262,738(单取代苯); $^1\text{H}$  NMR(400 MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ :7.26(7H,d,*J*=8.0 Hz,H-2,3,4,5,6,2',6'),4.68(1H,m,H-8),7.90(1H,d,*J*=8.4 Hz,10-NH),7.16(2H,t,*J*=8.0 Hz,H-3',5'),7.20(H,t,*J*=8.0 Hz,H-4'),3.90(1H,m,H-8'),3.87(2H,m,H-9'),7.78(2H,d,*J*=8.0 Hz,H-2'',6''),7.44(2H,t,*J*=8.0 Hz,H-3'',5''),7.50(H,t,*J*=8.0 Hz,H-4''),8.51(1H,d,*J*=8.0 Hz,8''-NH); $^{13}\text{C}$  NMR(100 MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ :138.7(C-1),128.4(C-2),129.5(C-3),126.5(C-4),129.5(C-5),128.4(C-6),37.6(C-7),55.1(C-8),171.2(C-9),139.3(C-1'),128.4(C-2'),129.5(C-3'),126.2(C-4'),129.5(C-5'),128.4(C-6'),36.7(C-7'),52.8(C-8'),62.5(C-9'),134.4(C-1''),127.8(C-2''),127.6(C-3''),131.4(C-4''),127.6(C-5''),127.8(C-6''),166.4(C-7'')。以上数据与文献报道<sup>[3]</sup>的数据基本一致,故鉴定化合物 **1** 为 aurantiamide。

**化合物 2** 白色针晶(氯仿),mp. 187.5~185.9 °C。(+)EI-MS:444[M]<sup>+</sup>,结合 NMR 信息,确定分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>;IR  $\nu_{\text{KBr max}}$ (cm<sup>-1</sup>):3312(NH),1720(OCOCH<sub>3</sub>)1660 和 1630(CONH),1598,1580,1530,1487,1260,739(单取代苯); $^1\text{H}$  NMR(400 MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ :7.24(7H,d,*J*=8.0 Hz,H-2,3,4,5,6,2',6'),4.68(1H,m,H-8),8.17(1H,d,*J*=8.4 Hz,10-NH),7.16(2H,t,*J*=8.0 Hz,H-3',5'),7.20(H,t,*J*=8.0 Hz,H-4'),4.18(1H,m,H-8'),3.87,4.01(each 1H,dd,*J*=5.2 Hz,9.6 Hz,H-9'),7.79(2H,d,*J*=8.0 Hz,H-2'',6''),7.44(2H,t,*J*=8.0 Hz,H-3'',5''),7.51(H,t,*J*=8.0 Hz,H-4''),8.54(1H,d,*J*=8.0 Hz,8''-NH),1.98(3H,s,-COCH<sub>3</sub>); $^{13}\text{C}$  NMR(100 MHz,DMSO-*d*<sub>6</sub>) $\delta$ :138.3(C-1),128.5(C-2),129.4(C-3),127.7(C-4),129.4(C-5),128.4(C-6),37.5(C-7),55.1(C-8),170.6(C-9),138.1(C-1'),128.3(C-2'),129.4(C-3'),126.5(C-4'),129.4(C-5'),128.3

(C-6'), 36.9 (C-7'), 49.4 (C-8'), 64.9 (C-9'), 171.5 (C-10'), 20.9 (C-10', CH<sub>3</sub>), 134.3 (C-1''), 128.4 (C-2''), 126.5 (C-3''), 131.6 (C-4''), 126.5 (C-5''), 128.4 (C-6''), 166.4 (C-7''). 以上数据与文献报道<sup>[4]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 aurantiamide acetate。

**化合物 3** 白色针晶, (+) EI-MS: 255 [M]<sup>+</sup>, 结合 NMR 信息, 确定分子式为 C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, IR νKBr max (cm<sup>-1</sup>): 3315 (NH) 1660 和 1630 (CONH), 1598, 1580, 1530, 1487, 1260, 739 (单取代苯); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.21 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 8''-NH), 7.78 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2, 6), 7.44 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-3, 5), 7.49 (H, t, *J* = 8.0 Hz, H-4), 7.25 (4H, m, H-2', 3', 5', 6'), 7.16 (H, m, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 2.79, 2.95 (each 1H, dd, *J* = 14.0 Hz, 5.2 Hz, H-7'), 4.16 (1H, m, H-8'), 3.42, 3.48 (each 1H, dd, *J* = 14.0 Hz, 5.2 Hz, H-9'); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 135.0 (C-1), 128.4 (C-2), 127.5 (C-3), 131.2 (C-4), 127.5 (C-5), 128.4 (C-6), 166.2 (C-7), 55.1 (C-8), 170.6 (C-9), 139.7 (C-1'), 128.4 (C-2'), 129.3 (C-3'), 126.1 (C-4'), 129.3 (C-5'), 128.4 (C-6'), 36.7 (C-7'), 53.6 (C-8'), 63.1 (C-9')。以上数据与文献报道<sup>[5]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 N-benzoyl-L-phenylalanyl-nol。

**化合物 4** 白色针晶, mp. 270.5 ~ 272.9 °C。 (+) EI-MS: 323 [M]<sup>+</sup>, 结合 NMR 信息, 确定分子式为 C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.05 (1H, s, 1-NH), 8.68 (1H, s, 10-NH), 8.33 (1H, s, 13-NH), 7.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 7.19 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, 7.2 Hz, H-5), 7.18 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 7.09 (1H, t, *J* = 6.8 Hz, 7.2 Hz, H-6), 6.89 (1H, s, H-8), 6.07 (1H, q, *J* = 10.4 Hz, 6.8 Hz, 10.4 Hz, H-16), 5.06, 5.02 (each 1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-17), 1.48 (6H, s, H-18, 19, -CH<sub>3</sub>), 1.37 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-20, -CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 144.2 (C-2), 103.7 (C-3), 126.3 (C-3a), 119.2 (C-4), 119.7 (C-5), 121.0 (C-6), 110.4 (C-7), 135.4 (C-7a), 111.9 (C-8), 125.2 (C-9), 160.2 (C-11), 50.8 (C-12), 166.7 (C-14), 39.2 (C-15), 145.4 (C-16), 117.9 (C-17), 27.8 (C-18), 27.8 (C-19), 19.9 (C-20)。以上数据与文献报道<sup>[6]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 neochinulin A。

**化合物 5** 白色粉末, ESI-MS *m/z*: 179 [M + H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.20 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-2), 6.29 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-3), 6.21 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6), 6.37 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 12.70 (1H, s, 5-OH), 10.95 (1H, s, 7-OH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 157.7 (C-2), 110.8 (C-3), 181.6 (C-4), 164.7 (C-5), 99.3 (C-6), 161.9 (C-7), 94.2 (C-8), 158.1 (C-9), 105.2 (C-10)。以上数据与文献报道<sup>[7]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 5,7-二羟基色原酮。

**化合物 6** 白色针晶, mp. 126.7 ~ 128.2 °C。 (+) ESI-MS: 151 [M + H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.49 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, 7.6 Hz, H-2), 2.73 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, 7.6 Hz, H-3), 6.61 (3H, m, H-2', 4', 6'), 7.05 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, H-5'), 12.09 (1H, s, 1-COOH), 9.25 (1H, s, 3'-OH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 171.4 (C-1), 35.5 (C-2), 30.6 (C-3), 142.6 (C-1'), 115.4 (C-2'), 157.6 (C-3'), 113.2 (C-4'), 129.6 (C-5'), 119.1 (C-6')。以上数据与文献报道<sup>[8]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 3-(3-羟基苯基)-丙酸。

**化合物 7** 白色粉末, mp. 112.7 ~ 114.2 °C。 (+) ESI-MS: 165 [M + H]<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 2.58 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, 7.6 Hz, H-2), 2.76 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, 7.6 Hz, H-3), 6.61 (3H, m, H-2', 4', 6'), 7.05 (H, t, *J* = 7.6 Hz, H-5'), 9.30 (1H, s, 3'-OH), 3.58 (3H, s, 1-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 173.0 (C-1), 35.1 (C-2), 30.5 (C-3), 142.2 (C-1'), 115.4 (C-2'), 157.7 (C-3'), 113.4 (C-4'), 129.6 (C-5'), 119.1 (C-6'), 51.6 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道<sup>[8]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 3-(3-羟基苯基)-丙酸甲酯。

**化合物 8** 白色针晶, mp. 132.7 ~ 133.2 °C。 (+) ESI-MS: 149 [M + H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 7.68 (2H, m, H-2, 6), 7.42 (3H, m, H-3, 4, 5), 7.60 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 6.54 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-8), 12.46 (1H, s, -COOH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 130.5 (C-1), 128.5 (C-2), 129.2 (C-3), 119.5 (C-4), 129.2 (C-5), 128.5 (C-6), 134.5 (C-7), 144.2 (C-8), 167.8 (C-9)。以上数据与文献报道<sup>[9]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为肉桂酸。

**化合物 9** 白色粉末, (+) EI-MS: 188 [M]<sup>+</sup>, 结合 NMR 信息, 确定分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.17 (1H, s, 1-NH), 8.69 (1H, s, H-2), 8.22 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 7.26 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5, 6), 7.52 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 8.05, 7.69 (each 1H, s, -NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 138.6 (C-2), 112.5 (C-3), 126.6 (C-3a), 121.7 (C-4), 122.9 (C-5), 123.8 (C-6), 112.9 (C-7), 136.8 (C-7a), 183.4 (C-8), 166.5 (C-9)。以上数据与文献报道<sup>[10]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 (1H-indol-3-yl) oxoacetamide。

**化合物 10** 白色粉末, (+) EI-MS: 145 [M]<sup>+</sup>, 结合 NMR 信息, 确定分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.19 (1H, s, 1-NH), 8.30 (1H, s, H-2), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 7.27 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5), 7.23 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-6), 7.51 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 9.94 (1H, s, -CHO); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 138.8 (C-2), 118.4 (C-3), 124.4 (C-3a), 121.1 (C-4), 122.4 (C-5), 123.7 (C-6), 112.7 (C-7), 137.3 (C-7a), 185.3 (-CHO)。以上数据与文献报道<sup>[11]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 3-甲醛-1H-吲哚。

**化合物 11** 白色粉末, (+) EI-MS: 161 [M]<sup>+</sup>,

结合 NMR 信息, 确定分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 11.78 (1H, s, 1-NH), 8.01 (1H, s, H-2), 7.97 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 7.16 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5, 6), 7.51 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 12.25 (1H, s, -COOH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 136.9 (C-2), 112.6 (C-3), 126.5 (C-3a), 121.0 (C-4), 121.3 (C-5), 122.5 (C-6), 112.6 (C-7), 132.6 (C-7a), 165.3 (-COOH)。以上数据与文献报道<sup>[12]</sup>的数据基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 3-甲酸-1H-吲哚。

#### 4 对低氧/复氧诱导的 PC-12 细胞损伤的保护作用

PC-12 细胞用含有 10% FBS (Highclone) 的 1640 完全培养基进行培养 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。然后用不含血清的 1640 培养基同步化 12 h, 加药处理并转入 1% 氧分压低氧 24 h, 恢复常氧和完全培养基, 复氧 24 h。Hoechst Staining 染色法评价细胞凋亡情况, 具体操作如下: 吸弃细胞培养液, PBS 洗涤细胞 2 遍, 用 Hoechst 染色液 (33258) 于 37 °C 浸染细胞 25 min, 去掉染色液, PBS 洗涤细胞 2 遍, 用荧光显微镜观察细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>, 结果见图 1。

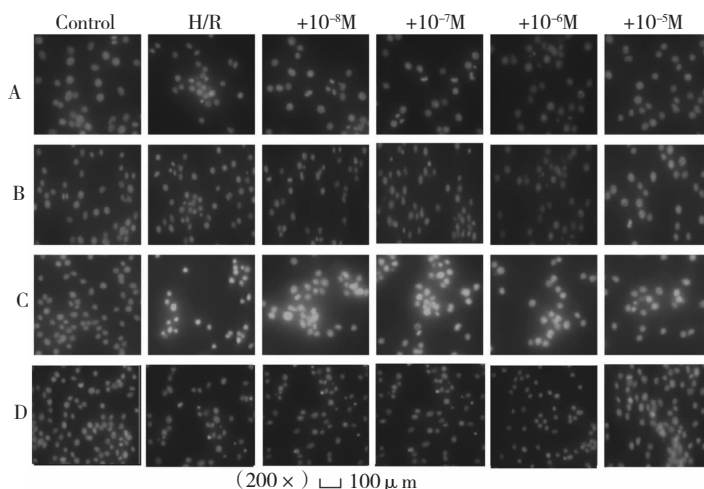


图 1 PC-12 细胞凋亡阳性细胞表达分布

Fig. 1 PC-12 cell apoptosis positive cells express distribution

注: PC-12 细胞在 24 h 低氧后, 去除低氧培养基, 恢复含有不同浓度肽的完全培养基培养 24 h。然后进行 Hoechst 染色评价凋亡水平。图 A、B、C、D 分别为化合物 1~4。H/R: 低氧复氧; +: H/R 合并使用不同药物。

Note: Within hypoxia for 24h, hypoxia culture was removed, and PC-12 cells were restored complete medium with different concentrations of peptide for 24h. Then apoptosis levels were evaluated by Hoechst staining. Fig A, B, C, D represented compounds 1 to 4, respectively. H/R: anoxic/reoxygenation; +: H/R combined with different drugs.

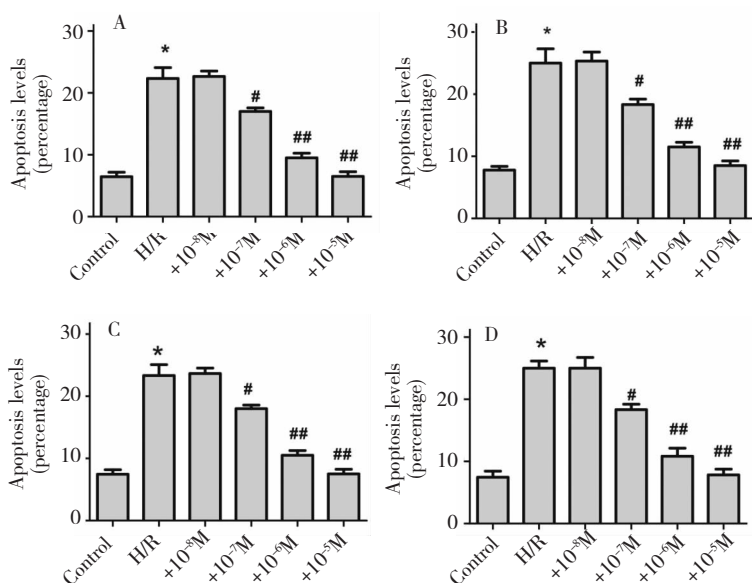


图2 化合物1~4对抗低氧/复氧诱导PC-12细胞的凋亡作用

Fig. 2 Effects of compounds 1-4 against anoxic/reoxygenation-induced PC-12 cells apoptosis

注:图A、B、C、D分别为图1中化合物1~4所对应的处理组的凋亡率。\*:与对照组相比, $P < 0.05$ ;#与H/R组相比, $P < 0.05$ ;H/R:低氧复氧;+:H/R合并使用不同药物。

Note:A,B,C,D showed the apoptosis rate of compounds 1 to 4 treatment group, respectively; \*: Compared with the control group, $P < 0.05$ ; #: Compared with the H/R group, $P < 0.05$ ;H/R: anoxic/reoxygenation; +: H/R combined with different drugs.

结果显示,低氧/复氧诱导的PC-12细胞严重损伤,染色体发生了浓缩和断裂,细胞膜结构发生起泡现象,形成凋亡小体,hoechrst染色时出现深染而发亮。兖州卷柏中分离的4个肽类化合物在低氧复氧诱导的PC-12中表现出较强的抗氧化作用(图1), $10^{-5}$ M、 $10^{-6}$ M和 $10^{-7}$ M药物浓度显著减少氧化应激带来的细胞损伤,然而, $10^{-8}$ M的浓度,并未减轻活性氧引起的细胞凋亡,可见,在 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ M该肽类化合物具有剂量依赖性的抗氧化作用(图2)。

## 5 讨论

PC-12细胞在缺氧复氧过程中会产生大量活性氧(ROS)并引起的氧化应激,诱导细胞凋亡的发生。兖州卷柏中4个肽类化合物本身含有很多易氧化的基团,容易与细胞内产生的活性氧反应,从而具有细胞保护作用。此外,该类化合物还有可能与体内氧化应激相关酶的抑制有关,但其抗氧化的保护机制还有待更深入的研究。在 $10^{-8}$ M的浓度下,并未减轻活性氧引起的细胞凋亡,其可能原因是在 $10^{-8}$ M浓度下,药物的浓度太低,被细胞跨膜吸收而发生作用的药物分子可能很少,难以呈现清除活性氧的作用。

## 参考文献

- 1 Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, *et al.* The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*, 2011, 332: 960-963.
- 2 Zou H(邹辉), Xu KP(徐康平), Tan GS(谭桂山). Advances in research on chemical constituents and pharmacological activities of Genus Selaginella. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1655-1670.
- 3 Bancrjio A, Ray R. Aurantiamides, a new class of modified dipeptides from *Piperaurantiacum*. *Phytochemistry*, 1981, 20: 2217-2219.
- 4 Liang QL(梁乔丽), Ming ZD(闵知大), Cheng L(成亮). Studies on the two dipeptides from *elephantopus scaber*. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33: 178-180.
- 5 He JB(何江波), Liu GM(刘光明), Cheng YX(程永现). Chemical constituents from *Vespae Nidus*. *Zhongcaoyao* (中草药), 2011, 42: 1905-1908.
- 6 Li Y, Li X, Kim SK, *et al.* Golmaenone, a new diketopiperazine alkaloid from the marine-derived fungus *aspergillus sp.* *Chem Pharm Bull*, 2004, 52: 375-376.