

蛇床子化学成分及其对 UMR106 细胞增殖作用的影响

段绪红^{1,2}, 何培¹, 裴林^{1*}, 赵建成², 孟玉刚³

1. 河北省中医药科学院, 河北 石家庄 050030

2. 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050016

3. 河北工程大学, 河北 邯郸 056038

摘要: 目的 对蛇床子(蛇床 *Cnidium monnieri* 的干燥成熟果实)化学成分进行研究,并探讨所得化合物对类成骨细胞 UMR106 增殖的影响。方法 采用多种色谱柱技术进行分离纯化,通过波谱分析鉴定化合物结构。对所分离得到的化合物进行类成骨细胞 UMR106 增殖活性的测试。结果 从蛇床子 75%乙醇提取物中分离得到了 9 个化合物,分别鉴定为 5,7-二羟基-6,8-二甲氧基-2-甲基色原酮(1)、5-羟基-2-羟甲基色原酮(2)、(+)-marmesin(3)、佛手酚(4)、异佛手柑内酯(5)、7-羟基-8-异戊烯二氧基香豆素(6)、murraol(7)、松柏醛(8)、间-羟基苯甲酸(9)。样品溶液浓度为 1×10^{-10} mol/L, 化合物 1、3、7 对类成骨细胞 UMR106 的增殖促进率分别是 31.55%、32.39%和 30.87%。结论 化合物 1~6 为首次从蛇床属植物中分离得到。化合物 1、3、7 能促进 UMR106 细胞的增殖。

关键词: 蛇床子; UMR106 细胞; 细胞增殖; 5,7-二羟基-6,8-二甲氧基-2-甲基色原酮; 异佛手柑内酯; murraol

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-2993-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.006

Chemical constituents isolated from fruits of *Cnidium monnieri* and their effects on proliferation of UMR106 cells

DUAN Xu-hong^{1,2}, HE-Pei¹, PEI-Lin¹, ZHAO Jian-cheng², MENG Yu-gang³

1. Hebei Province Academy of Chinese Medicine Sciences, Shijiazhuang 050030, China

2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

3. Hebei University of Engineering, Handan 056038, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from the fruits of *Cnidium monnieri* and their effects on proliferation of UMR106 cells. **Methods** The constituents were separated by column chromatography, and their structures were elucidated by spectroscopic data analyses. The proliferation of all isolated compounds on osteoblast-like UMR106 cells was determined. **Results** Nine compounds were isolated and identified as 5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4H-chromen-4-one (1), 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-chromen-4-one (2), (+)-marmesin (3), bergaptol (4), isobergaptol (5), 7-hydroxy-8-(2',3'-dihydroxy-3'-methylbutyl)-coumarin (6), murraol (7), coniferyl aldehyde (8), and *m*-hydroxybenzoic acid (9). Compounds 1, 3, and 7 showed the significant proliferative activities on UMR106 cells lines at the concentration of 1×10^{-10} mol/L and the proliferative ratios were 31.55%, 32.39% and 30.87%. **Conclusion** Compounds 1—6 are isolated from the specie of *Cnidium* Cusson for the first time. Compounds 1, 3, and 7 increase UMR106 cells proliferation to some extent.

Key words: fruits of *cnidium monnieri*; UMR106 cells; proliferation; 5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4H-chromen-4-one; isobergaptol; murraol

蛇床子为伞形科(Umbelliferae)植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实,具有燥湿祛风、杀虫止痒、温肾壮阳的功效,主要用于

阴痒带下、湿疹瘙痒、湿痹腰痛、肾虚阳痿、宫冷不孕等症^[1]。现代药理实验研究发现蛇床子对各类骨质疏松症模型动物具有明显的防治作用,能显著

收稿日期: 2016-04-07

基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目(2014016)

作者简介: 段绪红(1982—),男,硕士,主管中药师,主要从事中药新药研究与开发。Tel: (0311)85362316 E-mail: duanxuhong@126.com

*通信作者 裴林,男,博士,主任中医师,博士生导师,主要从事中药资源开发与研究。E-mail: peilin148@163.com

减少类固醇激素所致骨丢失,抑制骨吸收,提高骨密度,并认为其活性部位是总香豆素和总黄酮类成分^[2]。同时,其化学成分的系统研究文献报道较少,为了进一步寻找活性成分,有效开发利用资源,本实验在前期研究^[3]的基础上,继续对其活性成分进行研究,从其中分离得到9个化合物。根据理化性质和波谱学数据分别鉴定为5,7-二羟基-6,8-二甲氧基-2-甲基色原酮(5,7-dihydroxy-6,8-dimethoxy-2-methyl-4*H*-chromen-4-one, **1**)、5-羟基-2-羟甲基色原酮(5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4*H*-chromen-4-one, **2**)、(+)-marmesin (**3**)、佛手酚(bergaptol, **4**)、异佛手柑内酯(isobergaptol, **5**)、7-羟基-8-异戊烯二醇基香豆素(**6**)、murrayol(**7**)、松柏醛(coniferyl aldehyde, **8**)、间羟基苯甲酸(*m*-hydroxybenzoic acid, **9**)。其中化合物**1**~**6**为首次从蛇床属植物中分离得到。并对所有分离得到的化合物进行了类成骨 UMR106 细胞增殖活性的测定,发现化合物**1**、**3**和**7**能一定程度促进 UMR106 细胞的增殖。

1 仪器与材料

电喷雾电离质谱(ESI-MS)使用 HP-1100LC/API/MSD 系统(美国 Agilent 公司); Bruker AV-500 核磁共振仪(德国布鲁克公司);二氧化碳培养箱(BPN-240CRH, 上海);柱色谱用硅胶(100~200、200~300 目,青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 凝胶(Pharmacia 公司);ODS 柱色谱材料(YMC 公司);LSA-10 型大孔树脂(西安蓝晓科技新材料股份有限公司);HPLC 分析及制备仪器型号为岛津 Shimadzu AB HPLC 仪(分析柱:Zorbax-C₁₈, 150 mm×4.6 mm, 10 μm;制备柱:Zorbax ODS, 250 mm×21.2 mm);UMR106 细胞(American Type Culture Collection, 序号 CRL-1661);酶标仪(Beckmann Coulter);17β-雌二醇(E₂, 美国 Sigma 公司);所用试剂均为化学纯或分析纯。

实验药材于2014年9月购于河北省安国市药材市场,产地为河北省沧州市,经河北师范大学赵建成教授鉴定为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实。标本(N20140901)现存放于河北省中医药科学院。

2 提取与分离

蛇床子干燥样品 30 kg,用 75%乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并 2 次提取液,减压回收溶剂至干,残留物加适量水分散,冷藏静置 24 h,离心,上清液通过 LSA-10 型大孔吸附树脂,依次用水和 70%

乙醇洗脱,合并醇洗脱液,回收溶剂至干,残留物减压干燥,加甲醇回流提取至提取液近无色,合并甲醇提取液,减压回收溶剂至干,残留物减压干燥,得干浸膏 160.8 g。上述干浸膏经硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇(100:1→1:1)梯度洗脱,根据 TLC 合并大致相同的组分,得到 7 个不同极性段组分:A(100:1)、B(50:1)、C(20:1)、D(10:1)、E(5:1)、F(3:1)、G(1:1)。对组分 A(10.3 g)进一步硅胶柱色谱分离,以石油醚-丙酮(5:1→1:1)进行梯度洗脱,得到 5 个组分 Fr. A1~A5, Fr. A2(2.3 g)硅胶柱色谱以石油醚-醋酸乙酯(10:1)洗脱,得化合物**1**(10 mg)。Fr. A5(1.9 g)用硅胶柱色谱进一步分离得到 6 个组分 Fr. A5-1~A5-6,其中 Fr. A5-2(0.3 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇洗脱)分离纯化,得到化合物**2**(9 mg)。对组分 B(7.3 g)进一步硅胶柱色谱分离,以二氯甲烷-丙酮(7:1→1:1)进行梯度洗脱,得到 7 个组分 Fr. B1~B7, Fr. B3(1.2 g)用硅胶柱色谱进一步分离得到 Fr. B3-4,再经 HPLC 纯化(70%乙腈-水,体积流量为 6 mL/min)得到化合物**4**(11 mg), Fr. B5(0.8 g)用硅胶柱色谱进一步分离得到 Fr. B5-2,再经 HPLC 纯化(30%乙腈-水,体积流量为 6 mL/min)得到化合物**3**(7 mg)和**6**(5 mg)。对组分 C(11.5 g)进一步硅胶柱色谱分离,以石油醚-丙酮(4:1)和二氯甲烷-甲醇(10:1)作为洗脱溶剂反复进行柱色谱分离,再经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇洗脱)分离纯化,得到化合物**5**(33 mg)。对组分 D(19.5 g)进一步硅胶柱色谱分离,以氯仿-丙酮(4:1→1:1)梯度洗脱得到 4 个组分 Fr. D1~D4, Fr. D4(2.5 g)首先经 Sephadex LH-20 柱色谱初步分离,以氯仿-甲醇(1:3)为洗脱溶剂,然后经硅胶柱色谱,以石油醚-丙酮(1:1)作为洗脱溶剂反复分离,得到化合物**7**(19 mg)。对组分 F(3.6 g)进一步硅胶柱色谱分离,以氯仿-甲醇(5:1→1:1)梯度洗脱得到 3 个流分 Fr. E1~E3, Fr. E2(1.0 g)首先以甲醇-水(3:1)为洗脱溶剂进行 ODS 柱色谱分离,再经 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇洗脱)分离纯化,得到化合物**8**(22 mg)。对组分 G(5.3 g)进一步硅胶柱色谱分离,共得到 5 个组分 Fr. G1~G5,其中 Fr. G4 经丙酮重结晶得到化合物**9**(31 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:无色针状结晶(甲醇);ESI-MS *m/z*:

253 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.67 (1H, s, 5-OH), 6.25 (1H, s, 7-OH), 6.19 (1H, brs, H-3), 3.78 (3H, s, 8-OMe), 3.74 (3H, s, 6-OMe), 2.38 (3H, s, 2-Me); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.6 (C-2), 107.5 (C-3), 182.2 (C-4), 102.5 (C-4a), 148.4 (C-5), 131.3 (C-6), 150.8 (C-7), 127.6 (C-8), 145.9 (C-8a), 60.7 (8-OMe), 60.2 (6-OMe), 19.9 (2-Me)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 鉴定化合物 **1** 为 5,7-二羟基-6,8-二甲氧基-2-甲基色原酮。

化合物 **2**: 无色粉末 (氯仿); ESI-MS *m/z*: 193 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.61 (1H, t, *J* = 8.5 Hz, H-7), 6.99 (1H, t, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.78 (1H, t, *J* = 8.5 Hz, H-8), 6.43 (1H, s, H-3), 4.51 (2H, s, H-11); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 171.1 (C-2), 105.7 (C-3), 183.6 (C-4), 110.2 (C-4a), 156.5 (C-5), 106.8 (C-6), 135.4 (C-7), 110.7 (C-8), 160.4 (C-8a), 60.1 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[5], 鉴定化合物 **2** 为 5-羟基-2-羟甲基色原酮。

化合物 **3**: 无色块晶 (甲醇); ESI-MS *m/z*: 247 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.58 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.23 (1H, s, H-5), 6.72 (1H, s, H-8), 6.18 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 4.72 (1H, dd, *J* = 9.1, 8.5 Hz, H-2'), 3.21 (2H, m, H-3'), 1.36 (3H, s, H-5'), 1.24 (3H, s, H-6'); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 161.4 (C-2), 112.3 (C-3), 143.6 (C-4), 112.8 (C-4a), 123.4 (C-5), 125.1 (C-6), 163.2 (C-7), 97.9 (C-8), 155.7 (C-8a), 91.1 (C-2'), 29.5 (C-3'), 71.6 (C-4'), 26.2 (C-5'), 24.3 (C-6')。以上数据与文献报道基本一致^[6], 鉴定化合物 **3** 为 (+)-marmesin。

化合物 **4**: 无色针晶 (甲醇); ESI-MS *m/z*: 203 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.24 (1H, s, 5-OH), 8.22 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.87 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2'), 7.16 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3'), 7.14 (1H, s, H-8), 6.25 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.3 (C-2), 110.8 (C-3), 139.7 (C-4), 104.5 (C-4a), 147.8 (C-5), 112.4 (C-6), 156.8 (C-7), 90.9 (C-8), 152.5 (C-8a), 144.8 (C-2'), 110.8 (C-3')。以上数据与文献报道基本一致^[7], 鉴定化合物 **4** 为佛手酚。

化合物 **5**: 白色棱晶 (丙酮); ESI-MS *m/z*: 217 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.20 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.61 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2'), 7.07 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-3'), 6.93 (1H, s, H-6), 6.35 (1H,

J = 9.5 Hz, H-3), 4.01 (3H, s, 5-OMe); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 160.9 (C-2), 112.1 (C-3), 139.7 (C-4), 105.8 (C-4a), 154.2 (C-5), 90.4 (C-6), 157.9 (C-7), 110.0 (C-8), 148.7 (C-8a), 144.3 (C-2'), 103.8 (C-3'), 56.2 (5-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 鉴定化合物 **5** 为异佛手柑内酯。

化合物 **6**: 白色棱晶 (氯仿); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.65 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.26 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 6.81 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.25 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 3.95 (1H, t, *J* = 5.0 Hz, H-2'), 3.25 (1H, dd, *J* = 2.5, 16.0 Hz, H-1'a), 2.79 (1H, dd, *J* = 7.5, 16.0 Hz, H-1'b), 1.44 (3H, s, H-5'), 1.36 (3H, s, H-4'); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 161.3 (C-2), 114.3 (C-3), 143.8 (C-4), 107.5 (C-4a), 126.7 (C-5), 112.4 (C-6), 156.4 (C-7), 112.1 (C-8), 153.6 (C-8a), 25.8 (C-1'), 68.4 (C-2'), 78.0 (C-3'), 22.1 (C-4'), 24.6 (C-5')。以上数据与文献报道基本一致^[9], 鉴定化合物 **6** 为 7-羟基-8-异戊烯二醇基香豆素。

化合物 **7**: 白色针晶 (醋酸乙酯); ESI-MS *m/z*: 261 [M+H]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.61 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.27 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 7.00 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6), 6.62 (1H, d, *J* = 16.5 Hz, H-1'), 6.25 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 3.95 (3H, s, 7-OMe), 1.46 (6H, s, H-4', 5'); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 160.8 (C-2), 112.9 (C-3), 143.8 (C-4), 112.8 (C-4a), 126.8 (C-5), 107.5 (C-6), 160.1 (C-7), 113.5 (C-8), 152.0 (C-8a), 114.2 (C-1'), 144.3 (C-2'), 71.5 (C-3'), 29.8 (C-4'), 29.8 (C-5'), 56.1 (7-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[10], 鉴定化合物 **7** 为 murraol。

化合物 **8**: 淡黄色粉末 (氯仿); 三氯化铁反应呈阳性, 提示有酚羟基; ESI-MS *m/z*: 201 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.62 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-9), 7.38 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 7.11 (1H, dd, *J* = 7.2, 2.0 Hz, H-5), 7.09 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3), 6.91 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6), 6.56 (1H, dd, *J* = 16.0, 7.8 Hz, H-8), 3.94 (3H, s, 2-OMe); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 149.1 (C-1), 147.1 (C-2), 109.5 (C-3), 126.8 (C-4), 124.3 (C-5), 115.0 (C-6), 153.3 (C-7), 126.5 (C-8), 193.8 (C-9), 56.1 (2-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[11], 鉴定化合物 **8** 为松柏醛。

化合物 **9**: 白色针状结晶 (丙酮), ¹H-NMR (500 MHz, C₅D₅N) δ: 10.86 (1H, brs, COOH), 8.25 (1H, d,

$J = 8.0$ Hz, H-6), 7.48 (1H, m, H-5), 7.17 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 6.93 (1H, brs, H-2); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ : 115.4 (C-1), 117.8 (C-2), 163.0 (C-3), 119.2 (C-4), 131.4 (C-5), 135.4 (C-6), 174.5 (COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[12], 鉴定化合物 **9** 为间羟基苯甲酸。

4 细胞毒活性研究

UMR106 细胞是大鼠骨肉瘤细胞系, 具有成骨细胞的特点, 自 20 世纪 70 年代以来, 作为体外研究模型, 广泛用于各种激素及药物对骨的作用机制研究^[13]。

细胞以 4 000 个/孔的密度接种于 96 孔板, 以体积分数为 10% FBS/DMEM 培养液培养 48 h, 换成体积分数为 5% Sfb/pf-DMEM 的培养基, 24 h 后加入浓度为 1×10^{-10} mol/L 的待测化合物共培养, 48 h 后每孔加入 2 g/L MTS 和 0.92 g/L PMS 混合溶液 100 μL 培养 2 h, 于 490 nm 下测定吸光度 (A) 值, 以 A 来评价细胞的增殖情况。每次测定均需同时测定对照组与阳性组, 阳性组选取浓度为 1×10^{-10} mol/L 的雌二醇 (E_2)^[14]。按照公式计算细胞增殖促进率。

$$\text{细胞增殖促进率} = A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}} - 1$$

结果表明, 在 1×10^{-10} mol/L 的条件下, 化合物 **1**、**3**、**7** 能促进 UMR106 细胞的增殖, 增殖促进率分别为 31.55%、32.39% 和 30.87%, 其余化合物的促进率均不明显。同等条件下, E_2 的细胞增殖促进率为 21.3%。活性测试结果说明蛇床子中除了香豆素类化合物外, 部分色原酮类化合物也具有一定程度的抗骨质疏松活性, 为后续蛇床子抗骨质疏松活性的物质基础研究提供了参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 陈 艳, 张国刚, 余仲平. 蛇床子的化学成分及药理作

用的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 256-260.

[3] 段绪红, 张玉卓, 何 培, 等. 蛇床子中的色原酮类化学成分及其对 UMR106 细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3310-3313.

[4] Anh D T P, Duong T B, Hoang V D. A new chromone from *Hymenocallis littoralis* Salisb. (Amaryllidaceae). [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(21): 1869-1872.

[5] Dai J, Krohn K, Draeger S, et al. New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea* [J]. *Eur J Org Chem*, 2009, 2009(10): 1564-1569.

[6] 谭俊杰, 蒋山好, 朱大元. 天山棱子芹化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 267-271.

[7] 卢 嘉, 金 丽, 金永生, 等. 中药杭白芷化学成分的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(3): 267-271.

[8] 孙希彩, 张春梦, 李金楠, 等. 紫花前胡的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2044-2047.

[9] 宋小妹, 吴立军, 曹军毅, 等. 长春七化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(6): 546-547.

[10] Riviere C, Goossens L, Pommery N, et al. Antiproliferative effects of isopentenylated coumarins isolated from *Phellolophium madagascariense* Baker. [J]. *Nat Prod Res*, 2006, 20(10): 909-916.

[11] 雍 妍, 黄 青, 王茹静, 等. 蜘蛛香化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3466-3470.

[12] 牛雪梅, 黎胜红, 纳 智, 等. 疏花毛萼香茶菜的化学成分研究 (英文) [J]. 中草药, 2003, 34(4): 300-303.

[13] Moseley J M, Suva L J. Molecular characterization of the EGF receptor and involvement of glycosyl moieties in the binding of EGF to its receptor on a clonal osteosarcoma cell line, UMR 106-06 [J]. *Calcif Tissue Int*, 1986, 38(2): 109-114.

[14] Bankson D D, Rifai N, Williams M E, et al. Biochemical effects of 17β -estradiol on UMR106 cells [J]. *Bone Miner*, 1989, 6(1): 55-63.