

接骨木中的酚酸类化合物及其对大鼠类成骨细胞 UMR106 增殖及分化的影响

杨序娟¹, 黄文秀², 王乃利^{1,3}, 陈新滋², 姚新生^{1,4*}

(1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 香港理工大学 应用生物及化学系, 香港; 3. 清华大学深圳研究生院 生命学部, 广东 深圳 518055; 4. 深圳中药及天然药物研究中心, 广东 深圳 518055)

摘要:目的 研究接骨木 *Sambucus williamsii* Hance 中抗骨质疏松的活性成分, 及其对 UMR106 类成骨细胞增殖和分化的影响。方法 以大鼠类成骨细胞 UMR106 的增殖为指导活性成分分离的指标, 利用各种分离手段追踪分离接骨木茎枝 60% 乙醇提取物活性部位的化学成分, 并利用光谱学方法鉴定其结构, 检测对 UMR106 细胞增殖和分化的影响。结果 从接骨木中分离得到了 7 个酚酸类化合物, 分别鉴定为香草醛(vanillin, I)、香草乙酮(acetovanillone, II)、松柏醛(coniferyl aldehyde, III)、丁香醛(syringaldehyde, IV)、对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid, V)、对羟基桂皮酸(4-hydroxycinnamic acid, VI)、原儿茶酸(proto catechuic acid, VII)。检测了化合物 I、III~V 和 VII 对 UMR106 细胞活性的影响。结论 7 个酚酸类化合物均为首次从接骨木中分离得到, 化合物 IV 可同时促进 UMR106 细胞的增殖和分化, 化合物 I 和 II 可促进细胞的增殖, 化合物 V 和 VII 可促进细胞碱性磷酸酶活性。

关键词:接骨木; 酚酸; UMR106 细胞; 增殖及分化

中图分类号:R284.1; R285

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1604-04

Effect of phenolic acids isolated from *Sambucus williamsii* on proliferation and differentiation of rat osteoblastic UMR106 cells

YANG Xu-juan¹, WONG Man-sau², WANG Nai-li^{1,3}, CHAN Sun-chi², YAO Xin-sheng^{1,4}

(1. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong

SAR, China; 3. Department of Life Science, Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University,

Shenzhen 518055, China; 4. Shenzhen Research Center of Traditional Chinese Medicine

and Natural Products, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective To study the antiostoporotic constituents in the stems of *Sambucus williamsii* and the effects of isolated compounds on proliferation and differentiation of the rat osteoblastic UMR106 cells. **Methods** Guided by the bioactivity on rat osteoblastic UMR106 cells, the constituents in the 60% ethanol extract of the stems of *S. williamsii* were further separated with chromatographic methods. The structure of isolated compounds was identified by spectral analysis; their effects on the proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activities of UMR106 cells were observed. **Results** Seven phenolic acids and their derivatives were obtained, including vanillin (I), acetovanillone (II), coniferyl alcohol (III), syringaldehyde (IV), 4-hydroxybenzoic acid (V), 4-hydroxycinnamic acid (VI), protocatechuic acid (VII). The effects of compounds I, III-V, and VII on proliferation and ALP activities of UMR106 cells were determined. **Conclusion** These compounds are isolated from *S. williamsii* for the first time. Compound IV shows stimulating effects on both proliferation and ALP activities of UMR106 cells. Compounds I and III could only stimulate UMR106 cell proliferation while compounds V and VII could only induce ALP activities.

Key words: *Sambucus williamsii* Hance; phenolic acids; UMR106 cells; proliferation and alkaline phosphatase activities

收稿日期: 2005-02-11

基金项目: 香港特别行政区大学教育资助委员会 the Area of Excellence Scheme 项目(AOE/r-10/01)

作者简介: 杨序娟(1977-), 女, 土家族, 贵州省铜仁市人, 沈阳药科大学在读博士生。 Tel: (0755)26036133 Fax: (0755)26036131

E-mail: zyangxujuan2004@yahoo.com.cn

* 通讯作者 姚新生 Tel: (0755)26036137 Fax: (0755)26036131 E-mail: yaoxs@sz.tsinghua.edu.cn yaoxinsheng@163.net

接骨木是忍冬科接骨木属植物接骨木 *Sambucus williamsii* Hance 的茎枝, 分布于东北、华北、华中、华东、四川、云南等地, 主产于江苏, 是我国传统的民间用药, 用于治疗风湿筋骨疼痛^[1]。骨质疏松 (osteoporosis) 是多种原因引起的代谢性骨疾病, 以低骨量、骨组织微环境退化、骨脆性增加、易发生骨折为特征^[2]。骨质疏松在老年人中发病率很高, 严重影响了老年人的生活质量。尤其是绝经后妇女, 由于雌激素缺乏, 是骨质疏松的高发人群。近20年来, 骨质疏松的治疗已经得到了重视, 但是还没有发现疗效好、不良反应少的治疗药物。

在本实验室进行的动物体内实验表明, 去卵巢致骨质疏松大鼠口服接骨木 60% 乙醇提取物 3 个月, 骨密度指标、骨组织形态计量学指标、骨生物力学指标以及生化指标均得到不同程度的改善。同时, 在本实验室以大鼠类成骨细胞 UMR106 增殖为指标筛选有抗骨质疏松活性的中药时, 接骨木 60% 乙醇提取物也显示出良好的活性。因此以该指标指导接骨木 60% 乙醇提取物的化学分离, 从中得到了 7 个酚酸类化合物, 通过光谱学方法鉴定了它们的结构, 并检测了它们对 UMR106 细胞增殖和分化的影响。

1 材料和仪器

瑞士 Bruker AV-400 核磁共振光谱仪, 瑞士 Bruker esquire 2000 质谱仪, 日本岛津分析、制备型高效液相仪, 硅胶 G60 (青岛海洋化工有限公司), Sephadex LH-20 (Advanced Technology 工业有限公司), ODS (40~75 μm , Fuji Silysia 有限公司)。

大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞购自 American Type Culture Collation, 序号 CRL-1661。DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养液, FBS (Fetal Bovine Serum, 胎牛血清) 和 0.5% 胰酶-5.3 mmol/L EDTA (10 \times) 购自 Gibco 公司, 青霉素及链霉素 (100 \times) 购自 Invitrogen 公司, 24 孔板、96 孔板和细胞培养皿 (100 \times 20 mm) 购自 Falcon 公司, MTT 购自 Sigma 公司, 4-硝基苯磷酸二钠盐含六水购自 Fluka 公司, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购自 Bioasia 有限 (中国) 公司, Triton X-100 和 Tris 购自 Amresco 公司, 考马斯试剂购自 Bio-Rad 公司。

接骨木由沈阳药科大学江泽荣教授采自沈阳并鉴定为接骨木 *S. williamsii* Hance 的茎枝, 留样 (YYXJSW-2003) 保存于深圳中药及天然药物研究中心。

2 提取与分离

接骨木 (30 kg) 经适当粉碎后, 用 60% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 3 h。减压浓缩回收溶剂后, 取部分浸膏混悬于水中, 依次经氯仿、醋酸乙酯和正丁醇萃取。氯仿萃取部位经两次硅胶柱色谱分离, 分别用环己烷-醋酸乙酯、氯仿-甲醇洗脱, 活性部位经 Sephadex LH-20 柱色谱分离后, 再经 ODS 柱色谱分离, 制备型 HPLC 分离后得到化合物 I~IV。醋酸乙酯萃取部位经硅胶柱色谱分离, 用氯仿-甲醇洗脱, 再经 Sephadex LH-20 柱色谱分离和 ODS 柱色谱分离, 制备型 HPLC 得到化合物 V~VII。

3 细胞活性实验

3.1 UMR106 细胞增殖实验: 细胞以 7 500 个/孔的密度接种于 96 孔板, 以 5% FBS/DMEM 培养液培养 24 h 后换成无血清培养液再培养 24 h, 然后加入不同浓度化合物共培养。24 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL 培养 4 h, 以 DMSO 溶解形成的甲锇, 于 575 nm 测定吸光度 (A) 值。

3.2 UMR106 细胞的碱性磷酸酶 (ALP) 活性实验: 细胞以 37 500 个/孔的密度接种于 24 孔板, 以 5% FBS/DMEM 培养 3 d。化合物以 1% FBS/DMEM 稀释至不同的浓度加入板中培养 24 h。细胞以 PBS 清洗后加入 200 μL 裂解液, 冻融 3 次。40 μL 细胞裂解液与 ALP 反应液 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 于 405 nm 测定 A 值, 另外 40 μL 细胞裂解液用于测定细胞蛋白。ALP 活性以 $\Delta A (\text{min} \cdot \mu\text{g protein})$ 表示。

4 结构鉴定及活性实验结果

4.1 结构鉴定

化合物 I: 淡黄色胶状固体 (甲醇); ESI-MS: m/z 175.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 153.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 151.3 $[\text{M} - \text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 9.62 (1H, s, H-7), 7.32 (1H, br, s, H-2), 7.30 (1H, o, H-6), 6.82 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5), 3.80 (3H, s, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。与文献数据^[3]比较, 鉴定为香草醛。

化合物 II: 淡黄色胶状固体 (甲醇); ESI-MS: m/z 189.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 167.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 165.4 $[\text{M} - \text{H}]^-$; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ : 7.46 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-6), 7.42 (1H, s, H-2), 6.73 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5), 3.79 (3H, s, H-10), 2.42 (3H, s, H-8)。与化合物 I 相比, 相对分子质量增加 14, $^1\text{H-NMR}$ 缺少一个醛氢信号, 而增加了一个甲基信号 (δ 2.42, 3H)。从化学位移看出这个甲基应该是连接在羰基碳上, 因此, 化合物 II 鉴定为香草乙酮。

化合物 III: 淡黄色胶状固体(甲醇); ESI-MS: m/z 201.2 $[M + Na]^+$, 179.2 $[M + H]^+$, 177.2 $[M - H]^-$; ^1H-NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 9.66 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-9), 7.47 (1H, d, $J=15.7$ Hz, H-7), 7.14 (1H, br, s, H-2), 7.05 (1H, dd, $J=8.1$, 1.4 Hz, H-6), 6.74 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-5), 6.53 (1H, dd, $J=15.7$, 7.8 Hz, H-8), 3.79 (3H, s, H-10); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。与化合物 I 相比, 相对分子质量增加 26, 而 ^1H-NMR 增加一对反式烯氢信号, 其中的一个氢信号分裂为 dd 峰。而醛氢信号也分裂为 d 峰, 可见反式烯氢是与醛氢相连。因此, 化合物 III 鉴定为松柏醛。

化合物 IV: 淡黄色方晶(甲醇); ESI-MS: m/z 205.1 $[M + Na]^+$, 183.1 $[M + H]^+$, 181.1 $[M - H]^-$; ^1H-NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 9.64 (1H, s, H-7), 7.12 (2H, s, H-2 and H-6), 3.81 (6H, s, 2-OCH₃); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。 ^1H-NMR 信号显示两个苯环氢信号, 两个甲氧基信号, 呈对称结构。因此, 化合物 IV 鉴定为丁香醛。

化合物 V: 白色粉末(甲醇); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。与文献报道^[4]比较, 鉴定为对羟基苯甲酸。

化合物 VI: 白色粉末(甲醇); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。与化合物 V 比较, 相对分子质量增加 26, ^1H-NMR 增加一对反式烯氢信号。因此, 化合物 VI 鉴定为对羟基桂酸。

化合物 VII: 白色粉末(甲醇); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz) 数据见表 1。与文献报道^[4]比较, 鉴定为原儿茶酸。

表 1 化合物 I、III~VII 的 $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 100 MHz)

Table 1 $^{13}C-NMR$ data of compounds I and III-VII (CD_3OD , 100 MHz)

碳位	I	III	IV	V	VI	VII
C-1	130.1	131.5	129.2	123.1	127.3	123.5
C-2	110.8	111.7	108.3	133.0	131.1	117.4
C-3	149.2	149.0	149.7	116.0	116.8	146.0
C-4	153.7	152.0	143.8	163.2	161.1	151.4
C-5	115.9	116.2	149.7	116.0	116.8	115.7
C-6	127.5	126.2	108.3	133.0	131.1	123.8
C-7	192.4	155.7	192.9	170.4	146.4	170.6
C-8		124.7			115.9	
C-9		195.7			171.2	
C-10	55.9	56.0	56.9			

4.2 活性实验结果与讨论: 化合物 I、III~V、VII 对大鼠类成骨细胞 UMR106 增殖和碱性磷酸酶的影响见表 2。

表 2 化合物 I、III~V、VII 对 UMR106 细胞增殖和碱性磷酸酶活性的影响

Table 2 Effects of compound I, III-V, and VII on UMR106 cell proliferation and ALP activities

化合物	浓度	UMR106 细胞增殖活性/%	UMR106 细胞 ALP 活性/%
化合物 I	73.5 $\mu\text{mol/L}$	91.0 \pm 10.8	119.5 \pm 6.9
	7.35 $\mu\text{mol/L}$	111.0 \pm 9.4	80.1 \pm 15.4
	0.74 $\mu\text{mol/L}$	113.8 \pm 7.4*	61.0 \pm 9.6*
	73.5 nmol/L	142.6 \pm 8.4**	73.3 \pm 4.0*
	7.35 nmol/L	125.1 \pm 4.9**	72.3 \pm 13.7*
	对照	100.0 \pm 5.4	100.0 \pm 19.8
化合物 III	IGF-1 (10 $\mu\text{g/L}$)	120.7 \pm 4.5**	
	56.2 $\mu\text{mol/L}$	106.5 \pm 2.8	121.0 \pm 9.5
	5.62 $\mu\text{mol/L}$	117.0 \pm 7.0*	76.4 \pm 19.8
	0.56 $\mu\text{mol/L}$	122.3 \pm 5.8**	82.5 \pm 14.5
	56.2 nmol/L	117.2 \pm 2.6*	85.6 \pm 8.0
	5.62 nmol/L	120.9 \pm 2.7**	98.5 \pm 11.7
对照	100.0 \pm 6.3	100.0 \pm 19.8	
化合物 IV	IGF-1 (10 $\mu\text{g/L}$)	116.1 \pm 5.1**	
	54.9 $\mu\text{mol/L}$	128.8 \pm 2.2**	126.6 \pm 1.1**
	5.49 $\mu\text{mol/L}$	136.5 \pm 6.5**	92.7 \pm 8.4
	0.55 $\mu\text{mol/L}$	135.7 \pm 4.3**	78.7 \pm 7.8**
	54.9 nmol/L	133.1 \pm 6.1**	86.4 \pm 7.9*
	5.49 nmol/L	129.6 \pm 3.9**	86.2 \pm 1.5**
对照	100.0 \pm 4.9	100.0 \pm 8.3	
化合物 V	IGF-1 (10 $\mu\text{g/L}$)	120.9 \pm 5.1**	
	72.5 $\mu\text{mol/L}$	89.4 \pm 9.1	125.3 \pm 6.8**
	7.25 $\mu\text{mol/L}$	96.6 \pm 12.5	103.1 \pm 7.0
	0.73 $\mu\text{mol/L}$	86.7 \pm 8.5	105.9 \pm 5.1
	72.5 nmol/L	87.5 \pm 7.5	89.6 \pm 10.2
	7.25 nmol/L	83.6 \pm 13.6	96.5 \pm 8.6
对照	100.0 \pm 10.9	100.0 \pm 8.9	
化合物 VI	IGF-1 (10 $\mu\text{g/L}$)	127.5 \pm 14.0*	
	64.9 $\mu\text{mol/L}$	100.9 \pm 3.5	126.7 \pm 5.7**
	6.49 $\mu\text{mol/L}$	97.6 \pm 7.7	91.6 \pm 5.2
	0.65 $\mu\text{mol/L}$	110.3 \pm 14.8	94.1 \pm 3.8
	64.9 nmol/L	112.5 \pm 13.0	81.5 \pm 2.4*
	6.49 nmol/L	105.6 \pm 11.8	92.9 \pm 3.0
对照	100.0 \pm 6.1	100.0 \pm 9.7	
化合物 VII	IGF-1 (10 $\mu\text{g/L}$)	130.9 \pm 10.6**	

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每个浓度 3 个复孔, 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1, 10 $\mu\text{g/L}$) 作为细胞增殖的阳性对照。以 t 检验计算统计学意义, 与对照比较; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Results were expressed as $mean \pm sd$ from triplicate determinations; insulin-like growth factor-1 (IGF-1, 10 $\mu\text{g/L}$) was used as positive control in cell proliferation experiment; degree of statistical significance was determined by Student's t test

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

UMR106 细胞是一种大鼠骨肉瘤细胞, 但是具有成骨细胞的很多特性^[5~7]。从 20 世纪 80 年代至今, UMR106 细胞作为体外研究模型, 已经广泛地用于研究各种激素治疗骨质疏松的机制^[8,9]。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是多肽类的生长因子, 根据报道它可以促进

UMR106 细胞的增殖^[9],因此在本实验中用作阳性对照。成骨细胞产生的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)是成骨细胞分化的标志,而 Hsu 等首次从 UMR106 细胞中将该酶分离出来^[6]。所以化合物对 UMR106 细胞增殖和碱性磷酸酶的促进作用,可能预示化合物具有抗骨质疏松性质。

在本实验中化合物 IV 可同时促进 UMR106 细胞的增殖和分化,化合物 I 和 III 可促进细胞的增殖,化合物 V 和 VII 可促进细胞碱性磷酸酶活性。而化合物 II 和 VI 由于得量较少,无法进行活性测试。根据 Li 等的研究结果,香草醛和原儿茶酸可以抑制 PTH 诱导的新生小鼠颅骨吸收亢进^[10]。结合本实验结果,酚酸类化合物可能对成骨细胞和破骨细胞都具有调控作用。

致谢:本实验项目由香港特别行政区大学教育资助委员会 the Area of Excellence Scheme 资助(AOE/r-10/01)。原植物由沈阳药科大学江泽荣教授来自辽宁并鉴定为接骨木,ESI-MS 实验由本实验组高昊同学完成,本实验组解芳同学在细胞实验方面提供帮助,特此致谢。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Traditional Chinese Materia Medica* (中藥大辭典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2001.
[2] Akesson K. New approaches to pharmacological treatment

- of osteoporosis [J]. *Bull World Health Organ*, 2003, 81(9): 657-663.
[3] Zhang Q Y, Zhao Y Y, Liu X H, et al. Studies on chemical constituents of *Stelmatocrypton khasianum* (Benth.) H. Baill. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(2): 101-103.
[4] Wang X S, Che Q M, Li Y M, et al. A study on chemical constituents in seeds of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(12): 739-740.
[5] Forrest S M, Ng K W, Findlay D M, et al. Characterization of an osteoblast-like clonal cell line which responds to both parathyroid hormone and calcitonin [J]. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37: 51-56.
[6] Hsu H H, Rouse J, Hamilton J, et al. Purification and partial amino acid sequencing of rat bone tumor (UMR106) alkaline phosphatase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 13(3): 329-334.
[7] Williams G R, Bland R, Sheppard M C. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype, interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling [J]. *Endocrinology*, 1994, 135(6): 2375-2385.
[8] Gray T K, Flynn T C, Gray K M, et al. 17 β -Estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(17): 6267-6271.
[9] Leung K, Rajkovic I A, Peters E, et al. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(7): 2694-2702.
[10] Li H Y, Li J X, Prasain J K, et al. Antiosteoporotic activity of the stems of *Sambucus sieboldiana* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(6): 594-598.

三稜的化学成分研究(I)

袁 涛, 华会明*, 裴月潮

(沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 研究黑三稜 *Sparganium stoloniferum* 的化学成分。方法 用硅胶、Sephadex LH-20 柱色谱等方法进行分离纯化,通过理化性质及光谱数据结合化学反应确定化合物的结构。结果 分离得到 9 个化合物,分别鉴定为胡萝卜苷棕榈酸酯(I)、 β -谷甾醇棕榈酸酯(II)、24-亚甲基环阿尔廷醇(III)、6,7,10-三羟基-8-十八烯酸(IV)、香草酸(V)、对羟基苯甲醛(VI)、 α -棕榈酸单甘油酯(VII)、5-羟甲基糠醛(VIII)、 β -谷甾醇(IX)。结论 化合物 I~II 和 V~VII 均为首次从该属植物中分离得到。

关键词:黑三稜;胡萝卜苷棕榈酸酯; β -谷甾醇棕榈酸酯

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)11-1607-04

Chemical constituents of *Sparganium stoloniferum* (I)

YUAN Tao, HUA Hui-ming, PEI Yue-hu

(School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

收稿日期:2005-04-11

作者简介:袁 涛(1982-),男,江西高安人,在读硕士,2003年毕业于江西中医学院,现主要从事天然产物化学研究。

E-mail:chinayuantao@tom.com

* 通讯作者 华会明 Tel:(024)23986465 E-mail:huihua@163.com