

• 化学成分 •

川芎中抑制脂多糖诱导的 RAW264.7 和 BV2 细胞系 NO 生成的新的
丁苯酞衍生物——川芎螺内酯

郑怡然, 韦 玮, 杨秀伟*

北京大学药学院 天然药物学系, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: 目的 研究川芎 95%乙醇提取物的化学成分及其抑制脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠小胶质细胞 BV2 一氧化氮(NO)生成的生物学活性。方法 采用硅胶、高效液相色谱等柱色谱方法进行分离纯化,通过化合物的谱学数据鉴定其结构。采用 LPS 离体诱导 RAW264.7 和 BV2 细胞系 NO 生成模型,研究化合物对 NO 生成的抑制活性。结果 从川芎 95%乙醇提取物中分离出 3 个丁苯酞衍生物,分别鉴定为 Z-3',8',3'a,7'a-四氢-6,3',7,7'a-二聚藁本内酯-8'-酮(1)、Z,Z'-3,3'a,7,7'a-二聚藁本内酯(2)和川芎螺内酯(3)。对 LPS 诱导的细胞 NO 生成抑制作用,在 RAW264.7 细胞模型,化合物 1~3 和阳性对照药吲哚美辛的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为(31.60±2.62)、(21.20±0.61)、(30.12±2.90)、(54.62±7.53) μmol/L;在 BV2 细胞模型,化合物 1~3 和阳性对照药姜黄素的 IC₅₀ 分别为(21.99±4.40)、(15.43±1.34)、(12.20±3.40)、(10.58±1.41) μmol/L。结论 化合物 3 为新化合物,命名为川芎螺内酯。生物活性实验结果提示化合物 1~3 可能具有潜在的抗炎作用。

关键词: 川芎; 伞形科; 丁苯酞衍生物; 川芎螺内酯; RAW264.7 细胞系; BV2 细胞系; 药效物质基础

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)07-1497-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.002

Chuanliguspirolide, a new butylphthalide derivative from *Chuanxiong Rhizoma* and its inhibition on NO production in LPS-activated RAW264.7 and BV2 cell lines

ZHENG Yi-ran, WEI Wei, YANG Xiu-wei

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of 95% ethanol aqueous extract of *Chuanxiong Rhizoma* and the bioactivities of inhibition on nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharides (LPS)-activated murine macrophage RAW264.7 and mouse microglia BV2 cell lines. **Methods** The compounds were separated and purified by silica gel column and high performance liquid chromatographies, and their structures were determined by spectroscopic data analysis. Using LPS-activated RAW264.7 and BV2 cell line models *in vitro*, all of the isolated compounds were evaluated for the inhibition against NO production. **Results** Three butylphthalide derivatives were obtained and identified as Z-3',8',3'a,7'a-tetrahydro-6,3',7,7'a-diligustilide-8'-one (1), Z,Z'-3,3'a,7,7'a-diligustilide (2), and chuanliguspirolide (3), respectively. For the inhibition of NO production in the LPS-activated two cell lines, the half inhibitory concentration (IC₅₀) values of compounds 1—3 and indomethacin as a positive control drug in RAW 264.7 cell line model were (31.60 ± 2.62), (21.20 ± 0.61), (30.12 ± 2.90), and (54.62 ± 7.53) μmol/L, respectively, while IC₅₀ values of compounds 1—3 and curcumin as a positive control drug in BV2 cell line model were (21.99 ± 4.40), (15.43 ± 1.34), (12.20 ± 3.40), and (10.58 ± 1.41) μmol/L, respectively. **Conclusion** Compound 3 named as chuanliguspirolide is a new one. The results of bioactivity assays indicated that compounds 1—3 are potential anti-inflammatory agents.

Key words: *Chuanxiong Rhizoma*; Umbelliferae; butylphthalide derivative; chuanliguspirolide; RAW264.7 cell lines; BV2 cell lines; bioactive substance foundation

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473321); “十二五”国家科技支撑计划(2011BAI07B08)

作者简介: 郑怡然, 女, 北京大学药学院硕士研究生, 主要从事中草药生物活性物质基础研究。

*通信作者 杨秀伟, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药有效物质基础和药物代谢研究。Tel: (010)82801569 E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

川芎 *Chuanxiong Rhizoma* 为伞形科植物 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,系传统中药,始载于《神农本草经》,列为中品,具有活血行气、祛风止痛之功效,用于胸痹心痛、胸胁刺痛、跌扑肿痛、月经不调、经闭痛经、头痛、风湿痹痛等症。此外,其还可用于美容、代茶饮、制作耳枕辅助治疗高血压病等。川芎主产于四川、云南、贵州、广西、湖北等地。《中国药典》、原《卫生部药品标准中药成方制剂》第1册至第20册,以及部分新药标准中含川芎的中成药达678个,可谓常用中药之一。中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题^[1]。在系列研究中,本课题组报道了川芎的化学成分^[2-5]和部分化合物对脂多糖(LPS)诱导的鼠性巨噬细胞 RAW264.7 一氧化氮(NO)产生的抑制作用^[3]。本实验继续报道从川芎中分离得到的 Z-3',8',3'a,7'a-四氢-6,3',7,7'a-二聚藁本内酯-8'-酮 (Z-3',8',3'a,7'a-tetrahydro-6,3',7,7'a-diligustilide-8'-one, **1**) 和 Z,Z'-3.3'a,7.7'a-二聚藁本内酯 (Z,Z'-3.3'a,7.7'a-diligustilide, **2**), 以及1个新的丁苯酞衍生物,命名为川芎螺内酯 (chuanliguspirolide, **3**)。采用 LPS 诱导的 RAW264.7 和小鼠小胶质 BV2 细胞系 NO 生成模型,分别以吲哚美辛 (indomethacin) 和姜黄素 (curcumin) 为阳性对照药,评价化合物 **1**~**3** 对细胞 NO 生成的抑制作用,结果提示化合物 **1**~**3** 可能具有潜在的抗炎作用。

1 仪器与材料

Finnigan TRACE 2000 型质谱仪 (EI-MS, Thermo Finnigan Inc. 公司, 美国); MDS SCIEX API QSTAR 型质谱仪 (ESI-TOF-MS, Applied Biosystems/MDS Sciex. 公司, 美国) 和 Waters Xevo G2 Q-TOF 高分辨电喷雾离子源质谱仪 (HR-ESI-TOF-MS, Waters 公司, 美国); Bruker AV III 400 型核磁共振波谱仪和 Bruker UltraShield 600 PLUS 型核磁共振波谱仪 (Bruker BioSpin AG Facilities 公司, 瑞士)。反相制备高效液相色谱为 LC 3000 HPLC 仪系统 (北京创新通恒科技有限公司), 配置 P3050 二元泵, CXTH-3000 色谱工作站; 色谱柱为 Phenomenex Prodigy ODS (250 mm×21.2 mm, 10 μm; Phenomenex Inc. 公司, 美国); Galaxy B 型 CO₂ 气体培养箱 (英国 RS Biotech 公司); JJT-1300 型超净工作台 (北京昌平长城空气净化公司); UV_{max} Kinetic Microplate Reader (Molecular Dynamics, Inc. 公司, 美国); XDS-1 倒置显微镜

(重庆光电仪器总公司); HZS-H 型恒温水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); TGL-16C 型高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板 (TLC) 分别为青岛海洋化工厂和 Merck 公司产品; 200~300 目柱色谱用硅胶为青岛海洋化工厂产品; 96 孔板和 25 cm² 细胞培养瓶购自美国 Corning Costar 公司。

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA (trypsin-EDTA)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco[®] Laboratories 公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、吲哚美辛、姜黄素、二甲基亚砷 (DMSO)、Griess 试剂、LPS 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 双抗 (penicillin-streptomycin solution) 购自美国 HyClone 公司; 实验用超纯水系美国 Millipore 纯水机制备; 分析纯乙醇、环己烷、丙酮等为北京化工厂产品; 色谱纯乙腈为美国 Fisher Chemical 公司产品。

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 及小鼠小胶质细胞 BV2 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

川芎药材于 2015 年 5 月 20 日采自彭州市敖平镇兴全村, 经北京大学杨秀伟教授鉴定为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 凭证标本 (20150520CXR) 存放在北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

川芎根茎干燥粉末 (10.5 kg) 用 95% 乙醇水溶液 (20 L) 冷浸 72 h, 共提取 8 次, 减压回收有机溶剂, 得到 1.5 kg 提取物。将提取物经硅胶柱色谱分段, 洗脱条件为环己烷-丙酮 (100:1、80:1、50:1、30:1、15:1、5:1、1:1), 经 TLC 检测合并相同或类似组分得到 7 个流分 Fr. 1~7。Fr. 2 (3.0 g) 经硅胶柱色谱, 环己烷-丙酮 (10:1) 洗脱, TLC 检测合并得到 5 个流分 (Fr. 2.1~2.5)。Fr. 2.1 (100 mg) 经制备液相分离, 乙腈-水梯度洗脱, 得到化合物 **1** [80% 乙腈-水, 保留时间 (t_R) = 25.540 min, 3.67 mg]、**2** (90%~95% 乙腈-水, t_R = 76.207 min, 4.06 mg)、**3** (95% 乙腈-水, t_R = 99.360 min, 3.43 mg)。

2.2 细胞培养液和其他溶液的配制

DMEM-15 培养液: 取 FBS 75 mL 加不完全

DMEM 培养液至 500 mL。

DMEM-10 培养液: 取 FBS 50 mL 加不完全 DMEM 培养液至 500 mL。

Griess 显色剂: 取 Griess 试剂 10 g, 加超纯水定容至 250 mL。

LPS 溶液: 取 LPS 1 mg, 加 PBS 至 1 mL 制备储备液; 将 200 μ L 储备液加培养基至 50 mL 制备工作液。

MTT 工作液: 取 MTT 粉末加 PBS 配制成 5 mg/mL 的工作液, 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌。

三联液: 取 10 g 十二烷基磺酸钠 (SDS)、5 mL 异丙醇、0.1 mL 浓盐酸, 超纯水定容至 100 mL。

受试化合物溶液的配制: 精密称取待测化合物, 加入适量体积的 DMSO, 配制成质量浓度为 10 mg/mL 的储备液, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。实验过程中, 用完全 DMEM-10 培养液稀释成实验所需质量浓度。

2.3 化合物对 RAW264.7 细胞 NO 生成的影响

2.3.1 细胞培养 用完全 DMEM-15 培养基复苏冻存的 RAW264.7 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞状态、生长速度正常后, 改用完全 DMEM-10 培养液培养, 每天换液, 待细胞在细胞瓶中生长达到 80% 时传代, 传代比例为 1:3~1:5。

2.3.2 MTT 法测定细胞存活率 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 用移液器轻柔吹打成细胞悬液, 用完全 DMEM-10 培养液调整细胞密度为 3×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中 (边缘用无菌水填充), 每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下温孵培养 12 h 后, 给药组分别加入不同浓度的待测样品 (终浓度分别为 12.5、25.0、50.0、100.0、150.0、200.0 μ mol/L), 同时每种药物均设加入或不加入 LPS (1 g/mL) 两组。溶剂对照组均不加入受试药物及 LPS, 但加入 DMSO, 体积分数为 0.1%; 调零组只加入培养液, 不加细胞以调零。每组设 3 个平行孔。继续温孵培养 24 h 后, 每孔取出 100 μ L 上清, 向原培养板加入 100 μ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 MTT (终质量浓度为 0.5 mg/mL) 工作液。继续温孵培养 4 h 后, 每孔加入三联液 100 μ L, 培养箱中放置 10 h。用酶标仪测定 492 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。为保证结果的可靠性及实验的稳定性, 所有实验在相同条件下重复 3 次。

$$\text{存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.3.3 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 NO

模型的建立 取对数生长期 RAW264.7 细胞, 用移液器轻柔吹打成细胞悬液, 用完全 DMEM-10 培养液调整细胞密度为 3×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中 (边缘用无菌水填充), 每孔 100 μ L。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下温孵培养 12 h 后加入 50 μ L 不同质量浓度的待测样品, 待细胞和待测样品孵育 1 h 后, 加 50 μ L 质量浓度为 4 μ g/mL 的 LPS (终质量浓度 1 μ g/mL), 同时设模型组 (LPS+培养液)、阳性对照组 (吲哚美辛+LPS+培养液)、空白对照组 (培养液) 和调零对照组 (只加入培养液, 不加细胞以调零), 每组设 3 个平行孔, 继续温孵培养 24 h。每孔取上清 100 μ L 置于 96 孔板中, 加入 100 μ L 配制好的 Griess 试剂, 室温下反应 15 min, 酶标仪 540 nm 处测定 A 值。所获数据用 SPSS 16.0 软件统计处理, 计算抑制率, 求半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。为保证结果的可靠性及实验的稳定性, 所有实验在相同的条件下皆重复进行 3 次。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{模型}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{模型}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 BV2 细胞培养和实验过程

按“2.3”项下程序进行, 细胞换为 BV2 细胞, 阳性对照药换为姜黄素, 其余操作相同。

2.5 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。IC₅₀ 值采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末; ESI-MS m/z : 397 [M+H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.36 (1H, m, H-4a), 2.02 (1H, m, H-4b), 1.98 (1H, m, H-5a), 1.60 (1H, m, H-5b), 2.84 (1H, dd, J = 10.2, 8.6 Hz, H-6), 3.54 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-7), 5.18 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-8), 2.31 (2H, m, H-9), 1.49 (2H, m, H-10), 0.89 (3H, t, J = 7.6 Hz, H-11), 2.17 (1H, dd, J = 12.9, 2.2 Hz, H-3'a), 2.08 (4H, m, H-4', 5'), 5.91 (1H, m, H-6'), 6.07 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-7'), 1.84 (2H, brdd, J = 17.4, 3.9 Hz, H-9'), 1.44~1.53 (2H, m, H-10'), 0.94 (3H, t, J = 6.7 Hz, H-11'); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 168.0 (C-1), 147.7 (C-3), 155.5 (C-3a), 18.2 (C-4), 22.8 (C-5), 38.6 (C-6), 35.2 (C-7), 123.7 (C-7a), 113.6 (C-8), 28.1 (C-9), 22.3 (C-10), 13.8 (C-11), 173.1 (C-1'), 88.2 (C-3'), 44.6 (C-3'a), 22.5 (C-4'), 24.5 (C-5'), 131.0 (C-6'), 124.9 (C-7'), 49.7

(C-7'a), 208.0 (C-8'), 31.8 (C-9'), 15.5 (C-10'), 14.3 (C-11')。以上数据与文献报道一致^[6], 故鉴定化合物 **1** 为 *Z*-3',8',3'a,7'a-四氢-6,3',7,7'a-二聚藁本内酯-8'-酮, 化学结构见图 1。

化合物 **2**: 白色粉末; ESI-MS m/z : 379 $[M-H]^-$; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.86 (4H, m, H-4, 4'), 2.12 (2H, m, H-5 α , 5' α), 1.92 (2H, m, H-5 β , 5' β), 6.12 (2H, m, H-6, 6'), 5.82 (2H, brd, J =

10.0 Hz, H-7, 7'), 4.70 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-8, 8'), 2.15 (4H, m, H-9, 9'), 1.40 (4H, m, H-10, 10'), 0.90 (6H, t, J = 7.3 Hz, H-11, 11'); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.6 (C-1, 1'), 150.2 (C-3, 3'), 49.6 (C-3a, 3'a), 27.1 (C-4, 4'), 20.9 (C-5, 5'), 132.2 (C-6, 6'), 121.7 (C-7, 7'), 49.4 (C-7a, 7'a), 108.4 (C-8, 8'), 27.4 (C-9, 9'), 22.6 (C-10, 10'), 13.6 (C-11)。以上数据与文献报道一致^[7], 故鉴定化合物 **2** 为 *Z,Z'*-

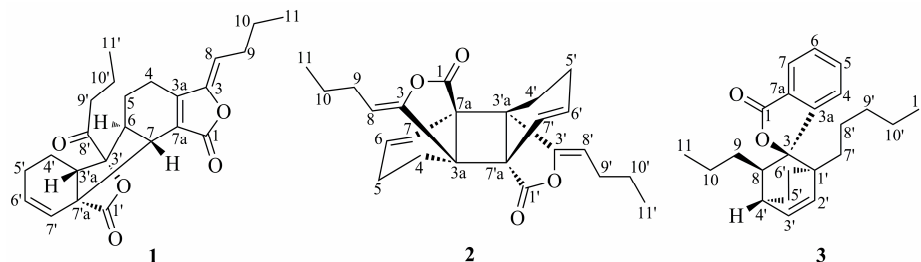


图 1 化合物 1~3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—3

3,3'a,7,7'a-二聚藁本内酯, 化学结构见图 1。

化合物 **3**: 淡黄色油状物 (丙酮); EI-MS 给出分子离子峰 m/z 338 $[M]^+$, HR-TOF-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 339.233 2 $[M+H]^+$ (计算值 339.232 4, $C_{23}H_{31}O_2$), 分子式为 $C_{23}H_{30}O_2$, 不饱和度为 9。化合物 **3** 的红外光谱显示甲基、次甲基吸收带 (2 921 cm^{-1}), 羰基 (1 728 cm^{-1}) 和酯基 C-O (1 204 cm^{-1}) 的强吸收带。根据 2D NMR (包括 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC、NOESY) 和 DEPT 实验全归属的化合物 **3** 的 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) 和 ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) 数据见表 1。NMR 谱中, δ_H 7.33 (1H, brd, J = 7.7 Hz, H-4), 7.57 (1H, td, J = 7.7, 1.0 Hz, H-5), 7.45 (1H, td, J = 7.6, 1.0 Hz, H-6), 7.80 (1H, brd, J = 7.6 Hz, H-7), 1.89 (1H, m, H-8), 1.14 (1H, m, H-9a), 1.45 (1H, m, H-9b), 0.93 (1H, m, H-10a), 1.18 (1H, m, H-10b), 0.76 (3H, t, J = 7.4 Hz, H-11); δ_C 171.1 (C-1), 92.2 (C-3), 155.0 (C-3a), 122.4 (C-4), 133.9 (C-5), 128.6 (C-6), 124.9 (C-7), 126.3 (C-7a), 50.3 (C-8), 29.1 (C-9), 21.1 (C-10), 14.2 (C-11) 为 3-正丁基苯酞的特征信号, 表明为当归萨螺内酯 (ansapirolide, **3a**) 结构片段^[8]。与当归萨螺内酯^[8]比较, 并结合 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC 和 DEPT 实验, 归属了图 1 所示化合物 **3** 的结构片段信号 δ_H 6.17 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-2'), 6.66 (1H, dd, J = 8.3, 7.0 Hz, H-3'), 2.66 (1H, m, H-4'), 1.32 (1H, m, H-5'a), 1.96 (1H, m, H-5'b),

表 1 化合物 3 的 1H - 和 ^{13}C -NMR 数据

Table 1 1H - and ^{13}C -NMR data of compound 3

碳位	δ_H (J in Hz)	δ_C (DEPT ^b)
1	—	171.1 s
3	—	92.2 s
3a	—	155.0 s
4	7.33 (1H, brd, 7.7)	122.4 d
5	7.57 (1H, td, 7.7, 1.0)	133.9 d
6	7.45 (1H, td, 7.6, 1.0)	128.6 d
7	7.80 (1H, brd, 7.6)	124.9 d
7a	—	126.3 s
8	1.89 (1H, m)	50.3 d
9	1.14 (1H, m), 1.45 (1H, m)	29.1 t
10	0.93 (1H, m), 1.18 (1H, m)	21.1 t
11	0.76 (3H, t, 7.4)	14.2 q
1'	—	45.0 s
2'	6.17 (1H, d, 8.3)	134.3 d
3'	6.66 ((1H, dd, 8.3, 7.0)	138.9 d
4'	2.66 (1H, m)	33.5 d
5'	1.32 (1H, m), 1.96 (1H, m)	18.4 t
6'	0.67 (1H, td, 12.7, 3.6), 0.97 (1H, m)	31.5 t
7'	1.23 (1H, m), 1.93 (1H, m)	26.1 t
8'	1.06 (1H, m), 1.20 (1H, m)	24.1 t
9'	1.02 (1H, m), 1.14 (1H, m)	32.6 t
10'	1.12 (1H, m), 1.17 (1H, m)	22.5 t
11'	0.78 (3H, t, 7.2)	13.9 q

^bDEPT NMR s-C d-CH t-CH₂ q-CH₃

0.67 (1H, td, $J = 12.7, 3.6$ Hz, H-6'a), 0.97 (1H, m, H-6'b); δ_C 45.0 (C-1'), 134.3 (C-2'), 138.9 (C-3'), 33.5 (C-4'), 18.4 (C-5'), 31.5 (C-6')。HMBC 谱 (图 2) 中 δ_H 6.66 (H-3') 与 δ_C 45.0 (C-1'), 50.3 (C-8) 呈现远程耦合也支持这一结论。DEPT 谱中剩余的 4 个亚甲基和 1 个甲基信号归属为 C-7'~11' 片段 (表 1)。在 HMBC 谱中, δ_H 0.78 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-11') 与 δ_C 22.5 (C-10'), 32.6 (C-9'); δ_H 1.12 (1H, m, H-10a) 和 1.17 (1H, m, H-10'b) 与 δ_C 24.1 (C-8'); δ_H 1.02 (1H, m, H-9'a) 和 1.14 (1H, m, H-9'b) 与 δ_C 26.1 (C-7'); δ_H 1.06 (1H, m, H-8'a) 和 1.20 (1H, m, H-8'b) 与 δ_C 45.0 (C-1'); δ_H 1.23 (1H, m, H-7'a), 1.93 (1H, m, H-7'b) 与 δ_C 92.2 (C-3) 呈现远程相关, 证明戊基结合在 C-1'。至此, 确定了化合物 3 的平面结构。

在化合物 3 的 NOESY 谱中呈现 H-4/H-6'a、H-8/H-5'a、H-6'a/H-5'a、H-6'b/H-5'b、H-9a/H-4'、H-9b/H-4' 相关性, 与当归萨螺内酯的一致^[8], 从而确定了化合物 3 的整体相对构型 (图 1)。图 3 所示的化合物 3 的可能生源途径也支持这一结论。

与已知化合物当归萨螺内酯相比, 化合物 3 少了其中的 1 个五元内酯环, 推测化合物 3 在生源上

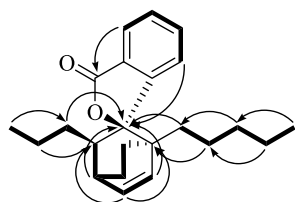


图 2 化合物 3 主要的 ^1H - ^1H COSY (—) 和 HMBC (—→) 相关

Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY (—) and HMBC (—→) correlations of compound 3

表 2 化合物 1~3 对 LPS 诱导的 RAW264.7 和 BV2 细胞模型 NO 生成抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Inhibitory activities of compounds 1—3 against LPS-activated NO production in RAW264.7 and BV2 cell models ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		抑制率/%	
	RAW264.7	BV2	RAW264.7	BV2
1	$31.60 \pm 2.62^*$	$21.99 \pm 4.40^{\#}$	72.61 ± 6.35^a	36.31 ± 5.88^b
2	$21.20 \pm 0.61^*$	$15.43 \pm 1.34^{\#}$	91.23 ± 6.12^a	42.35 ± 4.06^b
3	$30.12 \pm 2.90^*$	12.20 ± 3.40	63.84 ± 1.66^a	50.90 ± 2.85^b
吲哚美辛	54.62 ± 7.53	—	42.22 ± 5.27^a	—
姜黄素	—	10.58 ± 1.41	—	59.34 ± 3.36

与吲哚美辛组比较: $^*P < 0.01$; 与姜黄素比较: $^{\#}P < 0.05$; a 在 $50.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度; b 在 $12.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度

$^*P < 0.01$ vs indomethacin group; $^{\#}P < 0.05$ vs curcumin group; a at concentration of $50.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; b at concentration of $12.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

由当归萨螺内酯的其中 1 个五元内酯环开环, 并发生脱羧烷基化反应转化而来 (图 3)。化合物 3 为新化合物, 命名为川芎螺内酯 (chuanliguspirolide)。

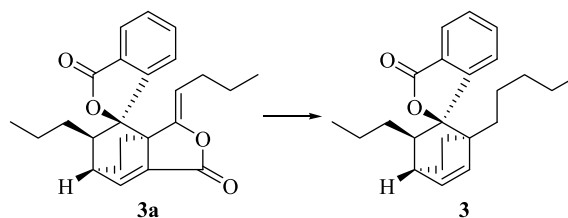


图 3 化合物 3 的可能生源途径

Fig. 3 Possible biosynthesis pathway of compound 3

3.2 抑制 NO 生成实验

MTT 法^[9]细胞存活和生长实验结果表明, 受试化合物 1~3 分别在浓度 $0.78 \sim 50.00$ 、 $0.78 \sim 25.00$ 和 $1.95 \sim 100.00 \mu\text{mol/L}$ 对 RAW264.7 和 BV2 细胞生长无影响, 细胞存活率大于 90%。实验体系中, 受试化合物溶剂 DMSO 的终体积分数小于 1%, 对细胞生长无影响。在 LPS 诱导 NO 生成的 RAW264.7 细胞模型中, 阳性对照药选用非选择性环氧合酶抑制剂吲哚美辛^[3,10-11], 抑制 NO 生成的 IC_{50} 值为 $(54.62 \pm 7.53) \mu\text{mol/L}$ 。在浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 1~3 显示了良好的 NO 生成抑制效果, 抑制率分别为 $(72.61 \pm 6.35)\%$ 、 $(91.23 \pm 6.12)\%$ 、 $(63.84 \pm 1.66)\%$, 吲哚美辛的抑制率为 $(42.22 \pm 5.27)\%$ 。化合物 1~3 的 IC_{50} 值分别为 (31.60 ± 2.62) 、 (21.20 ± 0.61) 和 $(30.12 \pm 2.90) \mu\text{mol/L}$, 皆小于阳性对照药, 且具有统计学意义 ($P < 0.01$), 结果见表 2。

在 LPS 诱导 NO 生成的 BV2 细胞模型中, 阳性对照药选用姜黄素^[12], 抑制 NO 生成的 IC_{50} 值为 $(10.58 \pm 1.41) \mu\text{mol/L}$ 。在浓度为 $12.50 \mu\text{mol/L}$ 时, 化

合物 **1**~**3** 显示出了一定的 NO 抑制效果, 抑制率分别为 $(36.31 \pm 5.88) \%$ 、 $(42.35 \pm 4.06) \%$ 、 $(50.90 \pm 2.85) \%$, 姜黄素的抑制率为 $(59.34 \pm 3.36) \%$ 。经计算, 化合物 **1**~**3** 的 IC_{50} 值分别为 (21.99 ± 4.40) 、 (15.43 ± 1.34) 、 $(12.20 \pm 3.40) \mu\text{mol/L}$, 具有一定的 NO 抑制活性。其中化合物 **3** 的 IC_{50} 值与阳性药姜黄素相比, 无显著性差异, NO 抑制活性与阳性药姜黄素相当, 结果见表 2。

4 讨论

本研究从川芎中分离鉴定出二聚苯酞类衍生物 Z-3',8',3'a,7'a-四氢-6,3',7,7'a-二聚藁本内酯-8'-酮 (**1**) 和 Z,Z'-3,3'a,7,7'a-二聚藁本内酯 (**2**), 以及 1 个新的丁苯酞衍生物, 命名为川芎螺内酯 (**3**), 丰富了川芎的化学结构类型多样性。尽管新化合物川芎螺内酯分子结构上不具备二聚苯酞类衍生物的结构特征, 但从生源上推测可能是川芎中当归萨螺内酯^[5]的五元内酯环开环、随后继发脱羧烷基化反应转化而来。二聚苯酞类衍生物是川芎中一类较具特征、结构多样的化合物^[3-5], 其他如川芎醇内酯 (chuanxiongrolide) A、B^[13]、R₁、R₂, 川芎二内酯 (chuanxiongdiolide) R₁、R₂^[14], 川芎内酯 (senkyunolide) O、P^[15]等, 由于我国已实现川芎的大规模规范化种植, 为这类化合物的新药研究与开发提供天然宝贵资源。

文献报道^[16]按 50 mg/kg 剂量给小鼠分别 ip 二聚藁本内酯 (diligustilide) 和东当归内酯 B (tokinolide B), 显示出镇静作用。本课题组前期研究^[3]发现欧当归内酯 A (levistolide A)、当归萨螺内酯和川芎醇内酯 (chuanxiongrolides) L1、L2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生 NO 具有明显的抑制作用, 本实验结果显示化合物 **1**~**3** 也具有相同的作用, 提示这类化合物可能是潜在的抗炎剂。

BV2 细胞系为 Blasi 等在 1990 年应用携带癌基因 v-raf/v-myc 的反转录病毒 J2 感染原代培养的小鼠小胶质细胞而获得的永生细胞系, 基本具备了原代培养的小胶质细胞的形态学、表型以及各项功能特点, 目前已被国内外许多学者应用于抗脑炎症药物的筛选^[17]。本实验评价了化合物 **1**~**3** 在 LPS 诱导的 BV2 细胞模型中抑制 NO 生成的活性。结果显示, 3 个化合物均显示出一定 NO 抑制作用, 其中化合物 **3** 的活性最强, 与阳性药姜黄素活性相当。尽管化合物 **1** 和 **2** 对 NO 生成的抑制率低于姜黄素, 但仍显示一定的抑制活性。

文献报道^[18]连续 ig 给予大鼠川芎 70%乙醇水提取物, 可检测到入血成分川芎内酯 A、D、F、J、I、M、Q, E-丁烯基苯酞 (E-butylidenephthalide), Z-藁本内酯 (Z-ligustilide), E-藁本内酯 (E-ligustilide), 新川芎内酯和欧当归内酯 A 等。基于体内过程的中药有效成分和效应物质的发现策略^[19], 提示川芎中苯酞类衍生物在川芎心脑血管系统疾病治疗作用中的潜在贡献, 推测它们是川芎的生物活性物质基础之一。

参考文献

- [1] 杨秀伟. 中药物质基础研究是中药继承、发展、创新的关键科学问题 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3429-3434.
- [2] 吴琦, 杨秀伟. 国家中药材 GAP 基地产川芎挥发油化学成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(3): 276-280.
- [3] Wei W, Wu X W, Yang X W. Novel phthalide derivatives from the rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* and their inhibitory effect against lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(66): 61037-61046.
- [4] Wei W, Xu W, Yang X W. Two new phthalide dimers from the rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19(7): 704-711.
- [5] 韦玮, 徐巍, 杨秀伟. 规范化种植川芎化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3017-3025.
- [6] 苏东敏, 庾石山, 秦海林. 当归中新的二聚苯酞衍生物 [J]. 药学学报, 2005, 40(2): 141-144.
- [7] Yi L, Li P, Bi Z M. A new dimeric phthalide from *Angelica sinensis* [J]. *Chin Chem Lett*, 2006, 17(12): 1579-1581.
- [8] Deng S X, Chen S N, Yao P, et al. Serotonergic activity-guided phytochemical investigation of the roots of *Angelica sinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(4): 536-541.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55-63.
- [10] Wei W, Wu X W, Deng G G, et al. Anti-inflammatory coumarins with short-and long-chain hydrophobic groups from roots of *Angelica dahurica* cv. Hangbaizhi [J]. *Phytochemistry*, 2016, 123(3): 58-68.
- [11] Deng G G, Wei W, Yang X W, et al. New coumarins from the roots of *Angelica dahurica* var. *formosana* cv. *Chuanbaizhi* and their inhibition on NO production in LPS-activated RAW264.7 cells [J]. *Fitoterapia*, 2015,

- 101: 194-200.
- [12] Zhang Y N, Yang Y F, Yang X W. Blood-brain barrier permeability and neuroprotective effects of three main alkaloids from the fruits of *Euodia rutaecarpa* with MDCK-pHaMDR cell monolayer and PC12 cell line [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 82-87.
- [13] Li Y H, Peng S L, Zhou Y, *et al*. Two new phthalides from *Ligusticum chuanxiong* [J]. *Planta Med*, 2006, 72(7): 652-656.
- [14] Huang J, Lu X Q, Zhang C, *et al*. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Fitoterapia*, 2013, 91: 21-27.
- [15] Naito T, Katsuhara T, Niitsu K, *et al*. Phthalide dimers from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. *Heterocycles*, 1991, 32(12): 2433-2442.
- [16] Leon A, Toscano R A, Tortoriello J, *et al*. Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri*; sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25(13): 1234-1242.
- [17] Henn A, Lund S, Hedtjarn M, *et al*. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation [J]. *Altex*, 2009, 26(2): 83-94.
- [18] Zuo A H, Wang L, Xiao H B, *et al*. Identification of the absorbed components and metabolites in rat plasma after oral administration of *Rhizoma Chuanxiong* decoction by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(5): 1046-1056.
- [19] 杨秀伟. 基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 365-370.

• 封面图片介绍 •

东北土当归花序



东北土当归 *Aralia continentalis* Kitag. 为五加科楸木属植物, 又称长白楸木、香桔颗; 多年生草本, 地下有块状根茎; 地上茎高达 1 m, 上部有灰色细毛。圆锥花序大, 长达 55 cm, 顶生或腋生, 分枝紧密, 主轴及分枝有灰色细毛; 伞形花序直径 1.5~2.0 cm, 有花多数; 总花梗长 1~2 cm, 有毛; 苞片卵形, 先端尖, 边缘膜质, 有纤毛, 长 1.5~2.0 mm; 花梗粗短, 长 5~6 mm, 稀长达 1 cm, 有毛, 小苞片披针形, 长约 1 mm, 有毛; 萼无毛, 长 1.5 mm, 边缘有 5 个三角形尖齿; 花瓣 5, 三角状卵形, 长 2 mm; 雄蕊 5, 长 2.5 mm; 子房 5 室; 花柱 5, 基部合生, 顶端离生。

东北土当归分布在朝鲜、俄罗斯以及中国吉林、辽宁、陕西、西藏、四川、河南、河北等地, 生长于海拔 800~3 200 m 的地区, 常生于森林下和山坡草丛中, 目前尚未由人工引种栽培。东北土当归以根入药, 性味辛、温, 入肝经, 具有祛风解表、活血化瘀等功效, 用于外感风寒、月经不调、血滞经闭、产后瘀滞腹痛、心腹疼痛、症瘕积聚等证。