

# 箭叶淫羊藿中具有 HDAC 抑制活性的化学成分研究

胡阳亮<sup>1</sup>, 黎欢<sup>1,3</sup>, 姬贵梅<sup>1</sup>, 沈小玲<sup>1</sup>, 魏孝义<sup>2</sup>, 符林春<sup>1</sup>, 胡英杰<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广州中医药大学科技创新中心, 广州 510405;

<sup>2</sup>中国科学院华南植物园, 广州 510650; 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广州 510405

**摘要:**组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 异常活化和肿瘤发生、组织发育异常密切相关。已有选择性 HDAC 抑制剂 (HDACi) 应用于临床。本实验采用 HDACi 筛选试剂盒进行活性追踪, 从健骨中药箭叶淫羊藿 70% 醇提取物中分离得到了 11 个化合物。经质谱和核磁共振波谱分析, 化合物鉴定为槲皮素 (1)、牡荆苷 (2)、山奈酚-3-*O*- $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖苷 (3)、山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷 (4)、山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷 (5)、山奈酚-3-*O*-(6''-*O*-乙酰)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷 (6)、山奈酚-3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷 (7)、山奈酚-3-*O*-(2'',4''-双-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷 (8)、异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷 (9)、异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷 (10) 和 schizandriside (11)。化合物 2~11 系首次从该种植物中分得。化合物 1~10 都显示了强于淫羊藿苷的 HDAC 抑制活性; 化合物 3、4 和 5 显示了强于山奈酚的 HDAC 抑制活性。采用蛋白印迹法进一步观察了非毒性浓度的 3、4 和 5 对宫颈癌 HeLa 细胞内 HDAC1~11 表达的影响。结果发现: 三个化合物都能明显抑制 HDAC6 (抑制成骨) 的表达, 4 同时还明显下调 HDAC4/7 (抑制成骨) 的表达。本实验首次从箭叶淫羊藿鉴定了具有 HDAC 抑制作用的活性成分: 无异戊烯取代的黄酮苷, 特别是山奈酚-3-*O*-单糖苷 (3~5); 化合物 3~5 对 HDAC6 或 HDAC4/7 蛋白表达的抑制作用, 为将其识别为淫羊藿药材中潜在的具有山奈酚-3-*O*-单糖苷结构特征的抗骨质疏松症有效成分, 提供了实验依据。

**关键词:**箭叶淫羊藿; 组蛋白去乙酰化酶; 抑制剂; 宫颈癌细胞; 蛋白印迹法

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)10-1681-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.10.007

## Chemical constituents with HDAC inhibitory effects from *Epimedium sagittatum*

HU Yang-liang<sup>1</sup>, LI Huan<sup>1,3</sup>, JI Gui-mei<sup>1</sup>, SHEN Xiao-ling<sup>1</sup>, WEI Xiao-yi<sup>2</sup>, FU Lin-chun<sup>1</sup>, HU Ying-jie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

<sup>2</sup>South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

<sup>3</sup>Research Center of Lingnan Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

**Abstract:** Abnormal activation of histone deacetylases (HDACs) is associated with tumorigenesis and/or tissue dysplasia. Some HDAC inhibitors have been developed and used in clinical practice. In this study, eleven compounds from the 70% ethanol extract of *Epimedium sagittatum*, a Chinese herbal medicine with bone strengthening effect, were obtained under the guidance of bioassays using the HDAC inhibitor screening kits. Based on the analyses of NMR and MS data, chemical structures of these compounds were identified as quercetin (1), vitexin (2), kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (3), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (4), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (5), kaempferol-3-*O*-(6''-*O*-acetyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (6), kaempferol-3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (7), kaempferol-3-*O*-(2'',4''-di-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside (8), isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (9), isorhamnetin-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (10), and schizandriside (11). Among them, 2-11 were natural products identified from this plant for the first time; 1-10 exhibited stronger than icariin the activities in inhibiting HDAC; and 3-5 exhibited stronger than kaempferol the activities in inhibiting HDAC. Effects of 3-5 on the expression of HDAC1-11 in HeLa cells were further investigated by Western blotting. It was found that, all of the three compounds strongly inhibited the expression of HDAC6, and 4 also inhibited the expression of HDAC4/7.

收稿日期: 2021-01-13 接受日期: 2021-07-23

基金项目: 国家科技重大专项 (2014ZX10005002)

\* 通信作者 E-mail: yingjiehu@gzucm.edu.cn

HDAC4,6 and 7 are repressors of osteoblast differentiation and bone formation. In summary, our data revealed for the first time the components from *Epimedium sagittatum* that have HDAC inhibitory activities; isopentene-free flavonoids, especially kaempferol-3-*O*-monoglycosides (3-5). The results that compounds 3-5 inhibited the expression of HDAC6 and/or HDAC4/7 provided preliminary experimental evidences to identify those compounds a structurally characteristic of kaempferol-3-*O*-monoglycoside as potential anti-osteoporotic constituents in Herba Epimedii.

**Key words:** *Epimedium sagittatum*; histone deacetylase; inhibitor; HeLa cells; Western blotting

在真核细胞内,组蛋白去乙酰化酶(HDACs)通过移除核心组蛋白赖氨酸残基上的乙酰基使组蛋白恢复正电性,从而与带负电荷的DNA紧密结合形成结构致密的染色质,抑制特定基因的转录。HDACs异常活化和肿瘤发生、组织发育异常等疾病密切相关。已有开发的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi)应用于临床。例如,伏立诺他(SAHA)和Romidpsin已成为皮肤和外周淋巴细胞瘤治疗药物<sup>[1-3]</sup>。HDAC抑制剂结构各异,既有短链脂肪酸类的丁酸、曲古菌素A(trichostatin A),环肽类的romidepsin,也包括黄酮类的染料木素、山奈酚,是新药发现的一个热点<sup>[4,5]</sup>。淫羊藿是一种补肾健骨中药,有强肌健骨、抗风湿、增进肝肾等功效<sup>[6]</sup>;药理研究揭示了淫羊藿药材在增强性功能、调节激素、调节免疫、防治骨质疏松症等方面的作用<sup>[7,8]</sup>。淫羊藿药材含有140余种不同类型的黄酮类成分<sup>[9-11]</sup>,但罕有基于HDAC抑制机制研究淫羊藿抗骨质疏松活性成分的研究报道<sup>[4,9]</sup>。本文报道我们在活性示踪指导下对箭叶淫羊藿HDAC抑制活性成分筛选和鉴定的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

中药对照品:淫羊藿苷(批号110737-200415)和山奈酚(批号110861-200405)(中国药品生物制品鉴定所)。植物样品:采于四川省绵阳,由广州中医药大学胡英杰研究员鉴定为箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum*(Sieb. Et Zucc.) Maxim,标本存于广州中医药大学科技创新中心中药新药发现实验室,编号YYH No. 15)。色谱材料:GF254薄层(10~40 μm)硅胶预制板、柱层析硅胶(200~300目)(青岛海洋化工厂);D101大孔吸附树脂(河北沧州树脂厂);Sephadex LH-20葡聚糖凝胶(50 μm)(美国GE Healthcare公司);色谱纯溶剂(美国默克公司);分析纯溶剂(国产)。TLC显色剂:6%香草醛乙醇溶液与12%高氯酸水溶液等体积混匀后喷雾、加热。生物活性分析材料:HDAC抑制剂筛选试剂盒(货号K340-100)、HDAC1、HDAC2和HDAC11一抗(美国

Biovision公司);RIPA裂解缓冲液和BCA蛋白分析试剂盒(上海碧云天);CCK-8细胞计数试剂盒(日本同仁化学),RPMI 1640培养基(以色列BI公司)。南美来源小牛血清(美国Gibco公司);HDAC3~10、辣根过氧化物酶-缀合二抗(羊抗兔或鼠IgG H&L)(美国Abcam公司);GAPDH和β-actin的一抗(北京中山金桥生物科技公司)。

### 1.2 主要仪器

DRX-400核磁共振仪(德国布鲁克公司),C506-Triple TOF 5600 System质谱仪(美国AB SCIEX公司),LC6000制备HPLC仪(北京创新通恒科技公司)和配置DAD检测器与Phenomenex ODS柱(Luna,250 mm × 4.6 mm,5 μm)的1260HPLC仪(美国安捷伦公司),C-DiGit化学发光成像仪和BioTek的Synergy HT多功能酶标仪(美国Li-Cor公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 提取与成分分离

箭叶淫羊藿叶干燥粗粉(2.0 kg)用70%乙醇回流提取3次,提取液减压蒸除溶剂得醇提物稠膏。将稠膏加水悬浮,依次用石油醚(PE)、二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)、乙酸乙酯(EtOAc)和正丁醇(n-BuOH)充分萃取,萃取液减压蒸干得各溶剂部位:14.8 g(PE)、21.6 g(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)、25.4 g(EtOAc)和76.4 g(n-BuOH)。取EtOAc部位(17.4 g)经D101大孔吸附树脂柱吸附,以含乙醇0、20%、40%、60%、80%和95%(V/V)的水溶液依次洗脱,得水洗脱部位1.16 g,20%、40%、60%、80%和95%乙醇洗脱部位1.75、5.57、4.68、0.94和1.11 g。取60%乙醇洗脱部位4.6 g进行柱层析分离纯化:依次经过200~300目硅胶柱层析、氯仿-甲醇(95:5→7:3)洗脱;C-18烷化硅胶反相层析、甲醇-水(5:5→8:2)洗脱;制备高效液相色谱柱层析、乙腈-水-甲酸(20:80:0.1→30:70:0.1)洗脱;以及Sephadex LH-20葡聚糖凝胶柱层析、甲醇洗脱,获得化合物1(9.8 mg)、3(4.0 mg)、4(5.1 mg)、5(40.6 mg)、6(6.4 mg)、7(5.1 mg)、8(5.2 mg)、9(8.2 mg)和10(4.3 mg)。

40% 乙醇洗脱物 5.5 g 依次进行 C-18 烷化硅胶反相层析、甲醇-水(3:7→7:3)洗脱,以及 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱层析、甲醇洗脱,获得化合物 **11**(5 mg)和 **2**(6.1 mg)。

### 1.3.2 HDAC 酶抑制活性的筛选评价

将待测试样品溶于 DMSO 制成储备液(储备液浓度:提取物,20 mg/mL;化合物,20 mM),于-20 °C 保存备用。PE 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 部位不溶于 DMSO,未进行 HDAC 活性实验。活性测定时,取储备液加超纯水稀释至设定浓度,用 HDAC 抑制剂药物筛选试剂盒按手册说明操作进行测定<sup>[12]</sup>。基本原理:试剂盒所含 HDAC 底物有一条乙酰化赖氨酸侧链,当其被 HDAC 去乙酰后,赖氨酸侧链与赖氨酸显色剂反应产生荧光团而被检测到;用检测的荧光强度反映 HDAC 的酶活性,而 HDACi 可抑制去乙酰化反应产生的荧光。实验以试剂盒提供的曲古霉素 A 为 HDACi 阳性对照,每个测试药物浓度设置两个复孔。70% 乙醇提取物设定工作浓度为 1.0、0.5 和 0.25 mg/mL;EtOAc 或 n-BuOH 部位设定工作浓度为 400、200 和 100 μg/mL。分别检测对 HDAC 活性的抑制率。

### 1.3.3 活性部位分离得到的化合物对宫颈癌 HeLa 细胞活力的影响

人宫颈癌 HeLa 细胞系(源于美国 ATCC)由纽

约州立大学上州医科大学黄英教授所赠<sup>[13]</sup>,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和相对湿度下用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养。培养至对数生长期时按照每孔 5 000 个的密度将细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 使贴壁。更换培养液为含不同浓度样品的新鲜培养液继续培养。实验中每个药物浓度组设 3 复孔,同时设细胞空白与样品空白组。共孵育 48 h 后照 CCK-8 试剂盒手册检测细胞活力。重复实验三次,结果以均值 ± 标准偏差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

### 1.3.4 活性部位分离得到的化合物对 HeLa 细胞表达 HDAC 的影响

将 10 mL 密度为  $5 \times 10^4$  细胞/mL 的 HeLa 细胞悬液置于 10 cm 培养皿培养 24 h,使贴壁。更换培养液为含有不同浓度测试样品的新鲜培养液,继续培养 24 h。收集细胞,加入 RIPA 裂解缓冲液使细胞裂解,提取总蛋白,并用 BCA 蛋白定量试剂盒定量。取 30 μg 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,100V 下移至 PVDF 膜。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封膜后,加 5% 脱脂奶粉-TBST 稀释的一抗(稀释倍数见表 1),4 °C 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,加 3% 脱脂奶 TBST 稀释的二抗(稀释倍数见表 1),室温摇床孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,C-DiGit 化学发光成像仪记录图像。

表 1 抗体稀释倍数

Table 1 Dilution ratios for the antibody

抗体 Antibody	稀释倍数 Dilution ratio	抗体 Antibody	稀释倍数 Dilution ratio
Anti-HDAC1	1:1 000	Anti-HDAC9	1:5 000
Anti-HDAC2	1:1 000	Anti-HDAC10	1:500
Anti-HDAC3	1:5 000	Anti-HDAC11	1:1 000
Anti-HDAC4	1:5 000	β-actin	1:10 000
Anti-HDAC5	1:1 000	GADPH	1:10 000
Anti-HDAC6	1:1 000	Goat-Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	1:20 000
Anti-HDAC7	1:1 000	Goat-Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	1:10 000
Anti-HDAC8	1:50 000		

## 2 实验结果

### 2.1 箭叶淫羊藿 70% 乙醇提取物及其溶剂部位的 HDAC 抑制活性

用 HDAC 抑制剂筛选试剂盒测试了箭叶淫羊藿 70% 乙醇提取物对 HDAC 活性的抑制效果,发现其在 0.25 ~ 1.0 mg/mL 工作浓度时对 HDAC 活性

的抑制率为 36.0% ~ 73.9%,抑制作用具有剂量依赖性(见表 2)。为了进一步富集其活性成分,将 70% 乙醇提取物分成了不同的溶剂提取部位。其中,EtOAc 部位和 n-BuOH 部位的水溶性相对较好,可采用 HDAC 抑制剂筛选试剂盒进行 HDAC 抑制活性评价。评价结果显示,EtOAc 部位在 100 ~ 400

$\mu\text{g/mL}$  工作浓度下对 HDAC 活性的抑制率是 24.3% ~ 58.9%, 抑制效果强于相同浓度的 n-BuOH 部位(抑制率 18.5% ~ 42.0%) (见图 1A), 因此选择 EtOAc 部位做进一步活性成分富集。EtOAc 部位经 D101 大孔树脂柱处理得到不同浓度的乙醇洗脱物。测试了这些洗脱物对 HDAC 活性的抑制率, 结果见图 1B。在 50 ~ 200  $\mu\text{g/mL}$  浓度下, 40% 和

60% 乙醇洗脱物的 HDAC 抑制率为 15% ~ 34%, 高于 80% 和 20% 乙醇洗脱物的抑制率(15% ~ 22%); 水和 95% EtOH 洗脱物对 HDAC 无活性。因此, 选取大孔树脂 40% 和 60% 乙醇洗脱物作为富含 HDAC 抑制活性成分的有效部位并进行活性成分鉴定和评价。

表 2 箭叶淫羊藿 70% 乙醇提取物 (EE-70) 对 HDAC 活性的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of the 70% ethanol extract of *E. sagittatum* (EE-70) on HDAC activity

样品 Sample	浓度 Concentration	HDAC 活性抑制率 Inhibitory rate to HDAC activity (%)
EE-70	1.00 mg/mL	73.9
	0.50 mg/mL	55.2
	0.25 mg/mL	36.0
曲古菌素 A Trichostatin A *	20 $\mu\text{M}$	77.4

注: \* 阳性对照品。Note: \* Positive control.

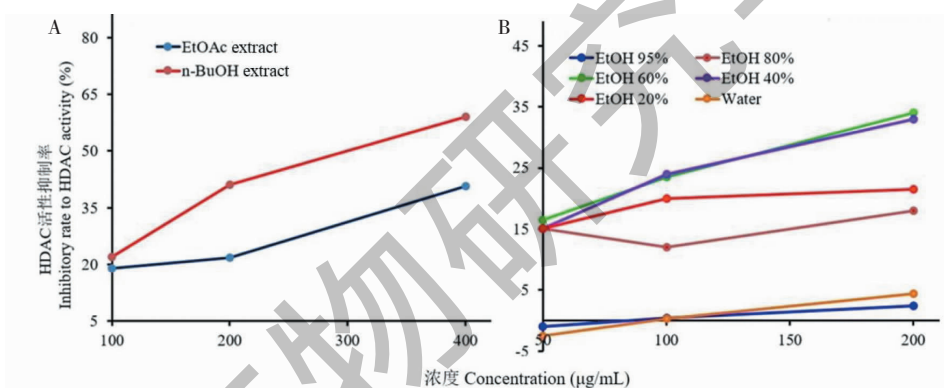


图 1 箭叶淫羊藿提取物不同溶剂萃取部位 (A)、EtOAc 萃取部位的 D101 柱不同洗脱物 (B) 对 HDAC 活性的抑制作用

Fig. 1 HDAC Inhibitory effects of different solvent fractions of 70% ethanol extract of *E. sagittatum* (A) and the solvent eluates from D101 column of the EtOAc fraction (B)

## 2.2 从 HDAC-抑制活性部位分离到的单体成分的鉴定

化合物 **1** ~ **10** 皆为黄色粉末, 盐酸-镁粉反应均呈阳性, 推测为黄酮类化合物。将它们的 NMR 和 MS 数据与文献数据进行对比分析, 分别鉴定为: 槲皮素(**1**)、牡荆苷(**2**)、山奈酚-3-*O*- $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖苷(**3**)、山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷(**4**)、山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(**5**)、山奈酚-3-*O*-(6''-*O*-乙酰)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(**6**)、山奈酚-3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(**7**)、山奈酚-3-*O*-(2'',4''-双-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(**8**)、异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖苷(**9**)和异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷(**10**)。

化合物 **1** TLC 斑点的显色和  $R_f$  值与槲皮素对照品相一致; ESI-MS:  $m/z$  303.7  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.50 (1H, s, 5-OH), 7.67 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.0$  Hz, H-6'), 6.88 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-5'), 6.40 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.18 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 175.8 (C-4), 163.9 (C-7), 160.7 (C-5), 156.1 (C-9), 147.9 (C-3'), 146.7 (C-2), 145.0 (C-4'), 135.7 (C-3, -5'), 121.9 (C-1'), 115.6 (C-6'), 115.0 (C-2'), 102.9 (C-10), 98.2 (C-6), 93.3 (C-8)。以上数据和文献<sup>[14]</sup>报道一致, 故鉴定为槲皮素。

化合物 **2** 根据 ESI-MS:  $m/z$  455.1  $[\text{M} +$

$\text{Na}]^+$ , 433.5  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 431.2  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ ; 结合不饱和度为 12 推测该化合物为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 13.18 (1H, s, 5-OH), 8.03 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-3', 5'), 6.78 (1H, s, H-3), 6.27 (1H, s, H-6), 4.68 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-1''), 3.84 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-2''), 3.70 (2H, m, H-6'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 181.9 (C-4), 163.7 (C-2), 162.7 (C-7), 161.0 (C-5), 160.2 (C-4'), 155.8 (C-9), 128.8 (C-2', 6'), 121.4 (C-1'), 115.6 (C-3', 5'), 104.4 (C-8), 103.7 (C-10), 102.2 (C-3), 98.0 (C-6), 81.7 (C-5''), 78.5 (C-2''), 73.2 (C-1''), 70.7 (C-3''), 70.3 (C-4''), 61.1 (C-6''). 以上数据和文献<sup>[15]</sup>报道一致, 故鉴定为牡荆苷。

**化合物 3** 根据 ESI-MS:  $m/z$  441.4  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 457.1  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 859.3  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ , 417.0  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ ; 结合不饱和度为 12 推测其为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.55 (1H, s, 5-OH), 8.03 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-3', H-5'), 6.26 (1H, br s, H-8), 6.04 (1H, br s, H-6), 5.30 (1H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-1'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 176.8 (C-4), 168.4 (C-7), 161.2 (C-5), 160.4 (C-4'), 156.7 (C-9), 155.3 (C-2), 133.2 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 120.6 (C-1'), 115.3 (C-3', 5'), 102.4 (C-10), 101.4 (C-1''), 99.9 (C-6), 93.9 (C-8), 71.7 (C-2''), 70.8 (C-3''), 66.1 (C-4''), 64.3 (C-5''). 以上数据和文献<sup>[16]</sup>报道一致, 故鉴定为山奈酚-3-*O*- $\alpha$ -*L*-阿拉伯吡喃糖苷。

**化合物 4** 根据 ESI-MS:  $m/z$  441.5  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 457.3  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 859.3  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ , 417.5  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ ; 结合不饱和度为 12 推测其为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 8.03 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3', 5'), 6.44 (1H, br s, H-8), 6.20 (1H, br s, H-6), 5.34 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 177.3 (C-4), 164.7 (C-7), 161.2 (C-5), 160.1 (C-4'), 156.4 (C-9), 156.1 (C-2), 133.2 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 120.7 (C-1'), 115.3 (C-3', 5'), 103.8 (C-10), 101.7 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 75.8 (C-3''), 73.7 (C-2''), 69.4 (C-4''), 65.9

(C-5''). 以上数据和文献<sup>[17]</sup>报道一致, 故鉴定为山奈酚-3-*O*- $\beta$ -*D*-木吡喃糖苷。

**化合物 5** 根据 ESI-MS:  $m/z$  471.2  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 487.2  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 447.1  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ ; 结合不饱和度为 12 推测其为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 8.02 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-3', 5'), 6.43 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), 6.20 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-6), 5.47 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1'');  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 177.5 (C-4), 164.6 (C-7), 161.2 (C-5), 160.0 (C-4'), 156.4 (C-2), 156.2 (C-9), 133.1 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 120.9 (C-1'), 115.2 (C-3', 5'), 103.9 (C-10), 100.9 (C-1''), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 77.5 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.2 (C-2''), 69.9 (C-4''), 60.8 (C-6''). 以上数据和文献<sup>[18,19]</sup>报道一致, 故鉴定为山奈酚-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

**化合物 6** 根据 ESI-MS:  $m/z$  513.2  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 529.4  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , 489.5  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ ; 结合不饱和度为 13 推测其为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.59 (1H, s, 5-OH), 8.00 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.87 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.42 (1H, br s, H-8), 6.19 (1H, br s, H-6), 5.36 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1''), 4.10 (1H, d,  $J = 11.0$  Hz, H-6''), 3.95 (1H, dd,  $J = 11.0, 5.9$  Hz, H-6''), 2.09 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 177.2 (C-4), 169.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 165.3 (C-7), 161.1 (C-5), 160.1 (C-4'), 156.5 (C-2, 9), 133.0 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 120.7 (C-1'), 115.1 (C-3', 5'), 103.5 (C-10), 101.2 (C-1''), 99.0 (C-6), 93.8 (C-8), 76.1 (C-3''), 74.1 (C-2''), 73.9 (C-5''), 69.8 (C-4''), 62.8 (C-6''), 20.1 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )。以上数据和文献<sup>[18,20]</sup>报道一致, 故鉴定为的山奈酚-3-*O*-( $6''$ -*O*-乙酰)- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

**化合物 7** 根据 ESI-MS:  $m/z$  593.6  $[\text{M} - \text{H}]^-$  以及 NMR 数据推导出分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ ; 结合不饱和度为 18 推测其为黄酮苷;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 12.57 (1H, s, 5-OH), 7.99 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 7.37 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-2'', 6''), 7.32 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7''), 6.86 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.79 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-3''',

5<sup>m</sup>), 6.37 (1H, br s, H-8), 6.12 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8<sup>m</sup>), 6.10 (1H, br s, H-6), 5.45 (1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1<sup>n</sup>), 4.27 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, Ha-6<sup>n</sup>), 4.03 (1H, dd,  $J = 12.0, 6.3$  Hz, Hb-6<sup>n</sup>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.3 (C-4), 166.2 (C-9<sup>m</sup>), 164.8 (C-7), 161.1 (C-5), 160.0 (C-4'), 159.9 (C-4<sup>m</sup>), 156.4 (C-2), 156.3 (C-9), 144.6 (C-7<sup>m</sup>), 133.0 (C-3), 130.8 (C-2', 6'), 130.2 (C-2<sup>m</sup>, 6<sup>m</sup>), 124.9 (C-1<sup>m</sup>), 120.7 (C-1'), 115.8 (C-3<sup>m</sup>, 5<sup>m</sup>), 115.1 (C-3', 5'), 113.6 (C-8<sup>m</sup>), 103.6 (C-10), 101.0 (C-1<sup>n</sup>), 99.0 (C-6), 93.7 (C-8), 76.2 (C-3<sup>n</sup>), 74.2 (C-2<sup>n</sup>), 74.1 (C-5<sup>n</sup>), 69.9 (C-4<sup>n</sup>), 63.0 (C-6<sup>n</sup>)。以上数据和文献<sup>[19]</sup>报道一致,故鉴定为山奈酚-3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

**化合物 8** 根据 ESI-MS:  $m/z$  763.4 [M + Na]<sup>+</sup>, 779.3 [M + K]<sup>+</sup>, 739.5 [M-H]<sup>-</sup>, 以及 NMR 数据推导出分子式为 C<sub>39</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>; 结合不饱和度为 24 推测其为黄酮苷; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.58 (1H, s, 5-OH), 7.97 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 7.62 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7'''''), 7.39 (4H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2''', 6''', 2''''', 6'''''), 7.36 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-7'''), 6.86 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.80 (4H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3''', 5''', 3''''', 5'''''), 6.44 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8'''''), 6.37 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-8), 6.15 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-8'''), 6.13 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6), 5.73 (1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-1<sup>n</sup>), 5.51 (1H, t,  $J = 5.5$  Hz, H-4<sup>n</sup>), 4.92 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, H-2<sup>n</sup>), 4.30 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, Ha-6<sup>n</sup>), 4.05 (1H, dd,  $J = 12.0, 6.2$  Hz, Hb-6<sup>n</sup>), 3.57 (1H, m, H-3<sup>n</sup>), 3.53 (1H, m, H-5<sup>n</sup>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.1 (C-4), 166.1, 165.8 (C-9<sup>m</sup>, 9'''''), 164.1 (C-7), 161.0 (C-5), 160.0 (C-4'), 159.8 (C-4<sup>m</sup>, 4'''''), 156.4 (C-2), 156.3 (C-9), 145.1, 144.7 (C-7<sup>m</sup>, 7'''''), 132.5 (C-3), 130.3, 130.2 (C-2', 6', 2''', 6''', 2''''', 6'''''), 125.1, 124.9 (C-1<sup>m</sup>, 1'''''), 120.6 (C-1'), 115.7 (C-3', 5'), 115.1 (C-3''', 5''', 3''''', 5'''''), 114.2, 113.6 (C-8<sup>m</sup>, 8'''''), 103.8 (C-10), 98.7 (C-1<sup>n</sup>), 98.2 (C-6), 93.6 (C-8), 74.3 (C-3<sup>n</sup>), 73.8 (C-2<sup>n</sup>, 4<sup>n</sup>), 70.1 (C-5<sup>n</sup>), 62.7 (C-6<sup>n</sup>)。以上数据和文献<sup>[21]</sup>报道一致,故鉴定为山奈酚-3-*O*-(2'', 4''-双-*O*-(*E*)-对-香豆酰基)- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

**化合物 9** 根据 ESI-MS:  $m/z$  501.2 [M +

Na]<sup>+</sup>, 517.2 [M + K]<sup>+</sup>, 477.0 [M-H]<sup>-</sup>, 以及 NMR 数据推导出分子式为 C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub>; 结合不饱和度为 12 推测其为黄酮苷; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.6 (1H, s, 5-OH), 7.95 (1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-2'), 7.48 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.5$  Hz, H-6'), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.40 (1H, br s, H-8), 6.18 (1H, br s, H-6), 5.57 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-1<sup>n</sup>), 3.84 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.3 (C-4), 165.1 (C-7), 161.2 (C-5), 156.5 (C-9), 156.1 (C-2), 149.4 (C-4'), 146.9 (C-3'), 132.9 (C-3), 122.0 (C-6'), 121.1 (C-1'), 115.2 (C-5'), 113.5 (C-2'), 103.7 (C-10), 100.8 (C-1<sup>n</sup>), 99.0 (C-6), 93.9 (C-8), 77.5 (C-5<sup>n</sup>), 76.4 (C-3<sup>n</sup>), 74.4 (C-2<sup>n</sup>), 69.8 (C-4<sup>n</sup>), 60.6 (C-6<sup>n</sup>), 55.7 (OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[18,20]</sup>报道一致,故鉴定为异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷。

**化合物 10** 根据 ESI-MS:  $m/z$  471.2 [M + Na]<sup>+</sup>, 487.5 [M + K]<sup>+</sup>, 477.0 [M-H]<sup>-</sup>, 以及 NMR 数据推导出分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>; 结合不饱和度为 12 推测其为黄酮苷; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 12.5 (1H, s, 5-OH), 7.86 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6'), 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 6.34 (1H, br s, H-8), 6.11 (1H, br s, H-6), 5.36 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-1<sup>n</sup>), 3.83 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 177.2 (C-4), 165.1 (C-7), 161.1 (C-5), 156.4 (C-9), 156.0 (C-2), 149.6 (C-4'), 147.0 (C-3'), 132.9 (C-3), 122.2 (C-6'), 120.9 (C-1'), 115.3 (C-5'), 113.1 (C-2'), 103.6 (C-10), 101.8 (C-1<sup>n</sup>), 99.0 (C-6), 93.9 (C-8), 76.0 (C-3<sup>n</sup>), 74.0 (C-2<sup>n</sup>), 69.5 (C-4<sup>n</sup>), 66.0 (C-5<sup>n</sup>), 55.6 (OCH<sub>3</sub>)。以上数据和文献<sup>[22]</sup>报道一致,故鉴定为异鼠李素-3-*O*- $\beta$ -*D*-木吡喃糖苷。

**化合物 11** 为白色粉末; 根据 ESI-MS:  $m/z$  515.3 [M + Na]<sup>+</sup>, 531.3 [M + K]<sup>+</sup> 和 491.3 [M-H]<sup>-</sup>, 以及 NMR 数据推测分子式为 C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>10</sub>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.69 (1H, m, H-8'), 1.88 (1H, m, H-8), 2.72 (2H, m, H-7), 2.99 (1H, m, H-7'), 3.71 (6H, s, OCH<sub>3</sub> × 2), 3.91 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Ha-9'), 4.02 (1H, d,  $J = 8$  Hz, H-1<sup>n</sup>), 6.07 (1H, s, H-5), 6.47 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, H-6'), 6.60 (1H, s, H-2), 6.69 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 6.80 (1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2'), 4.42, 4.99, 4.99、

5.25、8.76 和 8.45 (各 1H, br s, OH × 6)。<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 145.5 (C-3), 147.1 (C-3'), 144.1 (C-4), 144.5 (C-4'), 132.6 (C-1), 136.9 (C-1'), 121.1 (C-6'), 127.0 (C-6), 115.5 (C-5'), 116.3 (C-5), 111.8 (C-2'), 113.9 (C-2), 62.6 (C-9), 69.6 (C-9'), 45.6 (C-7'), 44.1 (C-8'), 32.6 (C-7), 37.6 (C-8), 104.6 (C-1''), 73.4 (C-2''), 76.6 (C-3''), 67.3 (C-4''), 65.7 (C-5''), 55.5, 55.6 (OCH<sub>3</sub> × 2)。以上数据和文献<sup>[23,24]</sup>报道一致,故鉴定为 schizandriside。

### 2.3 活性部位所得成分对 HDAC 活性的抑制作用

我们检测了上述 11 个化合物以及淫羊藿药材指标成分淫羊藿苷在工作浓度为 200、100 和 50 μM 时对 HDAC 活性的抑制率。结果发现,在 200 μM 浓度下,十个黄酮类成分的 HDAC 抑制活性都高于淫羊藿苷(抑制率 15.4%),其中 5 个黄酮苷(化合物 3~6 和 9)的 HDAC 抑制率为 39.6%~54.5%,明显高于其他 5 个黄酮成分(抑制率 < 30%);木脂素 schizandriside (11) 无 HDAC 抑制活性(见表 3)。

鉴于山奈酚-3-*O*-单糖苷(3~5)显示了较好的 HDAC 抑制活性,且文献报道其苷元山奈酚为 HDAC 抑制剂<sup>[7]</sup>,我们进一步比较了这三个化合物和山奈酚在 100、50、25 μM 浓度时的 HDAC 抑制率。结果发现化合物 3、4 和 5 在 100 μM 时的 HDAC 抑制率分别为 38.7%、31.3% 和 26.5%,均高于山奈酚(抑制率 21.1%)(见表 4)。

### 2.4 山奈酚-3-*O*-单糖苷(3~5)对宫颈癌 HeLa 细胞内 HDAC 蛋白表达的抑制作用

上述结果说明测试样品可直接作用于 HDAC 从而抑制其酶活性。对 HDAC 的抑制作用还可通过抑制 HDAC 蛋白在细胞内的表达来完成。随后我们以宫颈癌细胞 HeLa 为模型测试山奈酚-3-*O*-单糖苷 3~5 对 HDAC 蛋白表达是否也具有抑制作用。首先测试了 3~5 在不同浓度下与 HeLa 细胞共孵育 48 h 时对细胞活力的影响,结果见表 5。化合物 3、4 和 5 在 100 μM 时对细胞增殖的抑制率分别是 28.0%、6.2% 和 10.5%,总体上对细胞生长的影响较弱。在此基础上测试了 100 和 50 μM 浓度的 3~5 作用于 HeLa 细胞 24 h,对细胞中 HDAC1-11(I、II 和 IV 类 HDAC)表达的影响。如图 2 所示,所有化合物对 I 类 HDAC(HDAC1/2/3/8)表达无影响,但几乎完全地抑制了 II 类 HDAC 中的 HDAC6 的表达;化合物 5 还能明显抑制 HDAC10 (II 类

表 3 化合物 1~11 对 HDAC 酶活性的抑制作用 ( $n = 2$ )

Table 3 Inhibitory effects of compounds 1-11 on HDAC activity ( $n = 2$ )

化合物 Compound	浓度 Concentration (μM)	抑制率 Inhibitory rate (%)
1	200	30.6
	100	23.2
	50	18.3
2	200	24.2
	100	13.5
	50	6.0
3	200	54.5
	100	39.6
	50	25.2
4	200	45.9
	100	31.8
	50	22.1
5	200	43.0
	100	27.6
	50	18.2
6	200	39.6
	100	25.0
	50	12.8
7	200	23.2
	100	22.0
	50	15.2
8	200	22.5
	100	7.4
	50	3.4
9	200	39.7
	100	23.3
	50	13.0
10	200	36.0
	100	19.2
	50	11.5
11	200	1.1
	100	0
	50	0
淫羊藿苷 Icarin	200	15.4
	100	14.4
	50	6.9
曲古菌素 A Trichostatin A *	20	73.1

注: \* 阳性对照品,下同。

Note: \* Positive control, the same below.

表 4 化合物 3~5 和山奈酚对 HDAC 活性的抑制作用 ( $n = 2$ )Table 4 Inhibitory rates of compounds 3-5 and kaempferol on HDAC activity ( $n = 2$ )

化合物 Compound	浓度 Concentration ( $\mu\text{M}$ )	抑制率 Inhibitory rate (%)
3	100	38.7
	50	25.3
	25	19.0
4	100	31.3
	50	23.0
	25	16.54
5	100	26.5
	50	18.3
	25	14.0
山奈酚 Kaempferol	100	21.1
	50	17.9
	25	9.9
曲古菌素 A Trichostatin A*	20	78.5

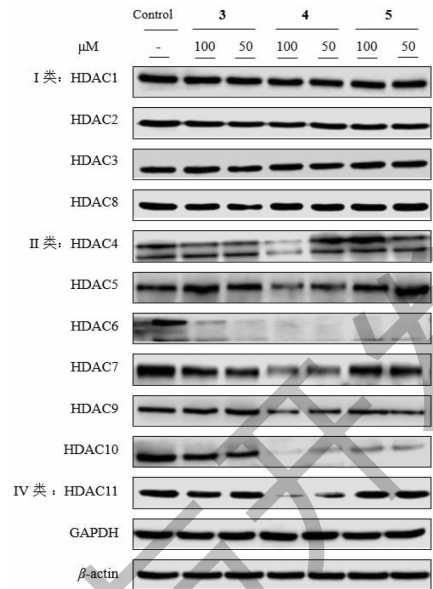
HDAC) 的表达; 化合物 4 则显著抑制所有的 II 类 HDAC (HDAC4~7、9、10) 和 IV 类 HDAC (HDAC11) 的表达, 且作用具有剂量依赖性。因此, 化合物 4 和 5 可作为新发现的 HDAC 抑制剂进行进一步研究。

表 5 山奈酚-3-*O*-单糖苷(3~5)对宫颈癌 HeLa 细胞增殖活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 5 Effects of kaempferol-3-*O*-monoglycosides (3-5) on the viability of HeLa cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物 Compound	浓度 Concentration ( $\mu\text{M}$ )	细胞活力 Cell viability (%)
3	100	71.99 $\pm$ 0.65
	50	75.44 $\pm$ 2.04
	25	81.09 $\pm$ 1.69
	12.5	81.61 $\pm$ 1.34
4	100	93.82 $\pm$ 2.21
	50	96.11 $\pm$ 3.20
	25	95.36 $\pm$ 1.80
	12.5	99.01 $\pm$ 1.88
5	100	89.49 $\pm$ 1.16
	50	91.48 $\pm$ 2.03
	25	94.41 $\pm$ 1.28
	12.5	96.30 $\pm$ 0.71

注: 不加药的细胞对照组活力设定为 100%。

Note: Viability of cells without treatment was set as 100%.

图 2 山奈酚-3-*O*-单糖苷(3~5)对宫颈癌 HeLa 细胞表达 HDAC1~11 的影响Fig. 2 Effects of kaempferol-3-*O*-monoglycosides (3-5) on the expression of HDAC1-11 in HeLa cells

### 3 讨论和结论

本实验确定了箭叶淫羊藿 70% 乙醇提取物抑制 HDAC 活性较强的溶剂部位是乙酸乙酯部位, 该部位用 D101 大孔吸附树脂处理, 40% 和 60% 乙醇洗脱物为 HDAC 抑制活性部位 (见图 1); 通过活性指导下的柱层析分离和波谱分析, 从中鉴定了 11 个化合物。其中, 非异戊烯取代的黄酮苷元 (化合物 1) 和黄酮苷 (化合物 2~10) 类成分全部显示了比淫羊藿苷更强的 HDAC 抑制活性, 说明这一类成分是该植物抑制 HDAC 活性的主要活性成分。分离到的 9 种黄酮苷中有 6 种是山奈酚-3-*O*-单糖苷, 包括得率较高的化合物 5 (山奈酚-3-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖吡喃糖苷), 说明山奈酚-3-*O*-单糖苷拥有相对较强的 HDAC 抑制活性。活性较低的化合物有 7 和 8, 由于糖基上一或两个羟基被对-香豆酸酯化, 7 和 8 的 HDAC 抑制活性低于异鼠李素-3-*O*-单糖苷 (9 和 10), 说明山奈酚-3-*O*-单糖苷糖基被对-香豆酸酯化可减弱 HDAC 抑制活性 (见表 3)。但由于 HDAC 抑制剂筛选试剂盒提供的 HDAC 提取自 HeLa 的细胞核, 是包含不同亚型 HDAC 的混合物, 箭叶淫羊藿中分到的这些黄酮成分究竟抑制的是哪一种或哪几种 HDAC 的活性 (功能) 还需进一步研究方能得知。



如前所述, HDAC 的抑制还可通过调节其在细胞内的表达达成。我们采用 HeLa 细胞进行的研究显示(见图 2), 山奈酚-3-*O*- $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖苷(3)、山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-木吡喃糖苷(4)和山奈酚-3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖(5)对 I 类 HDAC 表达无明显影响, 但能明显抑制 II 型 HDAC 中的 HDAC6(化合物 3、4 和 5)和 HDAC10(化合物 4 和 5)的蛋白表达, 是新发现的黄酮类 HDAC 蛋白表达抑制剂; 其中 4 同时抑制其他 II 类(HDAC4~7)和 IV 类(HDAC9~11) HDAC 的蛋白表达, 其作用值得深入研究。

HDAC 通过对核心组蛋白的去乙酰化从而压制特定基因的转录, 在细胞转录调控、细胞周期进程和生长发育活动等不同阶段中发挥重要作用。选择性 HDACi 可作用于过度表达的 HDAC, 使被其压制的基因得以正常表达, 从而在治疗肿瘤、关节炎、组织发育不良等疾病方面发挥作用。例如, HDAC1/2(I 型)介导 DNA 损伤修复, 在肺癌、胃癌等多种癌组织高表达。在对肿瘤进行放射性治疗时, 同时使用 HDAC1/2 的抑制剂可阻止肿瘤细胞进行 DNA 修复从而促使癌细胞发生凋亡<sup>[25]</sup>。HDAC8(I 型)和 HDAC10(II 型)的异常表达是神经母细胞瘤的进展和恶变的标志, HDAC6/8/10 抑制剂 TH34 可诱导肿瘤细胞凋亡、有丝分裂中断和细胞周期阻滞, 以此引起肿瘤细胞死亡; TH34 与维甲酸联用可产生协同效果<sup>[26]</sup>。HDAC4/6/7(II 型)的表达上调会造成成骨细胞分化过程中关键转录因子 Runx2 和 Osterix 表达下调, 从而不利于成骨细胞的形成<sup>[27]</sup>; HDAC6 基因和蛋白表达的上调也会诱导成骨细胞原纤毛变形和缩短, 纤毛细胞数量减少, 从而抑制成骨细胞的 ALP 功能, 有效阻止骨形态发生蛋白(BMP)诱导的成骨细胞成熟<sup>[28]</sup>。抑制 HDAC6 和 HDAC4 的表达或功能, 将有利于成骨细胞分化和骨形成, 保护骨密度。

本研究数据首次揭示, 箭叶淫羊藿中的山奈酚-3-*O*-单糖苷(化合物 3、4 和 5)具有明确的 HDAC 抑制剂样作用, 三者对 HDAC6 蛋白表达的抑制作用, 为将其识别为淫羊藿药材中潜在的具有山奈酚-3-*O*-单糖苷结构特征的抗骨质疏松症抗肿瘤有效成分, 提供了实验依据。

#### 参考文献

1 Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13: 673-691.

2 Zagni C, Floresta G, Monciino G, et al. The search for potent, small-molecule HDACi in cancer treatment: a decade after Vorinostat[J]. Med Res Rev, 2017, 37: 1373-1428.

3 Chan KL, van der Weyden C, Khoo C, et al. Durable clinical remission induced by romidepsin for chemotherapy-refractory peripheral T-cell lymphoma with central nervous system involvement[J]. Leuk Lymphoma, 2017, 58: 996-998.

4 Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, et al. Histone deacetylase modulators provided by mother nature[J]. Genes Nutr, 2012, 7: 357-367.

5 Berger A, Venturelli S, Kallnischkies M, et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24: 977-985.

6 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol 1(中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 273-274.

7 Xu Y, Xin H, Wu Y, et al. Effect of icariin in combination with daily sildenafil on penile atrophy and erectile dysfunction in a rat model of bilateral cavernous nerves injury[J]. Andrology, 2017, 5: 598-605.

8 Mok SK, Chen WF, Lai WP, et al. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells[J]. Br J Pharmacol, 2010, 159: 939-949.

9 Rimando MG, Wu HH, Liu YA, et al. Glucocorticoid receptor and histone deacetylase 6 mediate the differential effect of dexamethasone during osteogenesis of mesenchymal stromal cells(MSCs)[J]. Sci Rep, 2016, 6: 37371.

10 Ma H, He X, Yang Y, et al. The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134: 519-541.

11 Chen XJ, Tang ZH, Li XW, et al. Chemical constituents, quality control, and bioactivity of *Epimedium folium* (Yinyanghuo)[J]. Am J Chin Med, 2015, 43: 783-834.

12 Yao XH, Li H, Hu YL, et al. Screening of class I HDAC inhibitors from traditional Chinese medicine[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30: 1099-1104.

13 Sun Q, Liu K, Shen XL, et al. Lappal F, a novel anticancer agent isolated from plant *Arctium lappa* L[J]. Mol Cancer Ther, 2014, 13(1): 49-59.

14 Merfort I, Wendisch D. Flavonoid Glucuronides from the flowers of *Arnica montana*[J]. Planta Med, 1988, 54: 247-250.

15 Wei LB, Chen JM, Zhou GX. Polar chemical constituents from *Nervilia fordii*[J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26: 43-46.

16 Sajeli BA, Sahai M, Fujimoto Y, et al. A new kaempferol diglycoside from *Datura suaveolens* Humb. & Bonpl. ex. Willd

- [J]. Nat Prod Res, 2006, 20: 1231-1236.
- 17 Agrawal PK. Carbon-13 NMR of flavonoids [J]. Studies in Organic Chemistry, 1989, 39: 283-364.
- 18 Ma ZJ, Fujii I, Ebizuka Y, et al. 2004. Flavonoids from the seeds of *Sphaerophysa salsula* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6: 69-73.
- 19 Liang D. Studies on chemical constituents of *Lysimachia clethroides* and their bioactivities and chemical conversion [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (中国医学科学院协和医学院), 2012.
- 20 Pelter A, Ward RS, Gray TI. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds [J]. J Chem Soc Perkin 1, 1976 (23): 2475-2483.
- 21 Braguine CG, Bertanha CS, Gonçalves UO, et al. Schistosomocidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms [J]. Pharm Biol, 2012, 50: 925-929.
- 22 Khalfallah A, Berrehal D, Bensouici C, et al. Flavonoids, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Evax pygmaea* [J]. Pharm Biol, 2017, 55: 2292-2296.
- 23 Kwon JH, Kim JH, Choi SE, et al. Inhibitory effects of phenolic compounds from needles of *Pinus densiflora* on nitric oxide and PGE2 production [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33: 2011-2016.
- 24 Takami M, Ohya K, Takahashi K. Studies on constituents of medicinal plants. XXII. Constituents of *Schizandra nigra* Max [J]. Chem Pharm Bull, 1979, 27: 1422-1425.
- 25 Miller KM, Tjeertes JV, Coates J, et al. Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining [J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17: 1144-1151.
- 26 Kolbinger FR, Koeneke E, Ridinger J, et al. The HDAC6/8/10 inhibitor TH34 induces DNA damage-mediated cell death in human high-grade neuroblastoma cell lines [J]. Arch Toxicol, 2018, 92: 2649-2664.
- 27 Zhu J, Shimizu E, Zhang X, et al. EGFR signaling suppresses osteoblast differentiation and inhibits expression of master osteoblastic transcription factors Runx2 and Osterix [J]. J Cell Biochem, 2011, 112: 1749-1760.
- 28 Ehnert S, Sreekumar V, Aspera-Werz RH, et al. TGF- $\beta$  1 impairs mechanosensation of human osteoblasts via HDAC6-mediated shortening and distortion of primary cilia [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95: 653-663.

## 壳寡糖对对乙酰氨基酚所致肝损伤的保护作用及机制研究

对乙酰氨基酚 (APAP) 是一种被广泛使用的临床解热镇痛药。据估计, 欧洲和美国每年约有 2 000 人经历急性肝衰竭, 其中近 50% 的病例是由 APAP 引起的药物性肝损伤。针对 APAP 引起的肝损伤, 常用治疗药物是 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸, 但其副作用较多。壳寡糖 (COS) 由天然存在的几丁质通过化学脱盐和脱蛋白、生物酶水解等过程加工而成。据报道, COS 具有良好的抗菌、抗病毒、抗肿瘤和抗氧化特性, 并具有抗肥胖和降低胆固醇的作用。APAP 引起的肝损伤主要是 ROS 引起的氧化应激所致, COS 具有显着的抗氧化和抗炎作用。

来自广东药科大学的 Xiang Junwei 及其团队评估了具有不同平均分子量 (MW) 的 COS 对 APAP 诱导的肝损伤的保护作用和机制, 以期进一步了解 COS 的应用范围。在该研究中, Xiang 等人在体外和体内构建了 APAP 诱导的肝损伤模型以研究两种 MW 的 COS, 即 COST (MW  $\leq$  1 000 Da) 和 COSM (MW  $\leq$  3 000 Da)。结果表明, COST 和 COSM 能显著降低血清 ALT、AST 和肝脏 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平, 提高 GSH、SOD、GSH-Px 和 CAT 的水平和活性。机理研究发现 COST 和 COSM 可显著降低肝脏 CYP2E1、Keap1、p-ASK1/ASK1、p-MKK4/MKK4、p-JNK/JNK、Caspase-3 和 Bax 的表达并增加 Nrf2、HO-1、eNOS、SOD 和 Bcl-XL 的表达。COST 和 COSM 可以通过抑制 APAP 代谢, 抑制氧化损伤和细胞凋亡途径, 促进肝脏抗氧化途径的激活, 最终改善 APAP 引起的肝脏氧化损伤。相关研究发表在《Food & Function》杂志上。

胡乃华编译自: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D1FO00953B>

原文标题: Protective effect and mechanism of chitooligosaccharides on acetaminophen-induced liver injury