

# 茺蔚子中木脂素类化学成分及肝细胞保护作用研究

刘娟汝<sup>1,2</sup>,彭成<sup>1,2</sup>,何育霖<sup>1,2</sup>,彭芳<sup>1,2</sup>,蒙春旺<sup>1,2\*</sup>,熊亮<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室;

<sup>2</sup>成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所,成都 611137

**摘要:**研究茺蔚子中木脂素类化学成分及其肝细胞保护活性和作用机制。采用大孔吸附树脂、硅胶、HW-40F 凝胶柱色谱及半制备液相色谱等对茺蔚子正丁醇提取部位进行分离纯化,根据理化性质及波谱数据鉴定化合物结构。本文从茺蔚子正丁醇提取部位分离鉴定了 8 个木脂素类化合物,分别为( + )-异落叶松脂醇-9'-O-β-D-葡萄糖苷(**1**)、(-)-异落叶松脂醇-9'-O-β-D-葡萄糖苷(**2**)、马先蒿木脂素(**3**)、(-)-异落叶松脂醇-4-O-β-D-葡萄糖苷(**4**)、异落叶松脂素(**5**)、phyllanglaucin B(**6**)、(-)-7R,8S-7',8'-二羟基-二氢脱氢松柏醇-9-O-β-D-葡萄糖苷(**7**)、( + )-7S,8R-7',8'-二羟基-二氢脱氢松柏醇-9-O-β-D-葡萄糖苷(**8**),化合物**1~8** 均为首次从茺蔚子中分离得到。其次,采用 MTT 法考察化合物对对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)诱导的 HL-7702 肝细胞损伤的保护作用,结果表明化合物**1** 和**3** 可显著提高 APAP 诱导肝细胞损伤的存活率;进而,采用 Hoechst 33342 荧光染色法和 Western blot 法观察活性最好的化合物**3** 对细胞凋亡以及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的影响。结果显示,与模型组相比,化合物**3** 可使细胞核致密浓染现象变少,凋亡小体减少,同时明显促进 Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 蛋白表达,并升高 Bcl-2/Bax 比值,表明化合物**3** 的作用机制与调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量,抑制细胞凋亡有关。

**关键词:**茺蔚子;木脂素;肝细胞保护;作用机制;细胞凋亡

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)10-1699-09

DOI:10. 16333/j. 1001-6880. 2022. 10. 007

## Lignans from Leonuri Fructus and their hepatoprotective effects

LIU Juan-ru<sup>1,2</sup>, PENG Cheng<sup>1,2</sup>, HE Yu-lin<sup>1,2</sup>, PENG Fang<sup>1,2</sup>, MENG Chun-wang<sup>1,2</sup>, XIONG Liang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu

University of Traditional Chinese Medicine;<sup>2</sup> Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract:** To study the chemical constituents from Leonuri Fructus (the fruits of *Leonurus japonicus* Houtt.) and their hepatocellular protective effects and mechanisms. The chemical compounds were isolated from the n-butanol extract of Leonuri Fructus by macroporous resin, silica gel, HW-40F column chromatography, and semi-preparative HPLC. Their structures were determined by physicochemical properties and spectroscopic data. Finally, eight lignans were isolated and identified as ( + )-isolariciresinol-9'-O-β-D-glucopyranoside (**1**), (-)-isolariciresinol-9'-O-β-D-glucopyranoside (**2**), densipicoside (**3**), (-)-isolariciresinol-4-O-β-D-glucopyranoside (**4**), isolariciresinol (**5**), phyllanglaucin B (**6**), (-)-7R,8S-7',8'-dihydroxy-dihydrodehydroconiferyl alcohol-9-O-β-D-glucopyranoside (**7**), and ( + )-7S,8R-7',8'-dihydroxy-dihydrodehydroconiferyl alcohol-9-O-β-D-glucopyranoside (**8**). Compounds **1~8** were isolated from Leonuri Fructus for the first time. Next, MTT assay was used to detect the protective effects of the isolates on acetaminophen (APAP)-induced hepatocyte injury. The results showed that compounds **1** and **3** significantly improved the survival rate of HL-7702 cells injured by APAP. Furthermore, Hoechst 33342 fluorescence staining and Western blot were carried out to observe cell apoptosis in HL-7702 cells and the expression level of Bcl-2 and Bax of compound **3** which has the best hepatoprotective effects. The results showed that compound **3** reduced the nuclear density of HL-7702 cells and the numbers of apoptotic bodies, significantly promoted the expression of

收稿日期:2022-05-19 接受日期:2022-07-08

基金项目:国家自然科学基金(82022072, U19A2010);西南特色中药资源多维评价多学科交叉创新团队(ZYYCXTD-D-202209);特色中药资源多维评价与产品开发创新团队(2022C001)

\*通信作者 Tel:86-28-61800231;E-mail:mengchunw@126.com,xiling@edutcm.edu.cn

Bcl-2 while inhibited the expression of Bax, and increased the ratio of Bcl-2/Bax expression compared with model group. It indicated that compound 3 played a role in suppressing apoptosis in HL-7702 cells by regulating the expression of Bcl-2 and Bax proteins.

**Key words:** the fruits of *Leonurus japonicus*; lignans; hepatoprotective effect; mechanism; cell apoptosis

茺蔚子(Leonuri Fructus)来源于唇形科植物益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.)的干燥成熟果实,功善活血调经、清肝明目<sup>[1]</sup>,始载于《神农本草经》:“味辛、微温。主明目益精,除水气”,药用历史悠久。益母草和茺蔚子是同一植物不同入药部位的两味中药,传统功效亦有异同,《本草纲目》对两味中药的功能主治有所区分:“益母草行血养血……诚为血家之圣药也。茺蔚子治妇女经脉不调,胎产,一切血气诸病妙也。其根茎花叶,并皆入药,可同用。若治手、足厥阴血分风热,清泻肝热,明目益精,调女人经脉,则单用茺蔚子为良。若治肿毒疮疡,消水行血,妇人胎产诸病,则宜并用为良……”<sup>[2]</sup>。由此可知,益母草及茺蔚子均有活血化瘀之功,但前者长于活血化瘀,后者长于清肝明目。然而,目前对茺蔚子研究的广度及深度远不及益母草,化学研究发现,益母草中已分离鉴定300余个化学成分,且有较多文献阐释了其在舒张血管、抗血小板聚集、调节子宫平滑肌等方面的药理作用和作用机制<sup>[3-5]</sup>,而茺蔚子中报道的化合物不足70个,主要成分类型为三萜、环肽、黄酮、甾醇、苯丙素、木脂素及生物碱等<sup>[6,7]</sup>。现代药理研究表明,茺蔚子具有收缩子宫<sup>[8]</sup>、肝细胞保护<sup>[9]</sup>、抑制酪氨酸酶和乙酰胆碱酯酶活性<sup>[10]</sup>、抗癌<sup>[11]</sup>、抗炎<sup>[12]</sup>、神经保护<sup>[13]</sup>等作用,然而,大多药理研究仅停留在提取物的药效层面,单体成分的药效及机制研究较少。课题组在前期研究中发现,茺蔚子中的四氢呋喃木脂素类化合物具有显著的肝细胞保护活性<sup>[9]</sup>,并通过荧光染色、Western blot等手段探索了可能的作用机制。因此,为进一步研究茺蔚子中具有肝保护作用的活性成分,本研究运用多种色谱手段和波谱技术从茺蔚子正丁醇部位又分离鉴定8个木脂素类化合物,进而通过MTT、Hoechst 33342 荧光染色和Western blot技术,表征化合物的肝细胞损伤保护作用及作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

Burker-AVIIHD-600型核磁共振波谱仪(德国Bruker公司);Synapt G<sub>2</sub>HDMS型高分辨质谱仪(美国Waters公司);Agilent 1220型半制备型高效液相

色谱仪(美国Agilent公司);Ultimate XB-C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm × 10 mm, 5 μm;上海月旭科技股份有限公司);DMI3000B 荧光显微镜(德国Leica公司);Multiskan MK3酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);Tanon 5200 显影仪(上海天能科技有限公司)。D101 大孔吸附树脂(安徽三星树脂科技有限公司);柱层析硅胶(青岛海洋硅胶干燥剂厂);GF254 硅胶制备薄层(烟台江友硅胶开发有限公司);HW-40F(日本TOSOH公司)。

### 1.2 药材与试剂

茺蔚子药材于2016年9月购自四川省成都市荷花池药材市场,由成都中医药大学中药鉴定教研室高继海副教授鉴定为益母草(*Leonurus japonicus* Houtt.)的干燥成熟果实,标本(SCWZ-0917)现存于成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所。HL-7702人正常肝细胞(美国博士德生物科技有限公司,批号:CX0157);Gibco DMEM(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:8121052);胰蛋白酶(Solarbio公司,批号:9100041);新生牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:20100201);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH = 7.8)、辣根酶标记山羊抗体IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司);蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所);Anti-Bcl-2抗体、Anti-Bax抗体(英国Abcam公司);Anti-β-actin(美国Gene Tex公司);Hoechst 33342染色液(上海碧云天生物技术有限公司);Omni-ECLTM超灵敏化学发光检测试剂盒(上海雅伦生物科技有限公司)。甲醇、乙醇等分析纯试剂均购于成都科龙化工试剂厂;色谱甲醇(美国Sigma公司);氘代甲醇(CD<sub>3</sub>OD,美国剑桥CIL(同位素标准品)公司);对乙酰氨基酚(APAP,成都克洛玛生物科技有限公司,批号:CHB210112);噻唑蓝(MTT,北京金泰宏达生物科技有限公司,批号:EZ6789A155)。

### 1.3 提取与分离

称取60 kg茺蔚子药材,加入8倍量体积的70%乙醇,回流提取3次,每次2 h。合并提取液,减压浓缩,得乙醇浸膏(3.5 kg)。将浸膏分散于热水

中,依次采用乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到莞蔚子乙酸乙酯部位(0.9 kg)和正丁醇部位(1.8 kg)。取正丁醇部位,采用 D-101 大孔吸附树脂柱进行分离纯化,依次用 10%、30%、50%、70%、95% 乙醇溶液进行梯度洗脱,回收溶剂后得到 5 个洗脱部分( $F_1 \sim F_5$ )。

采用含 1% NaOH 的硅胶填料对  $F_2$  进行柱色谱分离,用二氯甲烷-甲醇(50:1→0:1)溶液进行梯度洗脱,洗脱液经薄层色谱检测,合并相似流分,回收溶剂得到 17 个组分( $F_{2-1} \sim F_{2-17}$ )。 $F_{2-14}$  经阳离子交换树脂柱色谱(纯水、80% 乙醇、80% 氨水乙醇)进行梯度洗脱,取 80% 氨水乙醇洗脱部位,再采用 HW-40F 凝胶柱色谱(90% 甲醇-水)进行分离,得到 4 个部分( $F_{2-14-1} \sim F_{2-14-4}$ )。 $F_{2-14-3}$  再经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇-水(50:1:0→3:2:0.25)进行梯度洗脱,得到 6 个部分( $F_{2-14-3A} \sim F_{2-14-3F}$ )。其中, $F_{2-14-3F}$  经反相半制备液相色谱(28% 甲醇-水)分离,得到化合物 2(2.6 mg,  $t_R = 75$  min) 和化合物 4(2.8 mg,  $t_R = 68$  min)。 $F_{2-15}$  通过反相中压液相色谱分离,以甲醇-水(5%→100%)溶液进行梯度洗脱,得到 17 个部分( $F_{2-15-1} \sim F_{2-15-17}$ )。 $F_{2-15-9}$  经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇-水(50:1:0→3:2:0.25)进行梯度洗脱,再经反相半制备液相色谱(38% 甲醇-水)分离,得到化合物 1(6.0 mg,  $t_R = 62$  min)。 $F_{2-15-14}$  经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇-水(50:1:0→3:2:0.25)进行梯度洗脱,再经反相半制备液相色谱(35% 甲醇-水)分离,得到化合物 3(2.0 mg,  $t_R = 46$  min)。

采用硅胶柱色谱对  $F_3$  进行分离,用二氯甲烷-甲醇(100:1→0:1)进行梯度洗脱,共得到 18 个洗脱部分( $F_{3-1} \sim F_{3-18}$ )。取  $F_{3-12}$  经反相 C<sub>18</sub> 减压色谱柱分离,以甲醇-水(10%→100%)进行梯度洗脱,得到 6 个部分( $F_{3-12-1} \sim F_{3-12-6}$ )。其中, $F_{3-12-1}$  经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇(50:1→0:1)进行梯度洗脱,得到 10 个部分( $F_{3-12-1A} \sim F_{3-12-1J}$ )。 $F_{3-12-1G}$  经反相半制备液相色谱(42% 甲醇-水)制备得到化合物 6(0.4 mg,  $t_R = 40$  min)。 $F_{3-12-1J}$  经反相半制备液相色谱(35% 甲醇-水)进行制备,得到化合物 5(3.4 mg,  $t_R = 70$  min)。取  $F_{3-17}$  经反相中压色谱分离,以甲醇-水梯度洗脱(10%→100%),得到 12 个部分( $F_{3-17-1} \sim F_{3-17-12}$ )。 $F_{3-17-11}$  经硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-甲醇溶液(50:1→0:1)进行梯度洗脱,再经半制备液相色谱(36% 甲醇-水)洗脱,分别得到化合物

7(0.9 mg,  $t_R = 17$  min) 和 8(2.0 mg,  $t_R = 33$  min)。

## 1.4 肝细胞保护活性筛选及作用机制研究

### 1.4.1 肝细胞保护活性筛选

采用 MTT 法检测化合物 1~8 对 APAP 诱导的人正常肝细胞 HL-7702 损伤的保护作用。HL-7702 细胞用含 1% 青霉素-链霉素和 10% 灭活新生牛血清的 DMEM 完全培养基培养。取对数生长期的细胞株悬液,每孔 100 μL 接种至 96 孔板(约  $3 \times 10^3$  个细胞/孔),置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 空气培养箱中培育。待细胞贴壁后,分为空白组、模型组和给药组,每个组设 3 个复孔。空白组为含 1% 新生牛血清的 DMEM;模型组采用 30 mmol/L APAP 造模 4 h;给药组经 30 mmol/L APAP 诱导损伤 4 h 后,分别加入浓度为 50、25、12.5、6.25、3.13、1.5 μmol/L 的待测化合物。继续孵育 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,继续孵育 4 h 后移除上清液,向每孔加入 DMSO 180 μL,震荡混匀,酶标仪测定各组在 490 nm 的吸光度值(OD)。

细胞保护率 = ( $OD_{\text{给药}} - OD_{\text{模型}}$ ) / ( $OD_{\text{空白}} - OD_{\text{模型}}$ ) × 100%, 并由此得出 EC<sub>50</sub> 值(EC<sub>50</sub> 是细胞保护率为 50% 时的化合物浓度)。

### 1.4.2 凋亡实验

取对数生长期的 HL-7702 细胞株悬液,每孔 2 mL 接种至 6 孔板(约  $3 \times 10^3$  个细胞/孔),置于培养箱中培养,分组给药,空白组和模型组同“1.4.1”;给药组经 30 mmol/L APAP 造模 4 h 后,移去上清液,加入浓度为 20、10、5、2 μmol/L 的化合物 3。继续孵育 24 h 后弃去上清液,PBS 清洗 2 次,再加入 Hoechst 33342 染色液(用 PBS 稀释 1000 倍)50 μL/孔,避光染色 15 min。弃去染色液,PBS 清洗 3 次,于倒置显微镜下观察并拍摄细胞和荧光细胞核图片。

### 1.4.3 Western blot 检测对凋亡关键蛋白表达的影响

取“1.4.2”项下细胞,弃去上清液,用 PBS 清洗 3 次,收集细胞,加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min,用细胞刮刮下各孔内细胞,粉碎细胞 2 min,于 4 °C 离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取少量上清液,用考马斯亮蓝法测定细胞蛋白浓度。剩余上清液经变性处理,用 10% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶、5% 浓缩胶分离蛋白,转膜,再用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h。一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,TBST 洗 3 次。二抗(1:5 000)37 °C 孵育 1 h,TBST 清洗 3 次,显影拍照,并对蛋白条带进行灰度分析。

## 2 结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{20} +62.5$  (*c* 0.05, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  545.2 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.79 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.65 (1H, s, H-2), 6.64 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-6'), 6.18 (1H, s, H-5), 4.12 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1''), 4.09 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-7'), 4.06 (1H, dd, *J* = 10.2, 2.4 Hz, H-9'a), 3.83 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.4 Hz, H-6''a), 3.81 (s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (1H, dd, *J* = 10.8, 3.6 Hz, H-9a), 3.72 (1H, dd, *J* = 10.8, 6.0 Hz, H-9b), 3.64 (1H, dd, *J* = 12.0, 5.4 Hz, H-6''b), 3.34 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-3''), 3.27 (1H, t, *J* = 9.0 Hz, H-4''), 3.23 (1H, dd, *J* = 10.2, 3.0 Hz, H-9'b), 3.21 ~ 3.17 (2H, m, H-2'', 5''), 2.84 (1H, dd, *J* = 16.2, 10.2 Hz, H-7a), 2.80 (1H, dd, *J* = 16.2, 6.0 Hz, H-7b), 2.10 (1H, m, H-8), 1.88 (1H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 129.1 (C-1), 112.4 (C-2), 147.1 (C-3), 145.8 (C-4), 117.4 (C-5), 134.4 (C-6), 33.9 (C-7), 39.5 (C-8), 65.2 (C-9), 138.7 (C-1''), 114.3 (C-2''), 148.9 (C-3''), 145.1 (C-4''), 116.1 (C-5''), 123.1 (C-6''), 47.9 (C-7''), 45.9 (C-8''), 69.4 (C-9''), 105.2 (C-1''), 75.2 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.7 (C-4''), 77.9 (C-5''), 62.8 (C-6''), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为(+)-异落叶松脂醇-9'-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

**化合物 2** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{20} -36.6$  (*c* 0.13, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  545.2 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.74 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 6.65 (1H, s, H-2), 6.65 (1H, dd, *J* = 9.6, 2.4 Hz, H-6'), 6.18 (1H, s, H-5), 4.05 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-1''), 3.84 (H, m, H-7'), 3.81 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (1H, overlapped, H-6''a), 3.76 ~ 3.66 (4H, m, H-9, 9'), 3.64 (1H, m, H-6''b), 3.32 (1H, overlapped, H-3''), 3.27 (1H, t, *J* = 10.8, H-4''), 3.27 (1H, t, *J* = 10.8, H-5''), 3.16 (1H, t, *J* = 9.0, H-2''), 2.89 (1H, dd, *J* = 19.2, 12.0 Hz, H-7a), 2.75 (1H, dd, *J* = 19.2, 3.6 Hz, H-7b), 1.97 (2H, m, H-8, 8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 129.2

(C-1), 112.3 (C-2), 147.3 (C-3), 146.0 (C-4), 117.4 (C-5), 133.7 (C-6), 33.6 (C-7), 41.1 (C-8), 65.5 (C-9), 138.8 (C-1''), 114.0 (C-2''), 149.0 (C-3''), 145.3 (C-4''), 116.0 (C-5''), 123.5 (C-6''), 49.0 (C-7''), 45.3 (C-8''), 70.8 (C-9''), 103.8 (C-1''), 75.0 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.5 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[15]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为(-)-异落叶松脂醇-9'-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

**化合物 3** 白色无定形粉末;  $[\alpha]_D^{20} -144.0$  (*c* 0.17, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  545.2 [M + Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.79 (1H, s, H-2'), 6.70 (1H, s, H-2), 6.63 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-6'), 6.34 (1H, s, H-5), 4.27 (H, d, *J* = 8.4, H-1''), 4.26 (H, d, *J* = 4.8, H-7'), 3.87 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-6''a), 3.83 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.80 (1H, overlapped, H-9'a), 3.78 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.66 (1H, dd, *J* = 11.4, 5.4 Hz, H-6''b), 3.60 (1H, dd, *J* = 11.4, 5.4 Hz, H-9b), 3.46 (1H, dd, *J* = 9.6, 6.6 Hz, H-9'b), 3.35 ~ 3.20 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''), 2.92 (1H, dd, *J* = 16.8, 6.0 Hz, H-7a), 2.68 (1H, dd, *J* = 16.8, 10.8 Hz, H-7b), 2.25 (1H, m, H-8), 2.03 (1H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 128.5 (C-1), 112.3 (C-2), 147.8 (C-3), 145.8 (C-4), 117.1 (C-5), 133.1 (C-6), 33.2 (C-7), 35.4 (C-8), 65.2 (C-9), 135.8 (C-1''), 115.7 (C-2''), 148.1 (C-3''), 145.5 (C-4''), 115.4 (C-5''), 124.2 (C-6''), 46.6 (C-7''), 42.1 (C-8''), 71.6 (C-9''), 104.5 (C-1''), 75.4 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.9 (C-4''), 78.0 (C-5''), 63.0 (C-6''), 56.5 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[16]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为马先蒿木脂素。

**化合物 4** 浅黄色粉末;  $[\alpha]_D^{20} -62.1$  (*c* 0.15, MeOH); ESI-MS:  $m/z$  523.2 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.78 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-5'), 6.77 (1H, s, H-2), 6.72 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2''), 6.65 (1H, dd, *J* = 9.6, 1.8 Hz, H-6'), 6.52 (1H, s, H-5), 4.40 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-1''), 3.87 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-7'), 3.85 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.82 (1H, m, H-6''a), 3.82 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (2H, m, H-9), 3.68 (2H, m, H-9'), 3.64 (1H, m, H-6''b), 3.45 ~ 3.39 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''), 2.84

(2H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-7), 2.07 (1H, m, H-8), 1.81 (1H, m, H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 132.2 (C-1), 113.2 (C-2), 148.6 (C-3), 146.3 (C-4), 118.9 (C-5), 134.7 (C-6), 33.4 (C-7) 39.9 (C-8), 62.3 (C-9), 138.2 (C-1'), 113.8 (C-2'), 149.0 (C-3'), 146.1 (C-4'), 116.1 (C-5'), 123.2 (C-6'), 48.2 (C-7'), 47.5 (C-8'), 65.8 (C-9'), 103.4 (C-1''), 74.6 (C-2''), 77.9 (C-3''), 70.8 (C-4''), 77.8 (C-5''), 61.9 (C-6''), 56.8 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (3'-OCH<sub>3</sub>)。

以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为(-)-异落叶松脂醇-4-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

**化合物 5** 白色无定形粉末; ESI-MS:  $m/z$  383.1 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.74 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5'), 6.68 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.66 (1H, s, H-2), 6.62 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-6'), 6.18 (1H, s, H-5), 3.81 (1H, overlapped, H-7'), 3.81 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.8$  Hz, H-9'a), 3.66 (2H, m, H-9), 3.40 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.2$  Hz, H-9'b), 2.78 (2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-7), 2.00 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 129.0 (C-1), 112.4 (C-2), 147.2 (C-3), 145.9 (C-4), 117.3 (C-5), 134.2 (C-6), 33.6 (C-7), 40.0 (C-8), 66.0 (C-9), 138.6 (C-1'), 113.8 (C-2'), 149.0 (C-3'), 145.2 (C-4'), 116.0 (C-5'), 123.2 (C-6'), 48.1 (C-7'), 48.0 (C-8'), 62.2 (C-9'), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[18]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为异落叶松脂素。

**化合物 6** 白色无定形粉末; ESI-MS:  $m/z$  561.2 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.68 (1H, s, H-2''), 6.62 (1H, s, H-5''), 6.62 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6'), 6.59 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.57 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.42 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 6.37 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 5.46 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-7), 4.04 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-7'), 3.86 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (1H, dd,  $J = 10.8, 4.2$  Hz, H-9a), 3.72 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.6$  Hz, H-9'a), 3.66 (2H, m, H-9''), 3.51 (1H, dd,  $J = 11.4, 3.6$  Hz, H-9'b), 3.46 (1H, dd,  $J = 10.8, 9.0$  Hz, H-9b), 3.46 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 2.80 (1H, dd,  $J = 15.6, 4.8$  Hz, H-7''), 2.74 (1H, dd,  $J = 15.6, 12.0$  Hz, H-7''), 2.66 (1H, m, H-8), 1.89 (1H, m, H-8''), 1.71

(1H, m, H-8');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 134.9 (C-1), 110.2 (C-2), 148.8 (C-3), 146.9 (C-4), 115.7 (C-5), 118.9 (C-6), 87.5 (C-7), 54.2 (C-8), 63.3 (C-9), 138.1 (C-1'), 112.7 (C-2'), 149.1 (C-3'), 147.9 (C-4'), 128.3 (C-5'), 122.9 (C-6'), 45.5 (C-7'), 49.6 (C-8'), 61.4 (C-9'), 131.8 (C-1''), 113.6 (C-2''), 145.0 (C-3''), 145.8 (C-4''), 115.6 (C-5''), 130.5 (C-6''), 34.4 (C-7''), 39.6 (C-8''), 65.8 (C-9''), 56.3 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.0 (3'-OCH<sub>3</sub>), 56.6 (3''-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[19]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为 phyllanglaucin B。

**化合物 7** 白色无定形粉末; ESI-MS:  $m/z$  577.2 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.99 (1H, s, H-6'), 6.96 (1H, s, H-2), 6.95 (1H, s, H-2'), 6.87 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 6.76 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 5.63 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-7), 4.57 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-7'), 4.35 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 4.22 (1H, dd,  $J = 9.6, 5.4$  Hz, H-9a), 3.89 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.86 (1H, m, H-8'), 3.83 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.67 (2H, m, H-8, 9b), 3.52 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.2$  Hz, H-9'a), 3.39 (1H, dd,  $J = 11.4, 6.6$  Hz, H-9'b);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD),  $\delta$ : 134.6 (C-1), 110.7 (C-2), 149.0 (C-3), 148.8 (C-4), 116.9 (C-5), 119.7 (C-6), 89.1 (C-7), 53.2 (C-8), 72.3 (C-9), 129.6 (C-1'), 112.7 (C-2'), 145.3 (C-3'), 147.5 (C-4'), 137.0 (C-5'), 116.1 (C-6'), 75.2 (C-7'), 77.6 (C-8'), 62.3 (C-9'), 104.6 (C-1''), 75.5 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.1 (C-5''), 62.8 (C-6''), 56.4 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.7 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致, 故鉴定化合物为(-)-7R,8S-7',8'-二羟基-二氢脱氢松柏醇-9-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

**化合物 8** 白色无定形粉末; ESI-MS:  $m/z$  577.2 [M + Na]<sup>+</sup>;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.00 (1H, s, H-6'), 6.98 (1H, s, H-2), 6.95 (1H, s, H-2'), 6.85 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6), 6.76 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 5.62 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-7), 4.57 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-7'), 4.35 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-1''), 4.13 (1H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-9a), 3.86 (1H, m, H-8'), 3.87 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.83 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (2H, m, H-8, 9b), 3.51 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.2$  Hz, H-9'a), 3.39 (1H, dd,  $J = 11.4, 6.0$  Hz, H-9'b);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

$\delta$ : 134.5 (C-1), 110.8 (C-2), 149.0 (C-3), 148.8 (C-4), 117.0 (C-5), 119.7 (C-6), 89.3 (C-7), 52.9 (C-8), 72.3 (C-9), 129.6 (C-1'), 112.6 (C-2'), 145.3 (C-3'), 147.5 (C-4'), 137.0 (C-5'), 116.1 (C-6'), 75.2 (C-7'), 77.6 (C-8'), 64.3 (C-9'), 104.2 (C-1''), 75.4 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.1

(C-5''), 62.8 (C-6''), 56.5 (3-OCH<sub>3</sub>), 56.7 (3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[20]</sup>报道一致,故鉴定化合物为(+)-7S,8R-7',8'-二羟基-二氢脱氢松柏醇-9-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

化合物1~8的化学结构见图1。

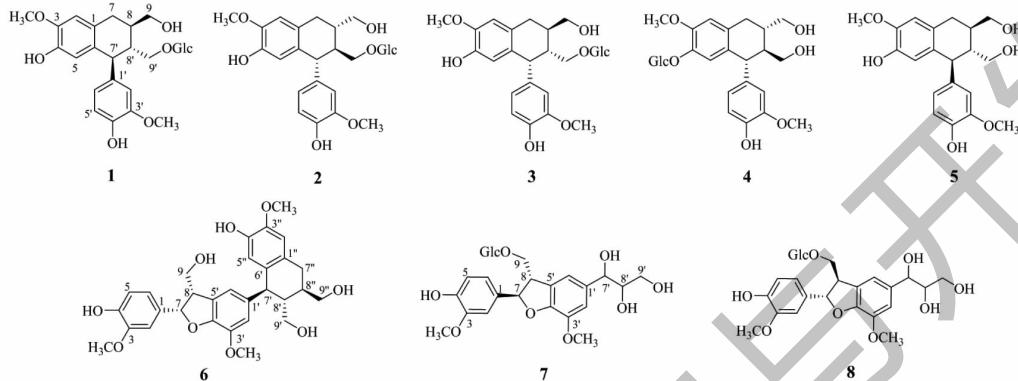


图1 化合物1~8的化学结构

Fig. 1 The structure of compounds 1~8

## 2.2 肝细胞保护活性筛选及作用机制研究

### 2.2.1 肝细胞保护活性筛选

采用MTT法筛选化合物1~8的肝细胞保护活性,模型组用APAP诱导HL-7702肝细胞损伤。与空白对照组相比,模型组细胞存活率明显下降( $P < 0.01$ )。化合物1和3可显著增加APAP诱导受损肝细胞HL-7702的存活率,EC<sub>50</sub>分别是10.23 ± 2.45 μmol/L和5.20 ± 1.28 μmol/L。

### 2.2.2 Hoechst 33342 荧光染色检测化合物3抑制HL-7702细胞凋亡的作用

取活性显著的化合物3,观察其抑制HL-7702

细胞凋亡的作用。Hoechst 33342荧光染色结果显示,空白组细胞呈现微弱荧光;模型组细胞呈亮蓝色荧光,细胞核皱缩、呈现致密浓染现象;2~20 μmol/L化合物3给药后,细胞荧光强度减弱,且随着给药浓度增加,凋亡小体逐渐减少,细胞逐渐恢复正常形态,结果见图2。

### 2.2.3 Western blot检测化合物3对Bcl-2和Bax蛋白的表达水平

取活性显著的化合物3,利用Western blot技术检测其对APAP诱导损伤的HL-7702细胞内Bcl-2和Bax蛋白表达的影响。由图3可知,与空白组相

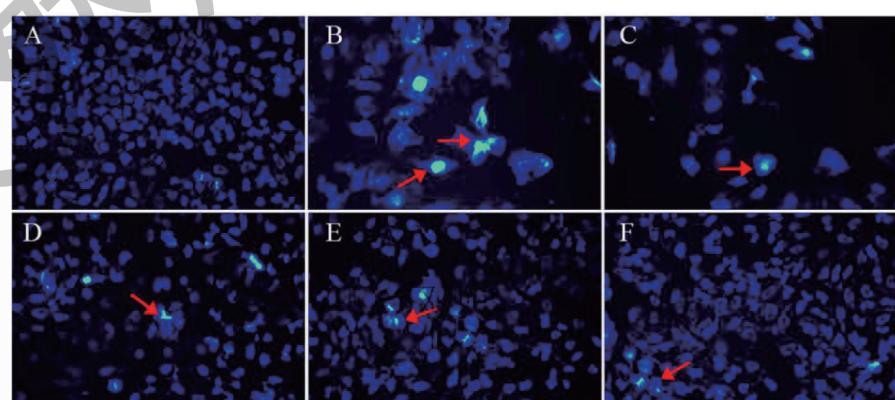


图2 化合物3对APAP诱导的HL-7702细胞凋亡的影响(×10)

Fig. 2 Effects of compound 3 on APAP-induced apoptosis of HL-7702 cells (×10)

注:A为空白对照组;B为模型组;C~F分别为2,5,10和20 μmol/L化合物3给药组。Note: A: Control group; B: APAP-induced model group,

C-F are 2, 5, 10, and 20 μmol/L compound 3 groups, respectively.

比,模型组 Bcl-2 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 比值显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组相比,5~20  $\mu\text{mol/L}$  的化合物 3 均可上调 Bcl-2 蛋白

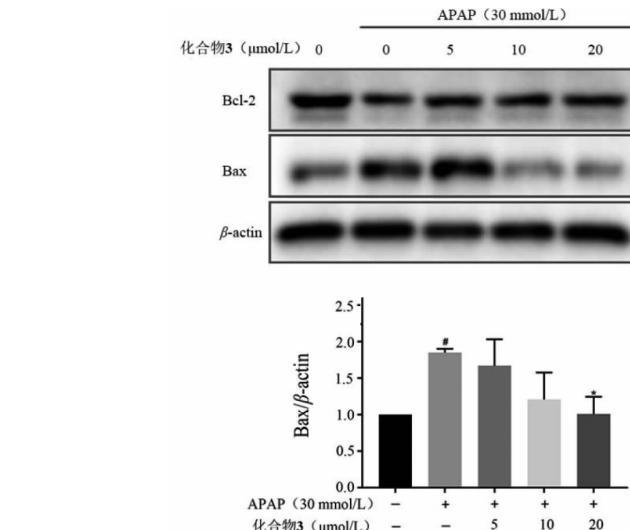


图 3 化合物 3 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of compound 3 on the expression of Bcl-2 and Bax proteins

注:与空白对照组相比,## $P < 0.01$ ;与模型组相比,\*\*\* $P < 0.01$ ,\* $P < 0.05$ 。Note:## $P < 0.01$  vs control group; \*\*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$  vs model group.

### 3 讨论与结论

本研究从芫蔚子的正丁醇部位分离鉴定了 8 个木脂素类化合物,且化合物 1~8 均为首次从芫蔚子中分离得到。目前从芫蔚子中分离得到的化合物以三萜为主,而课题组研究至今,已从芫蔚子中分离得到 23 个木脂素类成分<sup>[7,9]</sup>。文献研究发现<sup>[3,6]</sup>,从益母草和芫蔚子中分离得到的单体化合物均以萜类成分为主,但益母草中鲜少报道木脂素类成分,因而推测木脂素类成分是芫蔚子与益母草的差异性物质。

对乙酰氨基酚也称扑热息痛,为苯胺类解热镇痛药,过量服用易引起肝损伤甚至肝衰竭,主要通过引起肝细胞内线粒体功能障碍和细胞凋亡造成严重的肝毒性<sup>[21]</sup>。因此,APAP 常被用作药物性肝损伤的造模药<sup>[22~24]</sup>。本实验采用 APAP 建立体外肝损伤模型,对分离得到的化合物进行肝细胞保护活性筛选,结果化合物 1 和 3 可显著抑制 APAP 诱导的肝细胞损伤,EC<sub>50</sub> 分别是 10.23 ± 2.45  $\mu\text{mol/L}$  和 5.20 ± 1.28  $\mu\text{mol/L}$ 。同时,利用荧光染色实验观察到化合物 3 可抑制 HL-7702 细胞凋亡。

细胞凋亡的内在途径受 B 细胞淋巴瘤 (Bcl-2) 家族蛋白调节,Bcl-2 家族蛋白形成蛋白质-蛋白质

表达,下调 Bax 蛋白表达,显著升高 Bcl-2/Bax 比值,且具有一定的剂量依赖性。

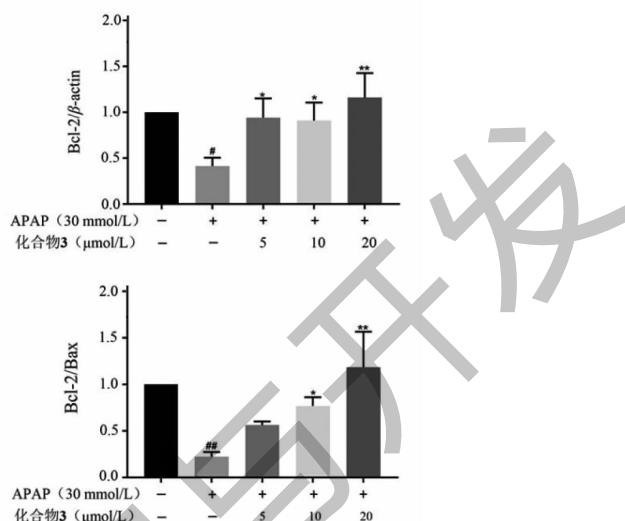


图 3 化合物 3 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of compound 3 on the expression of Bcl-2 and Bax proteins

相互作用网络,通过影响线粒体外膜的通透性来调节细胞凋亡,其中 Bcl-2 和 Bax 是一对调控细胞凋亡的关键蛋白,Bcl-2 为抗凋亡蛋白,可增强肝细胞对大多数 DNA 损伤因子的抵抗性,Bax 为促凋亡蛋白,可诱导线粒体膜通透性增强并释放细胞色素 c,引起细胞凋亡<sup>[23,25~27]</sup>,而 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达量的比值反映出细胞受凋亡刺激后的生存能力<sup>[28]</sup>。为进一步探讨化合物 3 抑制细胞凋亡的机制,本研究采用 Western blot 技术检测其对 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平,结果表明化合物 3 可上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,并升高 Bcl-2/Bax 比值,提示化合物 3 可能通过调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量发挥抗凋亡作用,从而起到肝细胞保护效果。

本研究对芫蔚子中具有肝细胞保护活性的药效物质基础及作用机制进行了探索,为阐明芫蔚子的传统功效提供依据,有利于后续对药材资源的合理开发和利用。迄今为止,课题组已从芫蔚子中分离得到 6 个具有肝细胞保护活性的木脂素类成分,包括 fruleolide A、fruleolide B、lariciresinol-4-O- $\beta$ -D-glucoside、lariciresinol-4'-O- $\beta$ -D-glucoside、(+)-异落叶松脂醇-9'-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、马先蒿木脂素<sup>[9]</sup>。《本草纲目》认为芫蔚子善于清肝明目,但目前对于

其清肝明目的物质基础和作用机制的研究较少,通过课题组的研究可以发现茺蔚子的木脂素类成分具有较好的肝细胞保护作用,可能是茺蔚子清肝明目的活性物质基础。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020;252.
- 2 Li SZ. Compendium of Materia Medica(本草纲目) [M]. Liu HR, Collation. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982.
- 3 Miao LL, Zhou QM, Peng C, et al. *Leonurus japonicus* (Chinese motherwort), an excellent traditional medicine for obstetrical and gynecological diseases: a comprehensive overview[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117:109060.
- 4 Xie XF, Chen JR, Li GM, et al. Research progress in the pharmacological effects of Herba Leonuri on uterus [J]. World Chin Med(世界中医药), 2020, 15:1263-1266.
- 5 Bu L, Liu F, Xiong L, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of terpenoids in genus Herba Leonurus[J]. World Chin Med(世界中医药), 2020, 15:1237-1246.
- 6 Shu PH, Luo YH, Liu WR, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Fructus Leonuri [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2022, 40:39-43.
- 7 Peng F, Xiong L, He YL, et al. 8-O-4' Neolignans from the fruits of *Leonurus japonicus*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:1320-1325.
- 8 Pan SY, Chang Y, Wei LX. Comparison of total alkaloid and stachydrine in contractile isolated uterus of mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1998, 29:687-688.
- 9 Tian ZH, Liu F, Peng F, et al. New lignans from the fruits of *Leonurus japonicus* and their hepatoprotective activities[J]. Bioorg Chem, 2021, 115:105252.
- 10 Shu P, Luo Y, Zhu H, et al. Secondary metabolites with tyrosinase and acetylcholinesterase inhibitory activities from Leonuri Fructus[J]. Rec Nat Prod, 2021, 16:417-425.
- 11 Ye M, Xiong J, Zhu JJ, et al. Leonurusoleanolides E-J, minor spirocyclic triterpenoids from *Leonurus japonicus* fruits[J]. J Nat Prod, 2014, 77:178-182.
- 12 Ye M. Isolation and bioactivities of the natural products from several plants[D]. Shanghai: East China Normal University (华东师范大学), 2013.
- 13 Ye M, Ma GL, Su JJ, et al. Leonurosides A-D: steroid N-acetylglucosaminides from the fruits of *Leonurus japonicus* [J]. Phytochem Lett, 2014, 10:287-290.
- 14 Latté KP, Kaloga M, Schäfer A, et al. An ellagitannin, n-butyl gallate, two aryltetralin lignans, and an unprecedented diterpene ester from *Pelargonium reniforme*[J]. Phytochemistry, 2008, 69:820-826.
- 15 Achenbach H, Löwel M, Waibel R, et al. New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*[J]. Planta Med, 1992, 58, 270-272.
- 16 Chu HB, Zeng GZ, Zhu MJ, et al. Chemical constituents of *Pedicularis densispica* Franch[J]. Z Naturforsch B, 2011, 66: 641-646.
- 17 Feng WS, Li KK, Zheng XK. Studies on chemical constituents in *Forsythia suspensa*(Thunb.) Vahl[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2009, 44:490-492.
- 18 Jutiviboonsuk A, Zhang H, Tan GT, et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis* [J]. Phytochemistry, 2005, 66:2745-2751.
- 19 Wu Z, Lai Y, Zhou L, et al. Enantiomeric lignans and neolignans from *Phyllanthus glaucus*: enantioseparation and their absolute configurations[J]. Sci Rep-UK, 2016, 6:1-13.
- 20 Hu J, Zhao J, Khan SI, et al. Antioxidant neolignan and phenolic glucosides from the fruit of *Euterpe oleracea*[J]. Fitoterapia, 2014, 99:178-183.
- 21 Torres S, Baulies A, Insausti-Urkia N, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced upregulation of STARD1 promotes acetaminophen-induced acute liver failure [J]. Gastroenterology, 2019, 157:552-568.
- 22 Luo XY, Mai YS, Zhu L, et al. Protective effect and mechanism of total flavonoids of *Fructus Livistoniae* on acetaminophen-induced liver injur[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50:925-930.
- 23 Deng XK, Dai CX, Duan H, et al. Protective effects of total saponins from *Panax japonicus* C. A. Mey. on acetaminophen-induced liver injury [J]. J South-Cent Minzu Univ: Nat Sci (中南民族大学学报:自科版), 2022, 42:161-168.
- 24 Shu GW, Qiu YH, Li W, et al. Protective effects of total alkaloids from lotus leaf on acetaminophen-induced acute liver injury in mice: roles of activating hepatic AMPK/Nrf2 signaling[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:198-203.
- 25 Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, et al. The Bcl-2 homology domain 3(BH3)-only proteins Bim and bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in healthy liver[J]. J Biol Chem, 2013, 288:30009-30018.

(下转第 1763 页)