

# 杜仲皮中木脂素类化学成分及其对高糖诱导的肾小球系膜细胞保护作用研究

黄玲<sup>1</sup>, 苏彦红<sup>2</sup>, 蒋跃平<sup>3,4</sup>, 张燕<sup>1</sup>, 罗荣耀<sup>1</sup>, 张颖帆<sup>5</sup>, 黄琪<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>大理大学药学院, 大理 671000; <sup>2</sup>山东省沂南县湖头镇卫生院, 沂南 276300; <sup>3</sup>中南大学湘雅医院药学部;

<sup>4</sup>中南大学湘雅医院国家老年疾病临床医学研究中心; <sup>5</sup>中南大学湘雅医院手术室, 长沙 410008

**摘要:** 研究杜仲皮中的木脂素类化学成分, 并评价其对高糖诱导的人肾小球系膜细胞的保护作用。将杜仲树皮粉碎后, 纯化水提取, 采用 HPD-100 大孔吸附树脂、硅胶、Sephadex LH-20、半制备高效液相色谱等方法进行分离, 根据理化性质和波谱学方法鉴定化合物结构, 从杜仲皮水提取物中分离鉴定了 6 个木脂素类化合物, 包括 caruignan D (1)、(-)-表松脂素 (2)、(+)-松脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (3)、(-)-松脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (4)、(+)-中脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (5) 和 (+)-中脂素 4'-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 (6), 化合物 1 为首次从杜仲中分离得到。在高糖诱导异常增殖的肾小球系膜细胞模型中, 采用 MTT 法检测木脂素类化合物干预后的细胞活力。化合物 5 能剂量依赖性地抑制细胞增殖, 对高糖诱导的肾小球系膜细胞具有保护活性。

**关键词:** 杜仲皮; 化学成分; 木脂素; 结构鉴定; 细胞活力

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)3-0405-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.3.006

## Lignans from *Eucommia ulmoides* barks and their protective effect on high-glucose-stimulated human renal mesangial cells

HUANG Ling<sup>1</sup>, SU Yan-hong<sup>2</sup>, JIANG Yue-ping<sup>3,4</sup>,  
ZHANG Yan<sup>1</sup>, LUO Rong-yao<sup>1</sup>, ZHANG Ying-fan<sup>5</sup>, HUANG Qi<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China; <sup>2</sup>Health Center of Hutou Town, Yinan County, Shandong Province, Yinan 276300, China; <sup>3</sup>Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University;

<sup>4</sup>National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital, Central South University;

<sup>5</sup>Operating Room, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

**Abstract:** To study the lignans compound from *Eucommia ulmoides* barks and evaluate their protective effects on high-glucose-stimulated human renal mesangial cells. The barks of *E. ulmoides* was crushed and extracted with purified water. HPD-100 macroporous resin, Silica gel, Sephadex LH-20 and Semi-preparative HPLC were used to separate compounds in the aqueous extract, and their structures were identified based on physicochemical properties and spectral analysis. Six lignans were isolated and identified as caruignan D (1), (-)-epipinoresinol (2), (+)-pinoresinol 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (3), (-)-pinoresinol 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (4), (+)-medioresinol 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (5) and (+)-medioresinol 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (6). Compound 1 was isolated from *E. ulmoides* for the first time. The effect of isolated lignans on cell viability in high-glucose-stimulated human renal mesangial cells (HRMCs) with abnormal proliferation was evaluated by MTT assay. It was found that compound 5 can inhibit cell proliferation in a dose dependent manner, indicating that compound 5 exerts protective activity on high-glucose-stimulated HRMCs.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* barks; chemical constituents; lignans; structure identification; cell viability

杜仲为杜仲科植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥树皮, 其性温味甘, 具有补肝肾, 强筋骨, 安胎等功效, 用于肝肾不足, 腰膝酸痛, 筋骨无力, 头晕目眩, 妊娠漏血, 胎动不安等症<sup>[1]</sup>。杜仲主要分布于湖南、湖北、河南、山西、四川等省, 是国家二级保护植物, 其主要成分有木脂素类、环烯醚萜类、黄酮类、苯丙素类、萜类、多糖类等<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明, 杜仲具有降压、调血脂、降血糖、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、保肝护肾、抗骨质疏松等药理作用<sup>[2-4]</sup>。糖尿病是一种高发病率和高死亡率的代谢性疾病, 糖尿病肾病是糖尿病患者最常见的并发症之一, 也是终末期肾衰竭的最常见原因<sup>[5]</sup>, 寻找在高糖环境下可以改善肾功能的药物具有重要的临床价值。研究表明: 杜仲木脂素可降低肾损伤大鼠的尿蛋白水平, 抑制血管紧张素 II 诱导的肾小球系膜细胞增殖, 改善肾功能, 对高血压所致肾损伤具有保护作用<sup>[6,7]</sup>, 也可明显抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞形态学改变, 拮抗高糖诱导的肾小管上皮细胞的转分化<sup>[8]</sup>, 但具体活性成分尚未确定。为丰富杜仲的化学成分结构类型, 从杜仲木脂素中筛选具有肾脏保护活性的化合物, 本实验对杜仲皮水提取物中的木脂素类化学成分进行了分离鉴定, 并通过 MTT 法初步筛选了杜仲木脂素中能抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖的化合物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

Bruker AV-600 核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); UPLC-6545 Accurate Mass Q-TOF 色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 科技公司); Chirascan qCD 圆二色谱仪 (英国 Applied Photophysics Ltd); Jasco 1020 旋光仪 (日本 JASCO 公司); Agilent 1200/1100 Series 分析型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 科技公司); MD50 多功能酶标仪 (美国赛多利斯 Gibco); TC-10 细胞计数仪 (美国 Bio-Rad); 硅胶 (200 ~ 300 目, 80 ~ 100 目)、GF254 硅胶板 (青岛海洋化工有限公司); HPD-100 大孔吸附树脂 (河北沧州宝恩化工有限公司); Sephadex LH-20 凝胶 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden); YMC-Pack ODS-A C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 10 mm, 10 μm) (杭州亚莱博仪器有限公司); C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (美国 Agilent 科技公司); 色谱纯甲醇、乙腈 (美国 Fisher 公司); 分析纯甲醇、乙醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、石

油醚 (国药集团化学试剂有限公司); 低糖 DMEM 培养基、FBS 胎牛血清、胰蛋白酶、PBS 磷酸盐缓冲液 (美国赛默飞世尔科技有限公司); D-(+)-葡萄糖、MTT (美国 Sigma-Aldrich 公司); 纯化水 (自制); 人肾小球系膜细胞株 HRMCs (武汉大学保藏中心)。

药材于 2017 年 4 月采自湖南省张家界市, 经中南大学湘雅医院药学部刘韶教授鉴定为杜仲科植物杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 的干燥树皮, 药材标本 (No. 20170408) 现保存于中南大学湘雅医院。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 提取与分离

称取杜仲树皮 10 kg, 粉碎, 过 200 目筛, 得到杜仲粗粉, 首次加 10 倍体积水煎煮 90 min, 第二次加 8.5 倍水煎煮 90 min, 将所得提取溶液按水提醇沉法 (80% 乙醇) 处理, 静止 24 h 后过滤, 合并滤液, 真空浓缩, 得水提取物 500 g。

水提取物过大孔树脂柱色谱, 以乙醇-水 (10% → 100%) 梯度洗脱, 收集 70% 乙醇流分。进一步将 70% 乙醇洗脱部位通过硅胶柱色谱分离, 采用二氯甲烷-甲醇 (100:0 → 50:50) 梯度洗脱, 得到 7 个流分 (Fr. A ~ G)。Fr. A 通过硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:5 → 0:100) 梯度洗脱, 得到 6 个流分 (Fr. A-1 ~ Fr. A-6)。Fr. A-5 通过凝胶柱色谱和反复硅胶柱色谱, 最终利用半制备高效液相色谱纯化得到化合物 **1** (7.4 mg,  $t_R = 23$  min)。Fr. C 经硅胶柱色谱, 以石油醚-二氯甲烷-甲醇 (5:1:0 → 0:0:1) 梯度洗脱得到 7 个流分 (Fr. C-1 ~ Fr. C-7)。Fr. C-2 经硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 (100:5 → 0:100) 洗脱, 再进行凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 最后经半制备高效液相色谱纯化得到化合物 **4** (10.1 mg,  $t_R = 26$  min)。Fr. C-3 经反复硅胶柱色谱, 再通过半制备高效液相色谱纯化得到化合物 **5** (7.3 mg,  $t_R = 42$  min)。Fr. C-4 经反复硅胶柱色谱, 再进行凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 最后经半制备高效液相色谱多次制备纯化得到化合物 **2** (10.8 mg,  $t_R = 19$  min)、**3** (6.3 mg,  $t_R = 36$  min)。Fr. C-5 进行凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱, 再通过半制备高效液相色谱得到化合物 **6** (6.8 mg,  $t_R = 30$  min)。

#### 1.2.2 细胞培养

HRMCs 置于细胞培养箱, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 100% 的环境下培养三天。待细胞贴壁生长到 3/4 的汇合度时, 采用 0.25% 胰酶消化 2 min, 吸

出胰酶,加入含 10% 胎牛血清的培养基终止消化。细胞悬液吸出后置于离心管内,1 000 r/min 条件下离心 5 min,除去培养基。新鲜培养基重悬细胞后放入培养瓶内继续培养。

### 1.2.3 细胞活力检测

取生长良好的对数期 HRMCs,弃培养液,经过 0.25% 胰酶和乙二胺四乙酸(EDTA)各半的消化液分散后计数,制成细胞悬液;用低糖 DMEM 培养基(L-DMEM)调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/孔,接种至 96 孔板,每孔 80  $\mu$ L,置于 37  $^{\circ}$ C、浓度为 5% 的  $\text{CO}_2$ 、相对湿度为 100% 的细胞培养箱中培养 24 h。

空白组、对照组加入每孔 20  $\mu$ L 的 L-DMEM,高糖模型组加入每孔 10  $\mu$ L 的 L-DMEM 以及 10  $\mu$ L 的 250 mmol/L 葡萄糖母液(葡萄糖终浓度为 30 mmol/L),继续培养 24 h。药物处理组同时加入不同浓度的杜仲木脂素类化合物 1~6,使其终浓度为 250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95  $\mu$ mol/L,继续培养 24 h。每孔加入配置好的 MTT 溶液(5 mg/mL),37  $^{\circ}$ C 孵箱培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,置恒温振荡器上振荡 15 min 使其充分溶解,于 490 nm 处测量各孔的 OD 值,在酶标仪 500 nm 处检测,实验重复 3 次,取平均值。按下列公式计算细胞活力:

$$\text{细胞活力} = \frac{(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})} \times 100\%$$

### 1.2.4 统计学方法

运用 GraphPad Prism 8.0.1 对数据进行处理和分析,以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示所得实验结果数据,单因素方差分析和  $t$  检验分析用于两两数据比较,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 无定性粉末;HR-ESI-MS:  $m/z$  281.102 3 [ $M + H$ ] $^+$ ,分子式为  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.33 (1H, s, 12-OH), 6.63 (2H, br s, H-10, 14), 4.63 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-5), 4.48 (2H, dd,  $J = 9.6, 6.6$  Hz, H-7b), 4.35 (2H, dd,  $J = 9.6, 1.8$  Hz, H-7a), 4.21 (2H, t,  $J = 9.0$  Hz, H-3b), 3.94 (2H, dd,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, H-3a), 3.76 (6H, br s, 11, 13-OCH<sub>3</sub>), 3.59 (1H, m, H-2), 3.13 (1H, td,  $J = 3.0, 9.0$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 179.2 (C-1), 46.3 (C-2), 70.7 (C-3), 86.4 (C-5), 48.1 (C-6), 69.9 (C-7), 130.4 (C-9),

104.1 (C-10, 14), 148.4 (C-11, 13), 135.6 (C-12), 56.5 (11, 13-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献<sup>[9]</sup>报道基本一致,故化合物 1 鉴定为 caruilignan D。

**化合物 2** 无定性粉末;HR-ESI-MS:  $m/z$  359.146 2 [ $M + H$ ] $^+$ ,分子式为  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.91 (2H, s, 4, 4'-OH), 6.89 (2H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-2, 2'), 6.75 (2H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-6, 6'), 6.72 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5, 5'), 4.60 (2H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7, 7'), 4.12 (2H, dd,  $J = 9.0, 3.0$  Hz, H-9b, 9'b), 3.76 (6H, s, 3, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (2H, dd,  $J = 9.0, 6.6$  Hz, H-9a, 9'a), 3.03 (2H, m, H-8, 8');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 132.7 (C-1, 1'), 110.9 (C-2, 2'), 147.9 (C-3, 3'), 146.4 (C-4, 4'), 115.6 (C-5, 5'), 119.1 (C-6, 6'), 85.6 (C-7, 7'), 54.0 (C-8, 8'), 71.3 (C-9, 9'), 56.0 (3, 3'-OCH<sub>3</sub>)。据文献报道, H-9a 和 H-9b 的化学位移差  $\Delta\delta_{\text{H-9}} = 0.40$ ; H-9a' 和 H-9b' 的化学位移差  $\Delta\delta_{\text{H-9}'} = 0.40$ , 且  $J_{\text{H-7,8}} = 4.2$  Hz,  $J_{\text{H-7,8}'} = 4.2$  Hz, 提示 7-H/8-H 反式, 7'-H/8'-H 反式<sup>[10]</sup>。以上数据与文献<sup>[10]</sup>报道基本一致,故化合物 2 鉴定为(-)-表松脂素。

**化合物 3** 无定性粉末;HR-ESI-MS:  $m/z$  543.186 2 [ $M + \text{Na}$ ] $^+$ ,分子式为  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.16 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.04 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.96 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.93 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6'), 6.82 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 6.79 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 4.78 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.77 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7), 4.72 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7'), 4.26 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.89 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.88 (2H, m, H-9b, 9'b), 3.87 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.87 (1H, m, H-6''a), 3.71 (1H, m, H-6''b), 3.51 (1H, m, H-2''), 3.48 (1H, m, H-3''), 3.42 (1H, m, H-4''), 3.41 (1H, m, H-5''), 3.14 (2H, m, H-8, 8');  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 132.4 (C-1), 109.6 (C-2), 146.1 (C-3), 145.9 (C-4), 114.7 (C-5), 118.4 (C-6), 86.1 (C-7), 54.1 (C-8), 71.3 (C-9, 9'), 136.1 (C-1'), 110.2 (C-2'), 149.6 (C-3'), 147.8 (C-4'), 116.6 (C-5'), 118.7 (C-6'), 85.7 (C-7'), 54.0 (C-8'), 55.0 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.6 (3'-OCH<sub>3</sub>), 101.4 (C-1''), 73.5 (C-2''), 76.5 (C-3''), 69.9 (C-4''), 76.8 (C-5''), 61.1 (C-6'')。H-9a 和 H-9b 的化学位移差  $\Delta\delta_{\text{H-9}} = 0.38$ ; H-9a' 和 H-9b' 的化学位移差  $\Delta\delta_{\text{H-9}'} = 0.38$ , 且  $J_{\text{H-7,8}} = 4.2$  Hz,

$J_{H-7',8'} = 4.2$  Hz, 表明 7-H/8-H 反式, 7'-H/8'-H 反式。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致, 故化合物 **3** 鉴定为 (+)-松脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

**化合物 4** 无定性粉末; HR-ESI-MS:  $m/z$  543.186 2 [M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>O<sub>11</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 7.17 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.04 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.93 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.93 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6'), 6.80 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 6.76 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 4.77 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7), 4.71 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7'), 4.65 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.25 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.89 (2H, m, H-9b), 3.87 (1H, m, H-6''a), 3.86 (1H, m, H-9'b), 3.86 (6H, s, 3, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (1H, m, H-6''b), 3.51 (1H, m, H-2''), 3.48 (1H, m, H-3''), 3.42 (1H, m, H-4''), 3.41 (1H, m, H-5''), 3.32 (1H, m, H-8'), 3.14 (2H, m, H-8, 8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 131.4 (C-1), 109.6 (C-2), 148.2 (C-3), 146.1 (C-4), 115.0 (C-5), 118.4 (C-6), 86.2 (C-7), 54.2 (C-8), 71.3 (C-9), 136.1 (C-1'), 110.2 (C-2'), 149.6 (C-3'), 147.2 (C-4'), 116.6 (C-5'), 118.8 (C-6'), 85.7 (C-7'), 53.9 (C-8'), 71.2 (C-9'), 55.0 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.3 (3'-OCH<sub>3</sub>), 101.4 (C-1''), 73.5 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.9 (C-4''), 76.8 (C-5''), 61.1 (C-6'')。H-9a 和 H-9b 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9} = 0.36$ ; H-9a' 和 H-9b' 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9'} = 0.39$ , 且  $J_{H-7,8} = 4.2$  Hz,  $J_{H-7',8'} = 4.2$  Hz, 表明 7-H/8-H 反式, 7'-H/8'-H 反式。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致, 故化合物 **4** 鉴定为 (-)-松脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

**化合物 5** 无定性粉末; HR-ESI-MS:  $m/z$  573.196 9 [M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.16 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 7.05 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.93 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 6.81 (2H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2', 6'), 4.78 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7'), 4.75 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.73 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-7), 4.27 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.89 (2H, m, H-9b, 9'b), 3.88 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.87 (1H, m, H-6''a), 3.86 (6H, s, 3, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (1H, m, H-6''b), 3.50 (1H, m, H-2''), 3.48 (1H, m, H-3''), 3.42 (1H, m, H-4''), 3.41 (1H, m, H-5''), 3.15 (2H, m, H-8, 8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 134.8 (C-1),

110.2 (C-2), 149.6 (C-3), 147.9 (C-4), 116.6 (C-5), 118.4 (C-6), 85.7 (C-7), 54.1 (C-8), 71.3 (C-9), 55.4 (3, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 131.7 (C-1'), 103.1 (C-2', 6'), 147.9 (C-3', 5'), 136.1 (C-4'), 86.2 (C-7'), 54.1 (C-8'), 71.4 (C-9'), 101.4 (C-1''), 73.5 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.9 (C-4''), 76.8 (C-5''), 61.0 (C-6'')。H-9a 和 H-9b 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9} = 0.38$ ; H-9a' 和 H-9b' 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9'} = 0.38$ , 且  $J_{H-7,8} = 4.8$  Hz,  $J_{H-7',8'} = 4.2$  Hz, 表明 7-H/8-H 反式, 7'-H'/8'-H 反式。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致, 故化合物 **5** 鉴定为 (+)-中脂素 4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

**化合物 6** 无定性粉末; HR-ESI-MS:  $m/z$  573.197 3 [M + Na]<sup>+</sup>, 分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 6.97 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.83 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, H-6), 6.78 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.74 (2H, s, H-2', 6'), 4.78 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-7), 4.75 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.73 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-7'), 4.29 (2H, m, H-9a, 9'a), 3.91 (2H, m, H-9b, 9'b), 3.91 (1H, m, H-6''a), 3.88 (9H, s, 3, 3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (1H, m, H-6''b), 3.68 (1H, m, H-2''), 3.50 (1H, m, H-3''), 3.44 (1H, m, H-4''), 3.42 (1H, m, H-5''), 3.16 (2H, m, H-8, 8'); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 132.3 (C-1), 109.6 (C-2), 147.8 (C-3), 146.0 (C-4), 114.7 (C-5), 118.7 (C-6), 86.1 (C-7), 54.4 (C-8), 71.3 (C-9), 134.2 (C-1'), 103.4 (C-2', 6'), 153.0 (C-3', 5'), 138.2 (C-4'), 85.8 (C-7'), 53.9 (C-8'), 71.5 (C-9'), 55.0 (3-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (3', 5'-OCH<sub>3</sub>), 103.9 (C-1''), 74.3 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.9 (C-4''), 76.9 (C-5''), 61.1 (C-6'')。H-9a 和 H-9b 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9} = 0.38$ ; H-9a' 和 H-9b' 的化学位移差  $\Delta\delta_{H-9'} = 0.38$ , 且  $J_{H-7,8} = 4.2$  Hz,  $J_{H-7',8'} = 4.8$  Hz, 提示 7-H/8-H 反式, 7'-H/8'-H 反式。CD 谱中 210、230、280 nm 处呈现正的 Cotton 效应, 提示该化合物的绝对构型为 7*S*, 7'*S*, 8*R*, 8'*R*。以上数据与文献<sup>[14]</sup>报道基本一致, 故化合物 **6** 鉴定为 (+)-中脂素 4'-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷。

## 2.2 化合物对细胞活力的影响

高糖培养的肾小球系膜细胞活力明显增加, 高糖组相较于对照组细胞, 细胞活力显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 与高糖组比较, 化合物 **1**、**6** 在各浓度均未能使高糖培养条件下的肾小球系

膜细胞活力降低;高浓度的化合物 **2,3** 能使肾小球系膜细胞活力降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );中浓度的化合物 **4** 能使肾小球系膜细胞活力降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );7.8 ~ 250  $\mu\text{mol/L}$  的化合物 **5** 均能使肾小球系膜细胞活力显著降低,差异具有

统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。上述结果表明,化合物 **5** 能有效抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖作用,并具有明显的剂量依赖效应,化合物 **2,3,4** 在一定浓度能抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖作用,但无剂量依赖性(见图 1)。

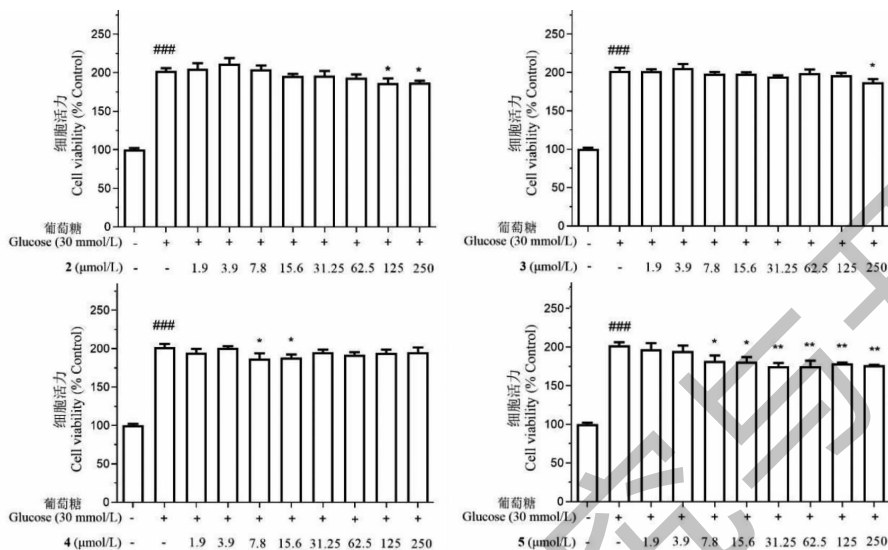


图 1 化合物 **2~5** 对高糖诱导的 HRMCs 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of compounds **2-5** on the proliferation of glucose-stimulated HRMCs( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与对照组比较,### $P < 0.001$ ;与高糖组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。Note:Compared with high-glucose model,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

### 3 讨论与结论

本研究从杜仲皮水提取物中,分离鉴定得到了 6 个木脂素类化合物,其中化合物 **1** 为首次从杜仲中分离得到。研究证实杜仲提取物对于肾损伤具有较好的保护作用<sup>[15,16]</sup>,同时也有研究报道杜仲木脂素可以通过促进 P21、P27 和 Bax 表达的上调来抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖和促进细胞凋亡,从而发挥肾保护作用<sup>[17]</sup>,但是发挥保护作用的具体活性成分尚未确定。本文在化学成分研究的基础上,通过 MTT 法检测发现,杜仲木脂素类化合物 **2,3,4** 在一定浓度能抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖作用,化合物 **5** 能有效抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖,且呈较好的剂量依赖性,提示化合物 **5** 具有较好的肾脏细胞保护作用。本研究丰富了杜仲药材的化合物库,为筛选肾脏保护活性的先导化合物提供了物质基础。

### 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,2020:72.

2 Gao HW, Li YP, Li SC. Study advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息),2021,38:73-81.

3 Hu Y, Li XZ, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents pharmacological effects and application of *Eucommia ulmoides* [J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2022,18234-239.

4 Huang LC, Lyu Q, Zheng WY, et al. Traditional application and modern pharmacological research of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Chin Med,2021,16:73.

5 Natesan V, Kim SJ. Diabetic nephropathy-a review of risk factors, progression mechanism, and dietary management[J]. Biomol Ther,2021,29:365-372.

6 Li L, Yan J, Hu K, et al. Protective effects of *Eucommia* lignans against hypertensive renal injury by inhibiting expression of aldose reductase [J]. J Ethnopharmacol,2012,139:454-461.

7 Li ZY, Deng XL, Huang WH, et al. Lignans from the bark of *Eucommia ulmoides* inhibited Ang II-stimulated extracellular matrix biosynthesis in mesangial cells[J]. Chin Med,2014,9:8.