

覆盆子化学成分的分离鉴定及其新型大麻素 2 型受体激动剂的筛选和抗骨质疏松作用评价

陈昌伦, 胡思婧, 朱丽丽, 姚璐蒙, 王星星, 张安娜, 张巧艳, 秦路平*, 吴建军*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘要: 目的 以大麻素 2 型受体 (cannabinoid receptor type 2, CB2R) 为靶点, 从补肾中药覆盆子中分离、鉴定、筛选得到具有激动 CB2R 的激动剂, 并探讨其抗骨质疏松作用的机制。方法 以激动 CB2R 活性为导向进行分离并筛选, 采用正相硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、大孔树脂、重结晶和半制备型高效液相色谱对二氯甲烷层和醋酸乙酯层浸膏进行分离, 结合化合物理化性质和核磁共振波谱对分离得到的化合物进行结构鉴定。通过双荧光素酶方法筛选出具有可特异性激动 CB2R 的化合物, 并通过测定转染 CB2R 的人胚胎肾细胞 HEK293-CB2 内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 积聚水平和 CB2R 蛋白表达情况来验证筛选的化合物对 CB2R 的特异性激动活性, 最后评价筛选得到的化合物对破骨细胞骨代谢方面的调节作用。结果 以激动 CB2R 为活性导向进行分离和筛选, 共得到 24 个化合物, 分别鉴定为山柰酚 (1)、木犀草苷 (2)、银桦苷 (3)、金丝桃苷 (4)、橙皮素 (5)、刺芒柄花素 (6)、槲皮素 (7)、对羟基苯甲酸 (8)、迷迭香酸 (9)、对羟基苯甲酸乙酯 (10)、水杨酸 (11)、没食子酸 (12)、咖啡酸 (13)、原儿茶酸 (14)、鞣花酸 (15)、香草酸 (16)、loliolide (17)、对羟基苯甲酸甲酯 (18)、ethyl dioxindole-3-acetate (19)、苦苣苷 F1 (20)、科罗素酸 (21)、委陵菜酸 (22)、山楂酸 (23)、野鸦椿酸 (24)。双荧光素酶筛选体系从 24 个化合物中筛选得到 2 个新的 CB2R 激动剂 (化合物 5 和 8)。cAMP 和蛋白免疫印迹表明筛选得到化合物 5 和 8 对 CB2R 具有特异性激动活性和较好的亲和力, 可显著抑制破骨细胞的活性并影响其骨吸收功能。结论 化合物 2、5、6、9、13、14、17、19 为首次从中药覆盆子中分离得到。2 个新的 CB2R 激动剂 (化合物 5 和 8) 能特异地激动 CB2R 并增加 CB2R 蛋白的表达, 抑制给药刺激后 HEK293-CB2 细胞内 cAMP 的积累; 以 CB2R 依赖性对破骨细胞功能的正常发挥产生影响。

关键词: 掌叶覆盆子; 大麻素 2 型受体激动剂; 抗骨质疏松; 橙皮素; 对羟基苯甲酸甲酯; 木犀草苷; 刺芒柄花素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)02-0386-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.005

Isolation and identification of chemical constituents of *Rubi Fructus*, screening novel cannabinoid CB2 receptor agonist and evaluation of its anti-osteoporosis effect

CHEN Changlun, HU Sijing, ZHU Lili, YAO Lumeng, WANG Xingxing, ZHANG Anna, ZHANG Qiaoyan, QIN Luping, WU Jianjun

College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 311402, China

Abstract: Objective Cannabinoid type 2 receptor (CB2R) was used as a target to isolate, identify and screen agonists that stimulate CB2R from Fupenzi (*Rubi Fructus*), a traditional Chinese medicine for tonifying the kidney, and to explore the mechanism of its anti-osteoporosis effect. **Methods** Under the guidance of activating CB2R activity, dichloromethane layer and ethyl acetate layer extract were separated by normal phase silica gel column chromatography, microporous resin, recrystallization and semi-preparative high performance liquid chromatography. The structures of the isolated compounds were identified by physicochemical properties and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The compounds which can specifically activate CB2R were screened by double luciferase

收稿日期: 2023-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803794); 浙江中医药大学“5151 远志人才工程”经费 (No.112123A12201/001/004/019)

作者简介: 陈昌伦, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价与开发利用。E-mail: changlunchen@163.com

*通信作者: 秦路平, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源品质评价与开发利用。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

吴建军, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源品质评价与开发利用。E-mail: wjjpharmacy@163.com

method, and the activity of the selected compounds on the specific activation of CB2R was verified by measuring the accumulation level of cAMP and the expression of CB2R protein in HEK293-CB2. Finally, the regulatory effect of the selected compounds on bone metabolism of osteoclasts was evaluated. **Results** The isolation and screening was carried out using agonist CB2R, and a total of 24 compounds were obtained, which were identified as kaempferol (1), luteolin-7-*O*-glucoside (2), tiliroside (3), hyperoside (4), hesperetin (5), formononetin (6), quercetin (7), 4-hydroxybenzoic acid (8), rosmarinic acid (9), ethyl 4-hydroxybenzoate (10), salicylic acid (11), gallic acid (12), caffeic acid (13), protocatechuic acid (14), ellagic acid (15), vanillic acid (16), loliolide (17), methyl 4-hydroxybenzoate (18), ethyl dioxindole-3-acetate (19), nigaichigoside F1 (20), corosolic acid (21), tormentic acid (22), maslinic acid (23), and euscaphic acid (24). Two CB2R agonists (hesperetin and methyl 4-hydroxybenzoate) were screened from 24 compounds by double luciferase screening system. cAMP and Western blotting showed that the two compounds had specific activation activity and good affinity for CB2R, which could significantly inhibit the activity of osteoclasts and affect their bone resorption function. **Conclusion** Compounds 2, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 19 were isolated from *Rubi Fructus* for the first time. Two new CB2R agonists (hesperetin and 4-hydroxybenzoic acid) can specifically activate CB2R and increase the expression of CB2R protein, inhibit the accumulation of cAMP in HEK293-CB2 cells after administration, and affect the normal function of osteoclasts in a CB2R-dependent manner.

Key words: *Rubi Fructus*; cannabinoid type 2 receptor agonist; anti-osteoporosis; hesperetin; methyl 4-hydroxybenzoate; luteolin-7-*O*-glucoside; formononetin

《中国药典》2020 年版规定覆盆子为蔷薇科植物华东覆盆子（亦称为掌叶覆盆子）*Rubus chingii* Hu. 的干燥果实。覆盆子作为一种药食两用植物，在中国已有 1 500 多年的用药历史，并且常被作为补肾中药广泛用于中医临床上，其性微温，味甘酸，具有补肝明目、补肾固精、缩尿的功效。近年来，从覆盆子中以分离出 245 个化合物，包括黄酮类^[1-3]、萜类^[1-3]、生物碱类^[1-2]、甾体类^[1-2]、有机酸类^[1-2]等。中医理论中认为肾主骨、藏精、生髓^[4]，骨质疏松症的主要病机是肾精亏虚、骨髓减少。因此，从补肾中药覆盆子出发寻找有效的抗骨质疏松活性化合物是一条有效的途径。

大麻素 2 型受体（cannabinoid receptor type 2, CB2R）蛋白具有多种药理活性，包括镇痛、抗炎、抗纤维化以及抗骨质疏松^[5-8]。骨质疏松症是一种以成骨细胞形成新骨和破骨细胞对骨吸收代谢失衡所引起的以单位体积骨量减少、骨的微观结构退化为特征的全身性疾病。有研究表明 CB2R 与骨质疏松症有一定的联系^[9]。Ofek 等^[10]使用了一种合成特异性激动 CB2R 的激动剂 HU-308，并在去卵巢骨质疏松小鼠模型中评估该 CB2R 特异性激动剂在减少骨质丢失方面的潜力。

因此，本研究以 CB2R 为靶点进行活性导向分离，得到 24 个化合物，分别鉴定为山柰酚（kaempferol, 1）、木犀草苷（luteolin-7-*O*-glucoside, 2）、银槲苷（tiliroside, 3）、金丝桃苷（hyperoside, 4）、橙皮素（hesperetin, 5）、刺芒柄花素（formononetin, 6）、槲皮素（quercetin, 7）、对羟基

苯甲酸（4-hydroxybenzoic acid, 8）、迷迭香酸（rosmarinic acid, 9）、对羟基苯甲酸乙酯（ethyl 4-hydroxybenzoate, 10）、水杨酸（salicylic acid, 11）、没食子酸（gallic acid, 12）、咖啡酸（caffeic acid, 13）、原儿茶酸（protocatechuic acid, 14）、鞣花酸（ellagic acid, 15）、香草酸（vanillic acid, 16）、loliolide（17）、对羟基苯甲酸甲酯（methyl 4-hydroxybenzoate, 18）、ethyl dioxindole-3-acetate（19）、苦苣苷 F1（niga-ichigoside F1, 20）、科罗索酸（corosolic acid, 21）、委陵菜酸（tormentic acid, 22）、山楂酸（maslinic acid, 23）、野鸦椿酸（euscaphic acid, 24）。通过双荧光素酶筛选体系、cAMP 积聚水平、CB2R 蛋白表达来对分离得到的单体化合物进行进一步筛选和评价它们对 CB2R 的激动活性，并评估筛选的化合物对破骨细胞的调控作用，为进一步开发掌叶覆盆子提供科学依据。

1 材料

1.1 药材

覆盆子购买自浙江省磐安县，经浙江中医药大学药学院秦路平教授鉴定为蔷薇科植物掌叶覆盆子 *R. chingii* Hu. 的干燥未成熟果实，样品标本（20201201RBC）存放于浙江中医药大学药学院中药鉴定与品质评价实验室。

1.2 细胞

人胚胎肾细胞 HEK293（GNHu43）、小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7（TCM13）购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。HEK293-CB2 细胞和 HEK293-EGFP 细胞分别为转染稳定表达 CB2R 和

绿色荧光蛋白的细胞,由课题组前期实验研究获得,具体转染流程参考课题组前期实验研究^[1]。

1.3 试剂

DMEM 培养基(批号 8117161,美国 Gibco 公司)、青霉素-链霉素(批号 15140-122,美国 Gibco 公司)、FBS 胎牛血清(批号 10091-148,美国 Gibco 公司)、CCK-8 增殖检测试剂盒(ab228554,中国 Biosharp)、Western 及 IP 细胞裂解液(P0013,上海碧云天生物科技有限公司)、增强型 BCA 蛋白定量试剂盒(P0010,上海碧云天生物科技有限公司)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(RG028,上海碧云天生物科技有限公司)、腺苷酸环化酶激活剂 forskolin(S1612)、人环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)检测试剂盒(MM-0006H1,酶免生物有限公司)、CB2R 激动剂 HU308(ab254226,英国 Abcam 公司)、CB2R 抑制剂 AM630(GC10147,美国 GLP BIO 公司)、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(7074S,美国 CST 公司)、Beta-Tubulin Rabbit Ab(2146S,美国 CST 公司)、Anti-Cannabinoid Receptor II(ab3561,英国 Abcam 公司)。

1.4 仪器

半制备高效液相色谱仪(1200, Agilent 科技有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);双垂直电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);多功能酶标仪(美国 Bio-Tec 公司);倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 提取与分离

掌叶覆盆子未成熟果实(10 kg)粉碎后,过 100 目筛网,使用 95%的乙醇加热回流提取 3 次(每次 3 h),合并 3 次的醇提液并将醇提液浓缩至无醇味以获得浸膏。将浸膏(302.51 g)用 1 L 水使之悬浮,用等量的石油醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、正丁醇依次萃取,得到石油醚层浸膏(15.20 g)、二氯甲烷层浸膏(34.60 g)、醋酸乙酯层浸膏(39.20 g)和正丁醇层浸膏(57.30 g)。取醋酸乙酯层浸膏 35.00 g 经 100~200 目正相硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(30:1~5:1)和二氯甲烷-甲醇(70:1~0:1)梯度洗脱得到 7 组流分 Fr. 1~7。Fr. 7(4 579.62 mg)再经 300~400 目硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(3:1~1:1)梯度洗脱,得到 9 组流分 Fr. 7-1~7-9,其中 Fr. 7-6(99.10 mg)、Fr. 7-8(12.35 mg)、Fr. 7-9(171.82 mg)经半制备液相分离。Fr. 7-6 通过半

制备高效液相色谱,以甲醇-水(60:40)等度洗脱得到化合物 1(23.62 mg, t_R =13.5 min)。

Fr. 7-8 通过半制备高效液相色谱,以甲醇-水(45:55)等度洗脱,得到化合物 2(2.82 mg, t_R =9.3 min)。Fr. 7-9 通过半制备高效液相,以甲醇-水(40:60)等度洗脱,得到化合物 3(6.82 mg, t_R =7.2 min)和 4(10.52 mg, t_R =19.8 min)。Fr. 7-5(159.40 mg)经 300~400 目硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(5:1~2:1)梯度洗脱得到 3 组流分 Fr. 7-5-1~7-5-3。其中 Fr. 7-5-1(29.50 mg)通过以异丙醇-水混合体系进行重结晶得到化合物 5(7.93 mg)。Fr. 7-5-3(95.5 mg)通过 300~400 目正相硅胶,以石油醚-醋酸乙酯(3:1~1:1)洗脱得到 Fr. 7-5-3-1(21.74 mg)和 Fr. 7-5-3-2(16.25 mg)。Fr. 7-5-3-1 经半制备高效液相色谱,以甲醇-水(55:45)等度洗脱得到化合物 6(3.94 mg, t_R =24.7 min)。再将组分 Fr. 7-5-3-2 经半制备高效液相,以甲醇-水(40:60)等度洗脱得到化合物 7(5.27 mg, t_R =21.4 min)。Fr. 7-3(75.3 mg)通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以甲醇-水(20:80~100:0)为体系进行梯度洗脱,得到化合物 8(12.73 mg)。

取二氯甲烷萃取层浸膏 33.00 g,通过 100~200 目硅胶柱,以石油醚-醋酸乙酯(30:1~2:1)和二氯甲烷-甲醇(70:1~0:1)梯度洗脱共得到 9 组流分为 Fr. 1~9。Fr. 4(686.30 mg)经 300~400 目硅胶柱色谱,以石油醚-醋酸乙酯(8:1、6:1)梯度洗脱得到 3 组流分 Fr. 4-1~4-3。其中 Fr. 4-2(261.20 mg)通过半制备高效液相色谱,以甲醇-水(50:50)等度洗脱得到化合物 9(7.10 mg, t_R =13.7 min)和 10(4.27 mg, t_R =26.5 min)。Fr. 4-1(109.70 mg)溶于适量甲醇中,通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(50:50~0:100)为流动相梯度洗脱,得到化合物 11(17.92 mg)和 12(14.26 mg)。Fr. 4-3(136.71 mg)通过 300-400 目硅胶柱,以石油醚-醋酸乙酯(6:1、4:1、2:1)梯度洗脱得到 3 组流分 Fr. 4-3-1~4-3-3。其中 Fr. 4-3-3(36.82 mg)通过半制备型高效液相,以甲醇-水(55:45)等度洗脱得到化合物 13(5.28 mg, t_R =31.7 min)。

Fr. 5(180.10 mg)经 300~400 目正相硅胶柱,以石油醚-醋酸乙酯(10:1、6:1、4:1)梯度洗脱得到 5 组流分 Fr. 5-1~5-5。其中 Fr. 5-2(58.00 mg)再经 300~400 目硅胶柱,以石油醚-醋酸乙酯(7:1、4:1)梯度洗脱得到 2 组流分 Fr. 5-2-1~5-2-2,

将 Fr. 5-2-2 (25.17 mg) 通过半制备型高效液相, 以甲醇-水 (60:40) 等度洗脱, 得到化合物 **14** (4.92 mg, $t_R=16.4$ min)。Fr. 5-5 (95.70 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (4:1、1:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 5-5-1~5-5-3。将 Fr. 5-5-2 (38.27 mg) 继续通过 300~400 目正相硅胶柱, 以二氯甲烷-甲醇 (7:1、4:1) 梯度洗脱, 得到化合物 **15** (3.82 mg)。

Fr. 6 (1 356.00 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1、4:1) 梯度洗脱, 得到 7 组流分 Fr. 6-1~6-7。取 Fr. 6-4 (344.40 mg) 在经 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (7:1、5:1) 梯度洗脱, 得到 2 组流分 Fr. 6-4-1~6-4-2, 将 Fr. 6-4-2 (284.40 mg) 继续通过 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1、4:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 6-4-2-1~6-4-2-3。再将 Fr. 6-4-2-3 (63.92 mg) 通过半制备型高效液相色谱, 以甲醇-水 (45:55) 等度洗脱, 得到化合物 **16** (6.30 mg, $t_R=15.7$ min)。Fr. 6-6 (158.40 mg) 经 300~400 目正相硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (7:1) 等度洗脱得到 3 组流分 Fr. 6-6-1~6-6-3。Fr. 6-6-3 (83.30 mg) 通过 300~400 目正相硅胶, 以石油醚-醋酸乙酯 (5:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 6-6-3-1~6-6-3-3。Fr. 6-6-3-2 (41.43 mg) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以甲醇-水 (50:50~0:100) 梯度洗脱得到 2 组流分 Fr. 6-6-3-2-1~6-6-3-2-2。将 Fr. 6-6-3-2-2 (18.51 mg) 通过半制备型高效液相色谱, 以甲醇-水 (40:60) 等度洗脱得到化合物 **17** (6.50 mg, $t_R=29.4$ min)。

Fr. 7 (1 936.00 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱色谱, 以石油醚-醋酸乙酯 (5:1、3:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 8 组流分 Fr. 7-1~7-8。Fr. 7-2 (107.60 mg) 经 300~400 目正相硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (6:1) 等度洗脱, 得到 2 组流分 Fr. 7-2-1~7-2-2, 将组分 Fr. 7-2-2 (31.90 mg) 通过半制备型高效液相色谱, 以甲醇-水 (48:52) 等度洗脱, 得到化合物 **18** (7.24 mg, $t_R=34.3$ min)。将 Fr. 7-6 (272.90 mg) 经 300~400 目正相硅胶柱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (4:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 7-6-1~7-6-3。将 Fr. 7-6-3 (179.40 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱, 以二氯甲烷-甲醇 (5:1、2:1) 梯度洗脱得到 4 组流分 Fr. 7-6-3-1~7-6-3-4。再将 Fr. 7-6-3-4 (123.90 mg) 继续通过 300~

400 目正相硅胶柱, 以二氯甲烷-甲醇 (4:1、2:1) 梯度洗脱得到 2 组流分 Fr. 7-6-3-4-1 (36.31 mg)、Fr. 7-6-3-4-2 (52.92 mg)。将 Fr. 7-6-3-4-2 (52.92 mg) 通过半制备型高效液相, 以甲醇-水 (35:65) 等度洗脱, 得到化合物 **19** (5.10 mg, $t_R=42.7$ min)。

将 Fr. 7-7 (232.00 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (4:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 7-7-1~7-7-3。取 Fr. 7-7-3 (123.90 mg) 继续通过 300~400 目正相硅胶柱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (6:1、3:1) 梯度洗脱得到 4 组流分 Fr. 7-7-3-1~7-7-3-4。将 Fr. 7-7-3-3 (59.46 mg) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以甲醇-水 (45:55~0:100) 梯度洗脱得到 2 组流分 Fr. 7-7-3-3-1 和 Fr. 7-7-3-3-2。将组分 Fr. 7-7-3-3-2 (15.38 mg) 通过半制备型高效液相, 以乙腈-水 (36:64) 等度洗脱, 得到化合物 **20** (4.28 mg, $t_R=39.6$ min)。

Fr. 8 (1 345.00 mg) 通过 D101 大孔树脂, 以甲醇-水 (0:100~100:0) 梯度洗脱, 得到 5 组流分 Fr. 8-1~8-5。Fr. 8-4 (583.38 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (4:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 4 组流分 Fr. 8-4-1~8-4-4。Fr. 8-4-3 (182.30 mg) 经 300~400 目正相硅胶柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (5:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 8-4-3-1~8-4-3-3。Fr. 8-4-3-3 (31.73 mg) 在通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以甲醇-水 (40:60~0:100) 梯度洗脱, 得到化合物 **21** (4.72 mg)。

Fr. 8-4-4 (208.20 mg) 经 300~400 目正相硅胶柱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (4:1、2:1) 梯度洗脱, 得到 3 组流分 Fr. 8-4-4-1~8-4-4-3。将 Fr. 8-4-4-2 (35.96 mg) 通过半制备型高效液相色谱, 以乙腈-水 (42:58) 等度洗脱得到化合物 **22** (3.95 mg, $t_R=34.6$ min)。Fr. 8-4-4-3 (110.14 mg) 通过 300~400 目正相硅胶柱, 以石油醚-醋酸乙酯 (3:1) 等度洗脱得到 2 组流分 Fr. 8-4-4-3-1~8-4-4-3-2。继续将 Fr. 8-4-4-3-2 (63.73 mg) 通过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱, 以甲醇-水 (80:20) 等度洗脱得到 2 组流分 Fr. 8-4-4-3-2-1~8-4-4-3-2-2。再将 Fr. 8-4-4-3-2-2 (31.79 mg) 通过半制备型高效液相, 以甲醇-水 (45:55、30:70) 梯度洗脱得到化合物 **23** (3.72 mg, $t_R=26.7$ min) 和 **24** (4.18 mg, $t_R=11.4$ min)。

2.2 细胞培养

人胚胎肾细胞 HEK293 和小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 均使用含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素

双抗的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

破骨细胞由 RANKL 诱导液刺激 RAW264.7 细胞分化获得, RANKL 诱导液的配制为每 1 mL 培养液加入 5 μL RANKL (5 ng/mL)。向 RAW264.7 细胞中加入 RANKL 诱导液培养 5 d 来获得破骨细胞。

2.3 具有特异性激动 CB2R 活性化合物的筛选

2.3.1 CCK-8 检测细胞活性 将分离得到的 24 个化合物用二甲基亚砜 (DMSO) 配制母液 (质量浓度为 100 μg/μL), 在用培养基稀释为不同质量浓度的药液 (25、50、100 μg/mL), DMSO 在药液中的终体积分数在 0.1% 以下。将 HEK293-CB2 细胞以 3×10³ 的密度接种于 96 孔板中培养 24 h, 贴壁后加入不同质量浓度的药液培养 48 h 后用 CCK-8 法检测细胞活性, 使用多功能酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (*A*)。

2.3.2 阳性细胞筛选 将 HEK293-CB2 细胞以 3×10⁴ 的密度接种于 48 孔板上, 待细胞贴壁后饥饿培养 24 h。加入 1 μmol/L 的 CB2R 激动剂 HU308 和不同质量浓度的 24 个单体化合物药液处理细胞 6 h, 以正常加入培养基组为对照组, HU308 为阳性对照组, 24 个不同质量浓度单体化合物为实验组。使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测药物对 HEK293-CB2 细胞内 CB2R 的激活情况, 通过计算相对发光值来定量表示 CB2R 激动水平。

2.3.3 阴性细胞筛选 为了消除假阳性化合物的干扰, 将上一步中筛选得到的化合物用未转染 CB2R 的 HEK293-EGFP 阴性细胞进一步筛选。将 HEK293-EGFP 细胞以 3×10⁴ 的密度接种于 48 孔板上, 贴壁后饥饿培养 24 h, 用 1 μmol/L HU308 和不同质量浓度的 5 个单体化合物处理细胞 6 h, 通过计算相对发光值来确定 CB2R 的表达水平。

2.3.4 筛选的化合物对 CB2R 激动作用的特异性检测 使用 CB2R 抑制剂 AM630 验证化合物对 CB2R 的特异性激活作用。HEK293-CB2 细胞接种于 48 孔板 (3×10⁴ 个/孔)。贴壁后饥饿 24 h, 用 1 μmol/L AM630 和上一步筛选得到的 2 个单体化合物 (橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯) 处理细胞 6 h, 通过计算相对发光值来确定细胞内 CB2R 的激动情况。

2.4 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 CB2R 的激动作用分析

2.4.1 细胞内 cAMP 水平的测定 将 HEK293-CB2 细胞以 5×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 待细

胞贴壁后用 forskolin (腺苷酸环化酶激活剂) 刺激 HEK293-CB2 细胞内 cAMP 含量增加, 并饥饿处理 24 h, 分别加入 1 μmol/L HU308 和不同质量浓度 (0、25、100、200、400、800 μg/mL) 的橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯培养细胞 6 h, 细胞用 PBS 洗涤 2 次后, 加入细胞裂解液于冰上裂解细胞 30 min, 收集细胞裂解液以 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液。按照说明书用 cAMP 试剂盒测定细胞上清液中的 cAMP 水平。

2.4.2 Western blotting 检测 CB2R 蛋白表达 设置对照组、给药组 (100 μg/mL) 和给药+抑制剂 (1 μmol/L) 组。将 HEK293-CB2 细胞接种于 6 孔板中 (5×10⁵ 个/孔)。待细胞贴壁后饥饿处理 24 h, 给予细胞 100 μg/mL 的橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯处理 6 h。提取 HEK293-CB2 细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移到 PVDF 膜上。用封闭液封闭 PVDF 膜 2 h 后, 加入 CB2R 抗体 (1:500) 和 β-Tubulin 抗体 (1:1 000) 在 4 °C 下孵育过夜。用洗涤液清洗膜 3 次 (每次 10 min), 然后与相应二抗 (1:1 000) 在室温下孵育 1 h, 清洗 3 次后加入 BeyoECL 显影剂, 用 Monad QuickChemi 5100 化学发光仪分析蛋白条带并用 Image J 软件处理。

2.4.3 药物对细胞自身荧光的激活分析 使用已转染绿色荧光增强蛋白的 HEK293-CB2 细胞, 观察橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对细胞的激活作用, 细胞正常培养贴壁后给予药物处理 6 h, 吸弃培养基, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 将细胞置于荧光显微镜下观察细胞自身发出的绿色荧光。

2.5 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对破骨细胞的作用

2.5.1 破骨细胞活力和 TRAP 活性与染色测定 将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (6×10³ 个/孔) 中, 孵育 24 h, 再用橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯 (100 μg/mL) 处理细胞 48 h, 用 CCK-8 法检测细胞活力。

另外将 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板 (1×10⁴ 个/孔), 分为对照组、给药组 (100 μg/mL) 和给药+抑制剂 (1 μmol/L) 组。用化合物 (橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯) 和 RANKL 诱导液共处理细胞 5 d 后, 按照 TRAP 活性实验步骤检测破骨细胞的 TRAP 活性。

TRAP 反应液的制备: 将 40 mg 对硝基苯基磷酸二钠和 0.2 g 酒石酸钾钠混合均匀, 用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 3.5 后, 溶解于 15 mL 无菌水中, 在

加入无菌水定量至 20 mL。

按照上述转板方法进行 TRAP 染色,以鉴定破骨细胞,并在正置显微镜下观察药物对破骨细胞分化的影响。

2.5.2 破骨细胞 F-肌动蛋白环 (F-actin) 的免疫荧光染色 将 RAW264.7 细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种到直径 35 mm 的激光共聚焦培养皿中培养 24 h,设置对照组、给药组 (100 $\mu\text{g/mL}$) 和给药+抑制剂 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组。用 RANKL 诱导液稀释药物 (100 $\mu\text{g/mL}$) 和抑制剂 AM630,并给予细胞共培养 5 d。细胞用 PBS 清洗 2 次,在室温下用 4%多聚甲醛固定 30 min。去掉多聚甲醛后,用 PBS 洗涤 2 次,在室温下用 0.2% Triton X-100 处理 5 min,细胞用 PBS 洗涤 2 次,加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的鬼笔环肽染液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min,再次用 PBS 洗涤 2 次,DAPI 染色 5 min,细胞继续用 PBS 洗涤 2 次后,每皿加入 200 μL PBS 使细胞浸润,于激光共聚焦显微镜下观察破骨细胞的 F-actin 环结构。

2.5.3 破骨细胞骨吸收的测定 将牛皮质骨片浸泡在含 1%双抗的 PBS 溶液中。每小时更换 1 次 PBS,重复浸泡 3 次,将骨片于紫外线下照射 1 h 并按照 48 孔板孔径剪成圆形,置于 48 孔板中。RAW264.7 细胞接种于 48 孔板 (5×10^4 个/孔),培养贴壁。用 RANKL 诱导液将待测化合物 (橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯) 稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$,给予细胞培养 9 d,期间每隔 3 d 更换 1 次培养液。取出骨切片,用 PBS 清洗 2 次,用 2.5%戊二醛固定 10 min,在用 0.25 mol/L 氨水超声清洗 3 次 (每次 5 min),于室温下晾干。用 1%甲苯胺蓝染料染色 15 min,用超纯水清洗直到不再褪色,于显微镜下观察骨切片表面,并拍照记录。

2.6 数据分析

数据表示为 $\bar{x} \pm s$,所有实验均独立重复至少 3 次,用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),当 $P < 0.05$ 时表示数据具有显著性的统计学差异。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色粉末,易溶于甲醇,ESI-MS m/z 287.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$,相对分子质量 286,分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 8.07 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.89 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.16 (1H, d, $J =$

2.1 Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 177.3 (C=O), 165.5 (C-7), 162.4 (C-9), 160.5 (C-4'), 158.2 (C-5), 148.0 (C-2), 137.1 (C-3), 130.7 (C-2', 6'), 123.7 (C-1'), 116.3 (C-3', 5'), 104.5 (C-10), 99.3 (C-6), 94.5 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[12],故鉴定化合物 **1** 为山柰酚。

化合物 **2**: 黄色粉末,易溶于甲醇和乙醇,ESI-MS m/z 471.10 $[\text{M} + \text{Na}]^+$,相对分子质量 448,分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.99 (1H, s, 5-OH), 7.45 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.75 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.08 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 3.70 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-2''), 3.50~3.42 (2H, m, H-3'', 5''), 3.32~3.23 (2H, m, H-6''), 3.17 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.8 (C-4), 164.4 (C-2), 162.9 (C-7), 160.9 (C-5), 156.9 (C-9), 149.7 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.5 (C-1'), 119.2 (C-6'), 115.9 (C-5'), 113.5 (C-2'), 105.4 (C-10), 103.3 (C-3), 99.9 (C-1''), 99.5 (C-6), 94.8 (C-8), 77.2 (C-3''), 76.3 (C-5''), 73.1 (C-2''), 69.5 (C-4''), 60.5 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[13],故鉴定化合物 **2** 为木犀草苷。

化合物 **3**: 淡黄色结晶 (乙醇-水),易溶于甲醇,分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.98 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.40 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 7.30 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2'', 6''), 6.80 (4H, dd, $J = 15.5, 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.30 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.07 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'''), 5.25 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 4.30 (1H, dd, $J = 11.8, 2.3$ Hz, H-6''a), 4.19 (1H, dd, $J = 11.8, 6.7$ Hz, H-6''b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 179.4 (C-4), 168.8 (C-9'''), 165.9 (C-7), 162.9 (C-5), 161.5 (C-4'), 161.2 (C-4''), 159.4 (C-9), 158.4 (C-2), 146.5 (C-7'''), 135.2 (C-3), 132.2 (C-2', 6'), 131.2 (C-2'', 6''), 127.1 (C-1'''), 122.7 (C-1'), 116.8 (C-3''', 5'''), 116.0 (C-3', 5'), 114.8 (C-8'''), 105.6 (C-1''), 103.9 (C-10), 99.9 (C-6), 94.8 (C-8), 78.0 (C-5''), 75.8 (C-2''), 75.7 (C-3''), 71.7 (C-4'), 64.3 (C-6'')。以上数据与文献报道基本一致^[14],故鉴定化合物 **3** 为银椴苷。

化合物 **4**: 黄色粉末,易溶于甲醇、乙醇,ESI-MS m/z 465.10 $[\text{M} + \text{H}]^+$,相对分子质量 464,分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.67

(1H, dd, $J = 8.5, 2.3$ Hz, H-6'), 7.52 (1H, s, H-2'), 6.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, s, H-6), 5.38 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1), 5.16 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, 4-OH), 4.89 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, 2-OH), 4.51~4.42 (1H, m, H-4''), 3.64 (1H, dd, $J = 5.9, 3.4$ Hz, H-3''), 3.56 (1H, qd, $J = 7.0, 3.2$ Hz, H-6''), 3.45 (1H, ddt, $J = 7.8, 5.9, 3.8$ Hz, H-2'', 5''), 3.36 (4H, d, $J = 13.7$ Hz, H-4'), 3.33 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-2), 3.28 (1H, ddd, $J = 10.5, 8.0, 5.6$ Hz, H-3'); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.5 (C-4), 164.1 (C-7), 161.2 (C-5), 160.9 (C-2), 156.3 (C-9), 148.4 (C-4'), 144.8 (C-3'), 133.5 (C-3), 121.9 (C-1'), 121.1 (C-6'), 115.9 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.8 (C-1''), 98.6 (C-6), 93.5 (C-8), 75.8 (C-5''), 73.2 (C-3''), 71.2 (C-2''), 67.9 (C-4''), 60.1 (C-6''). 以上数据与文献报道基本一致^[15], 故化合物 **4** 鉴定为金丝桃苷。

化合物 **5**: 无色针状晶体 (甲醇), 易溶于甲醇、乙醇, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 6.94 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.93 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.90 (1H, dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, H-6'), 5.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.88 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.30 (1H, dd, $J = 12.8, 3.1$ Hz, H-2), 3.86 (3H, s, -OCH₃), 3.05 (1H, dd, $J = 17.1, 12.7$ Hz, H-3a), 2.70 (1H, dd, $J = 17.1, 3.1$ Hz, H-3b); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 197.6 (C=O), 168.3 (C-7), 165.4 (C-5), 164.7 (C-9), 149.3 (C-3'), 147.8 (C-4'), 133.1 (C-1'), 118.9 (C-6'), 114.5 (C-2'), 112.6 (C-5'), 97.1 (C-10), 96.2 (C-8), 80.3 (C-2), 56.4 (-OCH₃), 44.1 (C-3)。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **5** 为橙皮素。

化合物 **6**: 褐色粉末状, 易溶于甲醇、乙醇, 难溶于水, 分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.33 (1H, s, H-1), 7.97 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.50 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.98 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, H-6), 6.87 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 3.78 (3H, s, -OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 174.6 (C-4), 162.5 (C-7), 158.9 (C-4'), 157.4 (C-9), 153.1 (C-2), 130.0 (C-2', 6'), 127.3 (C-5), 124.2 (C-1'), 123.2 (C-3), 116.6 (C-10), 115.1 (C-6), 113.6 (C-5', C-3'), 102.1 (C-8), 55.1 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故化合物 **6** 鉴定为刺芒柄花素。

化合物 **7**: 黄色粉末, 不溶于水, 难溶于甲醇,

易溶于二甲基亚砷, ESI-MS m/z 303.05 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 相对分子质量 302, 分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.48 (1H, s, 5-OH), 7.68 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, H-6'), 6.89 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.41 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8'), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6) δ : 175.8 (C=O), 163.8 (C-7), 160.5 (C-5), 156.2 (C-9), 147.6 (C-4'), 146.8 (C-2), 144.9 (C-3'), 135.7 (C-3), 122.1 (C-1'), 120.1 (C-6'), 115.6 (C-5'), 115.1 (C-2'), 103.1 (C-10), 98.1 (C-6), 93.4 (C-8)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故化合物 **7** 鉴定为槲皮素。

化合物 **8**: 白色结晶 (甲醇-水), 微溶于水, 易溶于二甲基亚砷, 分子式 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.88 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, 5); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 170.1 (C-7), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.7 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **8** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **9**: 黄白色粉末, 易溶于水、甲醇、乙醇, 分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.61 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, H-5), 6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 5.18 (1H, dd, $J = 8.5, 4.2$ Hz, H-8'), 3.10 (1H, dd, $J = 14.3, 4.2$ Hz, H-7' α), 3.00 (1H, dd, $J = 14.4, 8.5$ Hz, H-7' β); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD₃OD) δ : 173.8 (C-9'), 168.5 (C-9), 149.7 (C-4'), 147.7 (C-7), 146.8 (C-3'), 146.2 (C-4), 145.3 (C-3), 129.4 (C-1'), 127.7 (C-1), 123.1 (C-6), 121.8 (C-5), 117.6 (C-2'), 116.5 (C-5'), 116.3 (C-6'), 115.2 (C-2), 114.2 (C-8), 74.8 (C-8'), 37.97 (C-7')。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **9** 为迷迭香酸。

化合物 **10**: 无色晶体 (乙醇), 易溶于甲醇、乙醇, 分子式 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.87 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.82 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 4.30 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, -OCH₂), 1.36 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, -CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 168.3 (-CO-), 163.4 (C-4), 132.7 (C-2, 6), 122.5 (C-1), 116.1 (C-3, 5), 61.7 (-OCH₂-), 14.6 (-CH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[21], 故鉴定化合物 **10** 为对羟基苯甲酸乙酯。

化合物 **11**: 白色结晶 (甲醇), 易溶于甲醇、乙

醇, 分子式 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.85 (1H, dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, H-6), 7.46 (1H, ddd, $J = 8.7, 7.2, 1.7$ Hz, H-4), 6.93~6.86 (2H, m, H-3, 5); ^{13}C NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 173.5 (-COOH), 163.2 (C-2), 136.6 (C-4), 131.5 (C-6), 120.0 (C-5), 118.1 (C-3), 113.9 (C-1)。以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **11** 为水杨酸。

化合物 **12**: 白色结晶粉末, 易溶于热水、甲醇, 分子式 $C_7H_6O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.06 (2H, s, H-2, 6); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 168.9 (-COOH), 145.0 (C-3, 5), 138.2 (C-4), 120.6 (C-1), 108.9 (C-2, 6)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故化合物 **12** 鉴定为没食子酸。

化合物 **13**: 黄色结晶粉末, 易溶于甲醇、乙醇, 分子式 $C_9H_8O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.53 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.22 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 171.0 (C-9), 149.4 (C-3), 147.0 (C-7), 146.8 (C-4), 127.8 (C-1), 122.8 (C-6), 116.5 (C-8), 115.5 (C-5), 115.1 (C-2)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故化合物 **13** 鉴定为咖啡酸。

化合物 **14**: 白色近棕褐色粉末, 易溶于水、甲醇、乙醇, ESI-MS m/z 155.03 $[M+H]^+$, 相对分子质量 154, 分子式 $C_7H_6O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.43 (3H, s, H-6), 7.42 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.79 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 170.2 (C-7), 151.5 (C-4), 146.1 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-2), 115.8 (C-5)。以上数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 **14** 为原儿茶酸。

化合物 **15**: 灰黄色粉末, 易溶于甲醇, 分子式 $C_{14}H_{16}O_8$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.47 (2H, s, H-5, 5'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 159.2 (C-7, 7'), 148.0 (C-4, 4'), 139.5 (C-3, 3'), 136.4 (C-2, 2'), 112.4 (C-1, 1'), 110.3 (C-5, 5'), 107.8 (C-6, 6')。以上数据与文献报道基本一致^[26], 故鉴定化合物 **15** 为鞣花酸。

化合物 **16**: 白色结晶性粉末, 易溶于甲醇、乙醇, 分子式 $C_8H_8O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.56 (2H, dd, $J = 6.0, 1.9$ Hz, H-2, H-6), 6.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 3.89 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 170.0 (-COOH), 152.7 (C-

4), 148.7 (C-3), 125.3 (C-6), 123.1 (C-1), 115.8 (C-5), 113.8 (C-2), 56.4 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[27], 故鉴定化合物 **16** 为香草酸。

化合物 **17**: 黄色油状液体, 易溶于甲醇, 分子式 $C_{11}H_{16}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 5.75 (1H, s, H-7), 4.22 (1H, s, H-3), 2.42 (1H, d, $J = 13.3$ Hz, H-4a), 1.99 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-2a), 1.76 (3H, s, H-11), 1.47 (3H, s, H-9), 1.28 (3H, s, H-10); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 185.7 (C-6), 174.5 (C-8), 113.3 (C-7), 88.9 (C-5), 67.2 (C-3), 47.9 (C-4), 46.5 (C-2), 37.2 (C-1), 31.0 (C-10), 27.4 (C-11), 26.9 (C-9)。以上数据与文献报道基本一致^[28], 故鉴定化合物 **17** 为 loliolide。

化合物 **18**: 白色结晶粉末, 易溶于甲醇, 微溶于水, 分子式 $C_8H_8O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.86 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 3.84 (3H, s, -COOCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 168.7 (C-7), 163.5 (C-4), 132.7 (C-2, 6), 122.2 (C-1), 116.1 (C-3, 5), 52.2 (-OCH₃)。以上数据与文献报道基本一致^[29], 故鉴定化合物 **18** 为对羟基苯甲酸甲酯。

化合物 **19**: 淡黄色油性粉末, 易溶于甲醇, 分子式 $C_{12}H_{13}ON$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.35 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-4), 7.25 (1H, td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, H-6), 7.05~7.00 (1H, m, H-5), 6.88 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-7), 3.89 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10), 3.09 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-8), 3.02 (1H, d, $J = 15.2$ Hz, H-8), 1.00 (3H, s, H-11); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 180.8 (C-2), 170.4 (C-9), 143.6 (C-7a), 131.7 (C-3a), 130.9 (C-4), 125.2 (C-6), 123.5 (C-5), 111.2 (C-7), 74.8 (C-3), 61.6 (C-10), 42.9 (C-8), 14.1 (C-11)。以上数据与文献报道基本一致^[30], 故鉴定化合物 **19** 为 ethyl dioxindole-3-acetate。

化合物 **20**: 白色粉末状, 易溶于甲醇, 分子式 $C_{36}H_{58}O_{11}$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 5.32 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1'), 1.34 (3H, s, H-27), 1.21 (3H, s, H-29), 1.04 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-30), 0.78 (3H, s, H-26), 0.70 (3H, s, H-24); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 178.6 (C-28), 139.8 (C-13), 129.5 (C-12), 95.8 (C-1'), 78.6 (C-3'), 78.4 (C-5'), 78.3 (C-3), 73.9 (C-2'), 73.7 (C-19), 71.2 (C-4'), 69.7 (C-2), 66.5 (C-23), 62.5 (C-6'), 54.9 (C-18), 48.3 (C-5), 47.9 (C-9, C-17), 44.1 (C-4), 42.9 (C-14), 42.8 (C-20), 41.3

(C-8), 39.0 (C-10), 38.3 (C-22), 33.5 (C-7), 29.6 (C-15), 27.2 (C-29), 27.1 (C-21), 26.5 (C-16), 24.8 (C-27), 24.7 (C-11), 19.3 (C-6), 17.7 (C-25), 17.6 (C-30), 16.6 (C-26), 13.9 (C-24)。以上数据与文献报道基本一致^[31], 故鉴定化合物 **20** 为苦莓苷 F1。

化合物 **21**: 白色粉末, 易溶于甲醇, 难溶于水, 分子式 $C_{30}H_{48}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.97 (1H, s, -COOH), 5.13 (1H, brs) 为环内双键质子信号, 1.07 (3H, s, H-23), 0.70 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.68 (3H, s, H-26), 1.28 (3H, s, H-27), 0.89 (3H, s, H-29), 0.84 (3H, s, H-30) 为 7 个甲基质子信号; ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.2 (C-28), 138.2 (C-13), 124.5 (C-12), 82.2 (C-3), 67.1 (C-2), 54.7 (C-5), 52.3 (C-18), 47.0 (C-1, 9), 46.9 (C-17), 46.8 (C-14), 41.7 (C-8), 38.9 (C-4), 38.5 (C-20), 38.4 (C-19), 37.5 (C-10), 36.3 (C-22), 32.6 (C-7), 30.2 (C-21), 28.8 (C-23), 27.5 (C-15), 23.7 (C-27), 23.2 (C-11), 22.9 (C-16), 21.0 (C-30), 17.9 (C-6), 17.1 (C-24), 16.9 (C-26), 16.9 (C-29), 16.4 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[32], 故鉴定化合物 **21** 为科罗素酸。

化合物 **22**: 灰色粉末, 易溶于醇, 分子式 $C_{30}H_{48}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 1.34 (1H, s, H-27), 1.19 (1H, s, H-29), 1.01 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H-23); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 182.2 (C-28), 140.1 (C-13), 129.3 (C-12), 84.6 (C-3), 73.6 (C-19), 69.5 (C-2), 56.7 (C-5), 55.1 (C-18), 48.2 (C-1, 9), 43.1 (C-20), 42.7 (C-14), 41.1 (C-17), 40.5 (C-8), 39.2 (C-4, 22), 38.9 (C-10), 34.1 (C-7), 29.6 (C-23), 29.3 (C-15), 27.3 (C-21), 27.1 (C-29), 26.6 (C-16), 24.8 (C-27), 24.7 (C-11), 19.7 (C-6), 17.5 (C-24), 17.4 (C-26), 17.0 (C-25), 16.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[33], 故鉴定化合物 **22** 为委陵菜酸。

化合物 **23**: 白色晶体 (甲醇-水), 易溶于甲醇、乙醇, 分子式 $C_{30}H_{48}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 5.25 (1H, s, H-12), 1.17 (1H, s, 23), 1.01 (2H, d, $J = 5.3$ Hz, H-27), 0.95 (1H, s, H-24), 0.91 (1H, s, H-26), 0.81 (2H, d, $J = 4.8$ Hz, H-30, 25); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 181.8 (C-28), 145.4 (C-13), 123.5 (C-12), 84.5 (C-3), 69.5 (C-2), 56.7 (C-5), 48.1 (C-9), 47.6 (C-8), 47.3 (C-19), 42.9 (C-1), 42.7 (C-17), 40.6 (C-14), 40.5 (C-18), 39.3 (C-10), 34.9 (C-4), 33.9 (C-21), 33.8 (C-29), 33.6 (C-7), 31.6 (C-22), 29.3 (C-20), 28.8 (C-23), 26.4 (C-15), 24.6 (C-27), 24.1

(C-11), 23.9 (C-30), 19.6 (C-16), 17.7 (C-6), 17.4 (C-24), 17.1 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[34], 故鉴定化合物 **23** 为山楂酸。

化合物 **24**: 白色粉末, 可溶于甲醇, 分子式 $C_{30}H_{48}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ : 5.30 (1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-12), 1.35 (1H, s, H-27), 1.20 (1H, s, H-25), 0.99 (2H, s, H-23), 0.93 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-30), 0.87 (1H, s, H-26), 0.79 (1H, s, H-24); ^{13}C -NMR (150 MHz, Methanol- d_4) δ : 182.3 (C-28), 140.1 (C-13), 129.4 (C-12), 80.1 (C-3), 73.6 (C-19), 67.2 (C-2), 55.1 (C-18), 48.2 (C-5), 43.1 (C-17), 42.8 (C-9), 42.5 (C-1), 41.3 (C-14, 20), 39.5 (C-8), 39.4 (C-4), 39.1 (C-10, 22), 34.1 (C-7), 29.6 (C-23), 29.2 (C-15), 27.3 (C-21), 27.1 (C-29), 26.6 (C-16), 24.9 (C-27), 24.7 (C-11), 22.4 (C-24), 19.3 (C-6), 17.5 (C-26), 16.9 (C-30), 16.6 (C-25)。以上数据与文献报道基本一致^[35], 故鉴定化合物 **24** 为野鸦椿酸。

3.2 活性化合物的筛选

采用 CCK-8 法检测待测化合物 (25、50、100 $\mu g/mL$) 作用 HEK293-CB2 细胞 6 h 后的细胞活力。与对照组相比, 分离得到的 24 个化合物对 HEK293-CB2 细胞的活性没有显著影响。

如表 1 所示, 以 HU308 (1 $\mu mol/L$, CB2R 的特异性激动剂) 为参照, 评价化合物对 HEK293-CB2 细胞的激动作用。从 24 个化合物中初步筛选出 5 个对 HEK293-CB2 细胞有激动作用的化合物, 分别为槲皮素、橙皮素、山柰酚、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯。其中槲皮素和山柰酚对 HEK293-CB2 细胞的刺激作用最强, 其最小给药质量浓度 (25 $\mu g/mL$) 已超过 HU308 对 CB2R 的激动作用。其余 3 种化合物的最大给药质量浓度 (100 $\mu g/mL$) 对 CB2R 的激动作用与阳性药物 HU308 相同。因此, 选择槲皮素、橙皮素、山柰酚、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸乙酯进行后续分析。

通过 HEK293-EGFP 阴性细胞进一步验证以确定 5 个化合物是否具有特异性激动 CB2R 作用。结果表明, 只有橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 HEK293-EGFP 细胞没有激活作用 (图 1-A~E), 说明这 2 个化合物是通过 CB2R 发挥激动作用。

为了进一步筛选出对 CB2R 具有特异性激活作用的化合物, 将橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯分别与 CB2R 抑制剂 AM630 (1 $\mu mol/L$) 混合后给予 HEK293-CB2 细胞共培养。结果显示, 加入抑制

表 1 24 个化合物通过双荧光素酶筛选体系对 CB2R 的激活活性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 CB2R activity of 24 isolated compounds screened using double luciferase screening system ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

化合物	剂量	相对荧光素酶发光值 (CB2/EGFP)	化合物	剂量	相对荧光素酶发光值 (CB2/EGFP)	化合物	剂量	相对荧光素酶发光值 (CB2/EGFP)
对照	—	30.86 ± 2.73	对照	—	16.75 ± 1.88	对照	—	15.99 ± 1.51
HU308	1 μmol·L ⁻¹	89.21 ± 1.77****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	47.01 ± 1.24****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	45.49 ± 0.85****
山奈酚	25 μg·mL ⁻¹	154.62 ± 7.34****	迷迭香酸	25 μg·mL ⁻¹	16.60 ± 0.86	loliolide	25 μg·mL ⁻¹	15.27 ± 1.41
	50 μg·mL ⁻¹	175.40 ± 3.17****		50 μg·mL ⁻¹	15.00 ± 1.37		50 μg·mL ⁻¹	15.96 ± 1.42
	100 μg·mL ⁻¹	254.80 ± 3.47****		100 μg·mL ⁻¹	15.11 ± 1.42		100 μg·mL ⁻¹	16.53 ± 1.09
对照	—	37.81 ± 1.07	对照	—	33.01 ± 1.20	对照	—	24.43 ± 2.95
HU308	1 μmol·L ⁻¹	109.26 ± 1.02****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	89.43 ± 1.29****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	68.89 ± 1.44****
木犀草苷	25 μg·mL ⁻¹	36.55 ± 2.63	对羟基苯甲酸乙酯	25 μg·mL ⁻¹	72.47 ± 3.16****	对羟基苯甲酸甲酯	25 μg·mL ⁻¹	36.65 ± 2.00****
	50 μg·mL ⁻¹	34.14 ± 2.29		50 μg·mL ⁻¹	93.34 ± 3.35****		50 μg·mL ⁻¹	45.00 ± 2.39****
	100 μg·mL ⁻¹	34.99 ± 3.60		100 μg·mL ⁻¹	122.80 ± 4.55****		100 μg·mL ⁻¹	55.22 ± 0.69****
对照	—	27.62 ± 0.77	对照	—	24.61 ± 2.48	对照	—	16.78 ± 1.24
HU308	1 μmol·L ⁻¹	78.15 ± 0.70****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	68.65 ± 1.20****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	47.02 ± 0.97****
银假甘	25 μg·mL ⁻¹	33.39 ± 3.85***	水杨酸	25 μg·mL ⁻¹	25.96 ± 2.15	ethyl dioxindole- 3- acetate	25 μg·mL ⁻¹	17.14 ± 1.09
	50 μg·mL ⁻¹	29.87 ± 1.16		50 μg·mL ⁻¹	25.51 ± 2.25		50 μg·mL ⁻¹	19.44 ± 1.24**
	100 μg·mL ⁻¹	27.23 ± 1.68		100 μg·mL ⁻¹	29.06 ± 2.04**		100 μg·mL ⁻¹	18.06 ± 1.12
对照	—	38.03 ± 1.01	对照	—	33.06 ± 1.81	对照	—	19.05 ± 0.82
HU308	1 μmol·L ⁻¹	109.17 ± 0.75****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	96.46 ± 1.26****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	55.04 ± 0.94****
金丝桃苷	25 μg·mL ⁻¹	37.04 ± 2.73	没食子酸	25 μg·mL ⁻¹	29.30 ± 1.89**	苦苣苷 F1	25 μg·mL ⁻¹	19.18 ± 0.78
	50 μg·mL ⁻¹	38.98 ± 2.02		50 μg·mL ⁻¹	24.30 ± 1.95****		50 μg·mL ⁻¹	19.08 ± 1.22
	100 μg·mL ⁻¹	38.17 ± 2.61		100 μg·mL ⁻¹	16.33 ± 0.76****		100 μg·mL ⁻¹	19.69 ± 1.00
对照	—	15.28 ± 1.01	对照	—	27.68 ± 0.76	对照	—	30.15 ± 1.77
HU308	1 μmol·L ⁻¹	45.79 ± 1.38****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	78.11 ± 1.14****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	87.68 ± 2.13****
橙皮素	25 μg·mL ⁻¹	23.65 ± 5.13***	咖啡酸	25 μg·mL ⁻¹	29.12 ± 1.68	科罗索酸	25 μg·mL ⁻¹	23.65 ± 1.62****
	50 μg·mL ⁻¹	28.14 ± 2.41****		50 μg·mL ⁻¹	30.50 ± 1.89*		50 μg·mL ⁻¹	8.17 ± 0.88****
	100 μg·mL ⁻¹	39.70 ± 1.74****		100 μg·mL ⁻¹	30.05 ± 1.12*		100 μg·mL ⁻¹	1.76 ± 0.36****
对照	—	31.20 ± 1.78	对照	—	39.92 ± 3.66	对照	—	17.61 ± 0.82
HU308	1 μmol·L ⁻¹	79.50 ± 1.45****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	113.13 ± 1.16****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	49.89 ± 0.85****
刺芒柄花素	25 μg·mL ⁻¹	21.48 ± 2.37****	原儿茶酸	25 μg·mL ⁻¹	42.26 ± 4.27	委陵菜酸	25 μg·mL ⁻¹	16.55 ± 0.52
	50 μg·mL ⁻¹	11.45 ± 1.25****		50 μg·mL ⁻¹	41.62 ± 1.93		50 μg·mL ⁻¹	17.83 ± 1.09
	100 μg·mL ⁻¹	8.43 ± 1.09****		100 μg·mL ⁻¹	39.82 ± 2.27		100 μg·mL ⁻¹	18.40 ± 0.82
对照	—	18.73 ± 1.88	对照	—	14.96 ± 0.80	对照	—	19.36 ± 0.82
HU308	1 μmol·L ⁻¹	48.58 ± 1.10****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	45.35 ± 1.65****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	56.21 ± 1.14****
槲皮素	25 μg·mL ⁻¹	70.45 ± 4.86****	鞣花酸	25 μg·mL ⁻¹	10.05 ± 0.96****	山楂酸	25 μg·mL ⁻¹	20.64 ± 0.88
	50 μg·mL ⁻¹	92.79 ± 1.48****		50 μg·mL ⁻¹	12.19 ± 0.79		50 μg·mL ⁻¹	14.64 ± 1.06****
	100 μg·mL ⁻¹	111.97 ± 2.15****		100 μg·mL ⁻¹	12.54 ± 2.19		100 μg·mL ⁻¹	0.85 ± 0.10****
对照	—	36.61 ± 1.09	对照	—	40.08 ± 2.20	对照	—	14.36 ± 1.07
HU308	1 μmol·L ⁻¹	116.08 ± 1.40****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	117.21 ± 0.67****	HU308	1 μmol·L ⁻¹	41.46 ± 1.47****
对羟基苯甲酸	25 μg·mL ⁻¹	33.48 ± 1.13*	香草酸	25 μg·mL ⁻¹	39.67 ± 1.67	野鸦椿酸	25 μg·mL ⁻¹	14.50 ± 1.18
	50 μg·mL ⁻¹	39.61 ± 1.71**		50 μg·mL ⁻¹	36.34 ± 2.76*		50 μg·mL ⁻¹	14.49 ± 0.86
	100 μg·mL ⁻¹	33.34 ± 1.65*		100 μg·mL ⁻¹	36.88 ± 1.53****		100 μg·mL ⁻¹	15.10 ± 1.21

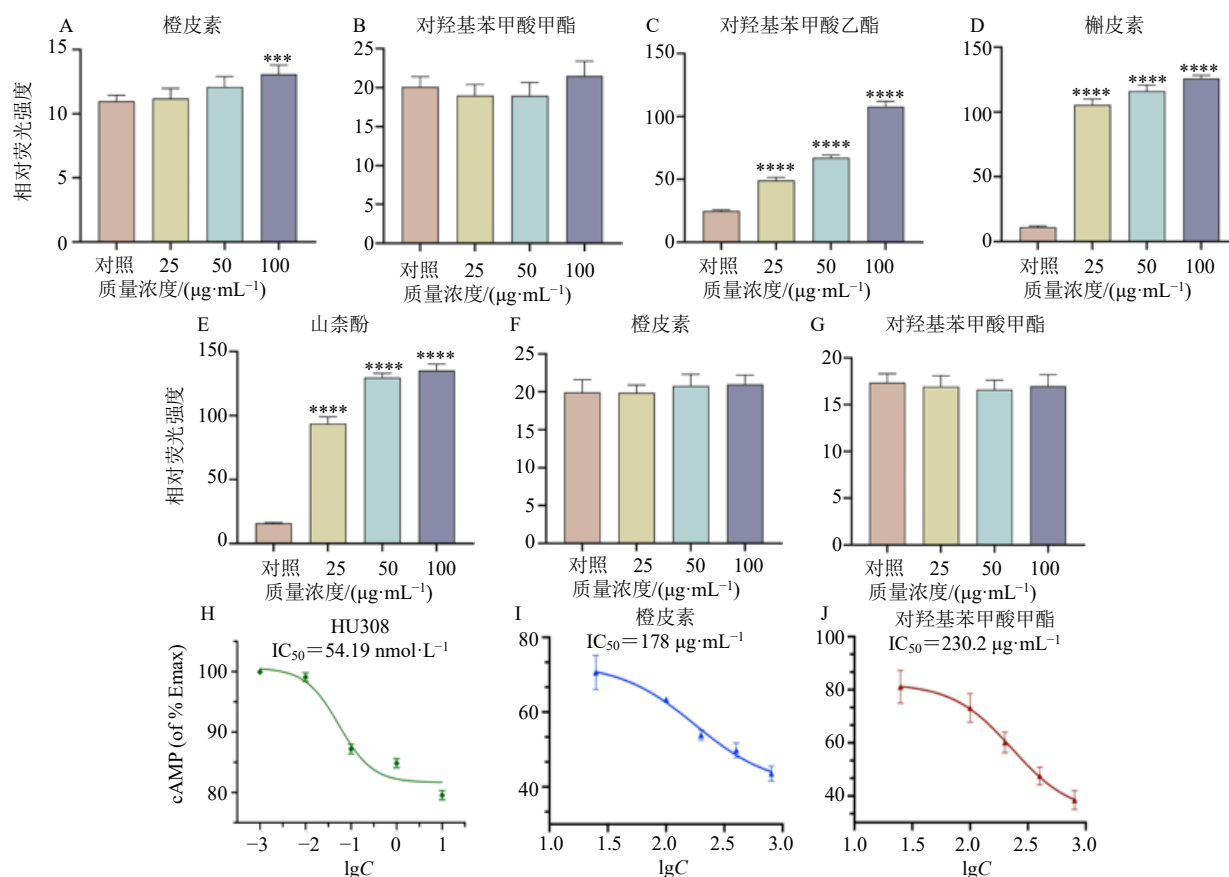
加粗表示有活性; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ 。bold indicates activity; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ vs control group.

剂 AM630 后, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 HEK293-CB2 细胞的激活作用完全消失, 与对照组相比无统计学差异 (图 1-F、G), 说明它们对 CB2R 的激动作用被 AM630 拮抗。进一步表明, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯通过特异性激活 CB2R 发挥作用。

3.3 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 HEK293-CB2 细胞内 cAMP 表达水平的影响

G 蛋白偶联受体偶联的 CB2R 可通过抑制细胞

内腺苷酸晚期环化酶的活性来减少 cAMP 的产生。如图 1-H~J 所示, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯组的 cAMP 含量随着药物浓度的增加而降低, 表明这 2 个化合物可显著激动 CB2R 并抑制细胞内 cAMP 的产生。HU308、橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 分别为 54.19 nmol/L、178 $\mu\text{g/mL}$ 和 230.2 $\mu\text{g/mL}$ 。



A~E: 活性化合物对 HEK293-EGFP 细胞中 CB2R 的激动作用; F~G: CB2R 抑制剂 AM630 对筛选的活性化合物的逆转作用; H~J: HU308、橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 HEK293-CB2 细胞中 cAMP 水平的影响。与对照组比较: *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ 。

A—E: Effect of bioactive compounds on CB2R activation in HEK293-EGFP cells; F—G: Reversal effect of AM630 on the agonistic of CB2R and screened compounds; H—J: Effects of HU308, hesperetin, and methyl 4-hydroxybenzoate on cAMP accumulation in HEK293-CB2 cells. *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$ vs control group.

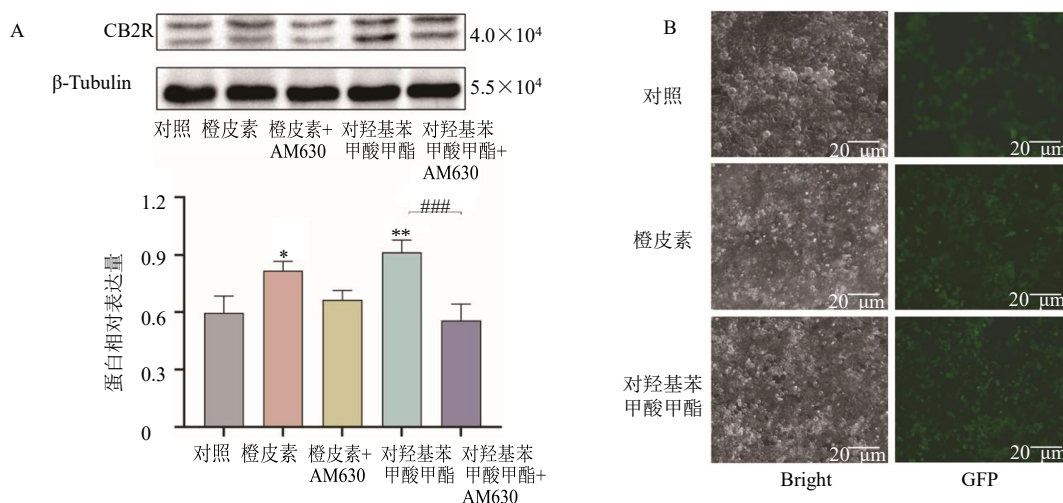
图 1 通过双荧光素酶筛选的化合物对 CB2R 的激动作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Agonist effect of compounds screened by double luciferase on CB2R ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.4 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对 CB2R 蛋白的影响

给药组 CB2R 蛋白表达明显高于对照组 (图 2-A), 与给药组相比, 加入 CB2R 特异性抑制剂 AM630 可拮抗化合物对 CB2R 蛋白的激动, 并减弱 CB2R 蛋白的表达。此外, 对羟基苯甲酸甲酯对 CB2R 蛋白的激活作用强于橙皮素。

由于 HEK293-CB2 细胞同时也转染了增强型绿色荧光蛋白 (EGFP), 它们可通过 CB2R 被激活而发出绿色荧光, 其荧光强度反映了 CB2R 的激活程度。用体视显微镜观察对羟基苯甲酸甲酯和橙皮素对 CB2R 的激动作用。结果表明橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯组的荧光强度和发光细胞数均高于对照组 (图 2-B)。



A-各组 CB2R 蛋白表达水平; B-化合物 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 激动 HEK293-CB2 细胞后的荧光水平 ($\times 100$)。与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与化合物+抑制剂 AM630 组比较: ### $P < 0.001$ 。

A-protein expression of CB2R in each group; B-fluorescence level of HEK293-CB2 cells stimulated by selected compounds ($\times 100$). * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs the corresponding compound + inhibitor group.

图 2 筛选的化合物对 HEK293-CB2 细胞内 CB2R 蛋白的激动水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Activation level of CB2R by selected compounds in HEK293-CB2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯可抑制破骨细胞 TRAP 酶活性

如图 3-A 所示, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的给药质量浓度对 RAW264.7 细胞的活力没有显著影响。TRAP 酶是破骨细胞骨吸收的标志物^[36]。破骨细胞的细胞核可以通过 TRAP 染色进行观察。如对照组橙色箭头所示, 破骨细胞具有 3 个以上的细胞核, 这证明 RANKL 成功诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞 (图 3-C)。与对照组相比, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯显著抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化, 并且这种抑制作用可被 AM630 逆转 (图 3-C)。TRAP 活性测定显示, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯显著抑制破骨细胞的活性, 在加入抑制剂 AM630 后, 破骨细胞 TRAP 活性回到正常值 (图 3-B)。结果表明, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对破骨细胞活性的抑制作用依赖于 CB2R。

3.6 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯可破坏破骨细胞 F-actin 的完整性

F-actin 环不仅是破骨细胞的微管和微丝结构, 也是破骨细胞伪足的主要骨架蛋白。如图 4 所示, 通过比较在 AM640 存在和不存在条件下对破骨细胞 F-actin 环的影响, 分析对照组破骨细胞的 F-actin 环为完整的圆形且细胞数量较多。给药组破骨细胞的 F-actin 环面积减少, 环破损且环的厚度也减少甚至消

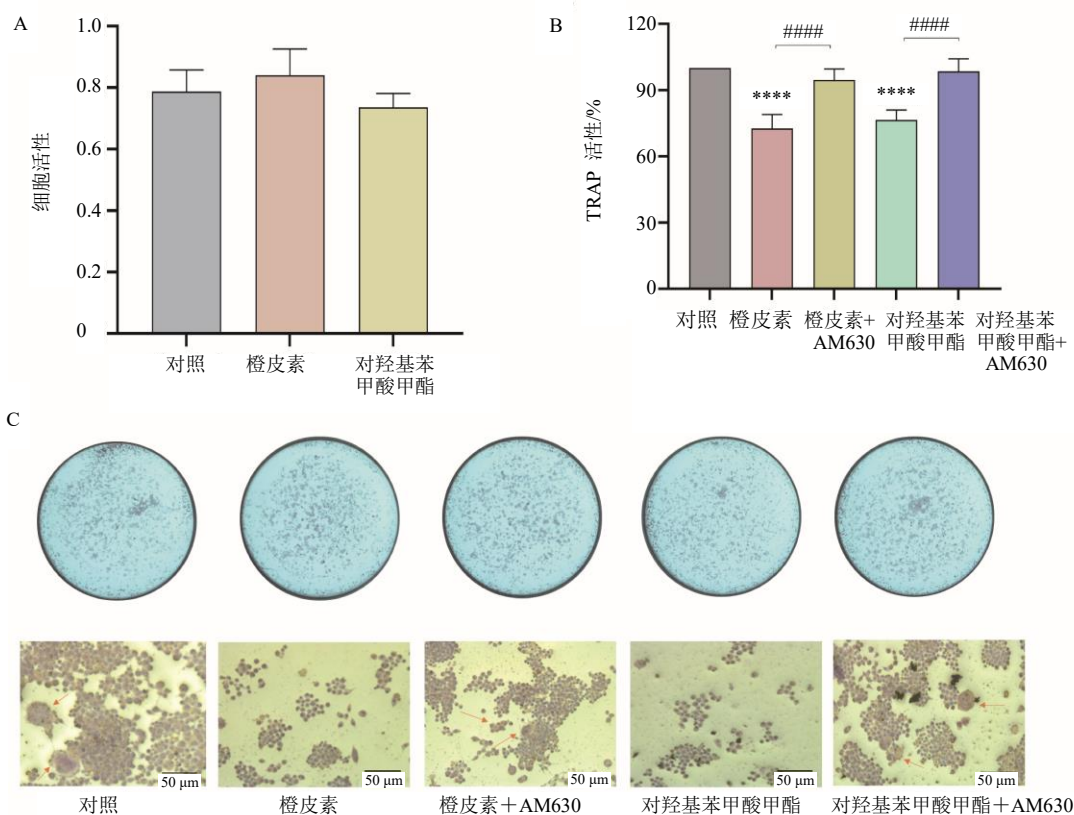
失。与给药组相比, 抑制剂组破骨细胞的 F-actin 环完整性较好, 表明抑制剂 AM630 可逆转橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯对破骨细胞 F-actin 环完整性的影响。

3.7 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯可抑制破骨细胞的骨吸收

破骨细胞骨吸收是骨质疏松症发生最主要的原因之一^[37-38]。如图 5-A 所示, 在对照组的骨切片中观察到较多的骨吸收陷窝, 而在给药组中观察到的骨吸收陷窝较少。然而, 在加入抑制剂 AM630 后, 骨片表面形成了更多的骨吸收陷窝。通过 Image J 计算骨吸收陷窝的面积, 以对照组为定值归一化处理后结果如图 5-B 所示。结果表明, 橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯可通过激活 CB2R 而抑制破骨细胞的骨吸收, 但这种抑制作用可被 AM630 逆转。

4 讨论

本研究从中药覆盆子醋酸乙酯和二氯甲烷部分中分离鉴定了 24 个化合物, 其中黄酮类化合物 7 个、有机酸类化合物 7 个、萜类化合物 6 个、木脂素类化合物 1 个、其他类化合物 3 个。筛选鉴定了 2 种新的 CB2R 激动剂 (橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯) 可以通过激活 CB2R 以增加其蛋白表达, 并抑制 HEK293-CB2 细胞中 cAMP 的积累, 并且橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯以 CB2R 依赖的方式影响破骨细胞功能的正常发挥 (图 6)。



A-化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 RAW264.7 细胞活力的影响; B-化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及 AM630 对破骨细胞 TRAP 活性的影响; C-化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在 AM630 存在下对破骨细胞 TRAP 染色的影响。与对照组比较: **** $P < 0.0001$; 与相应化合物+抑制剂 AM630 组比较: ##### $P < 0.0001$ 。A-effects of selected compounds on the viability of RAW264.7 cells; B-effects of selected compounds and AM630 on TRAP activity of osteoclasts; C-effects of selected compounds on osteoclasts after TRAP staining in the presence of osteoclasts in the presence of AM630, orange arrows indicate osteoclasts. **** $P < 0.0001$ vs control group; ##### $P < 0.0001$ vs the corresponding compound + inhibitor group.

图 3 化合物对来源于 RAW264.7 细胞的破骨细胞 TRAP 活性及 TRAP 染色后 AM630 对其活性的逆转作用 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effects of selected compounds on TRAP activity of osteoclasts derived from RAW264.7 cells and reversal effect of AM630 on osteoclasts based on TRAP staining ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

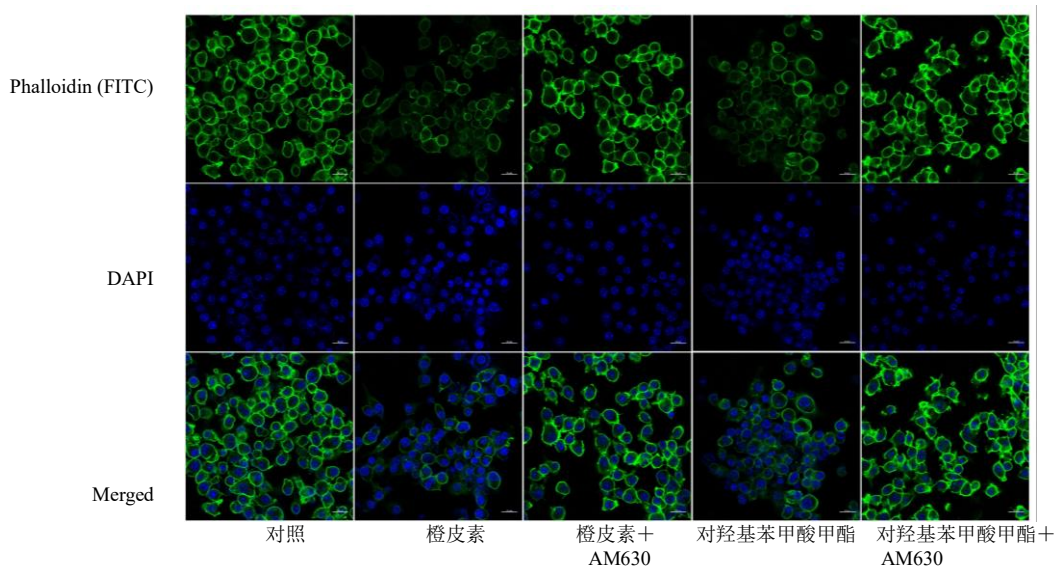
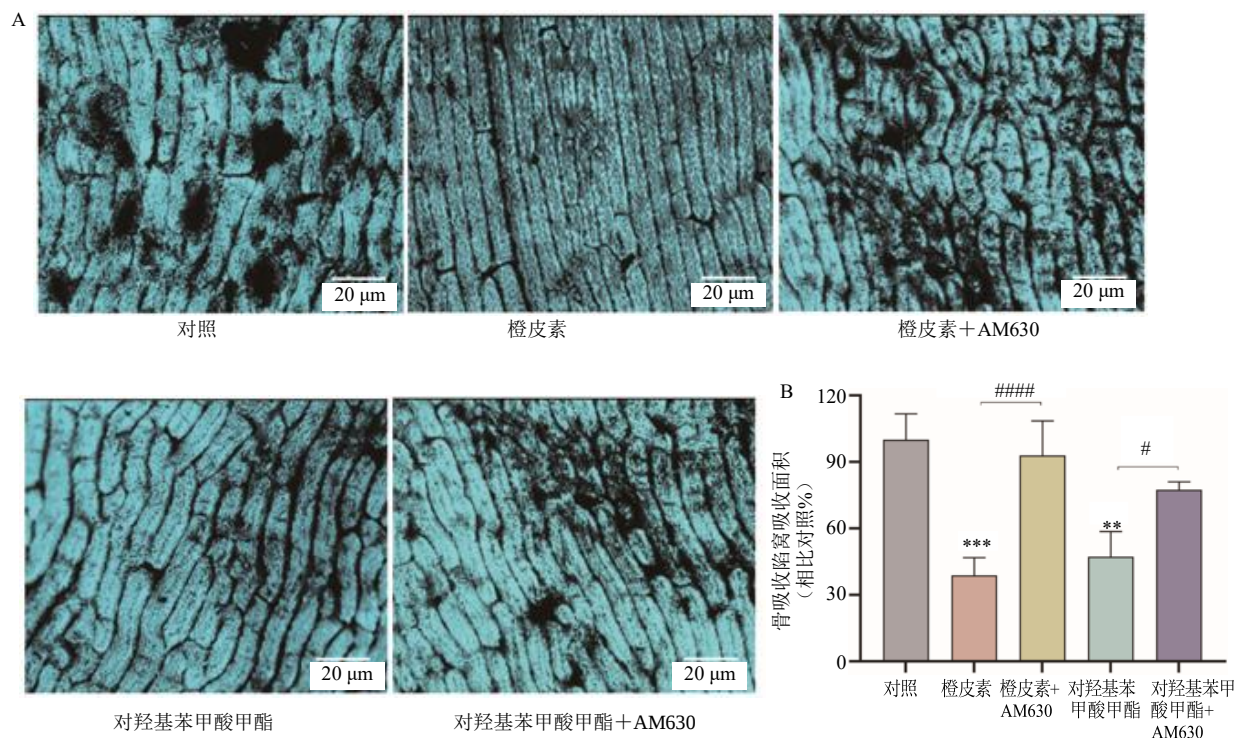


图 4 筛选的化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对破骨细胞 F-actin 环的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of selected compounds ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on osteoclasts based on F-actin ring staining ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-各组破骨细胞骨吸收情况 ($\times 40$); B-化合物 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对破骨细胞骨吸收陷窝的量化统计。与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与相应化合物+抑制剂 AM630 组比较: # $P < 0.05$ #### $P < 0.0001$ 。

A-effects on bone resorption of osteoclasts in the presence and absence of AM630 ($\times 40$); B-quantitative statistics of the effects of selected compounds ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on bone resorption lacunae of osteoclasts. ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ #### $P < 0.0001$ vs the corresponding compound + inhibitor group.

图 5 筛选的化合物对破骨细胞骨吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effects of selected compounds on bone resorption of osteoclasts ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

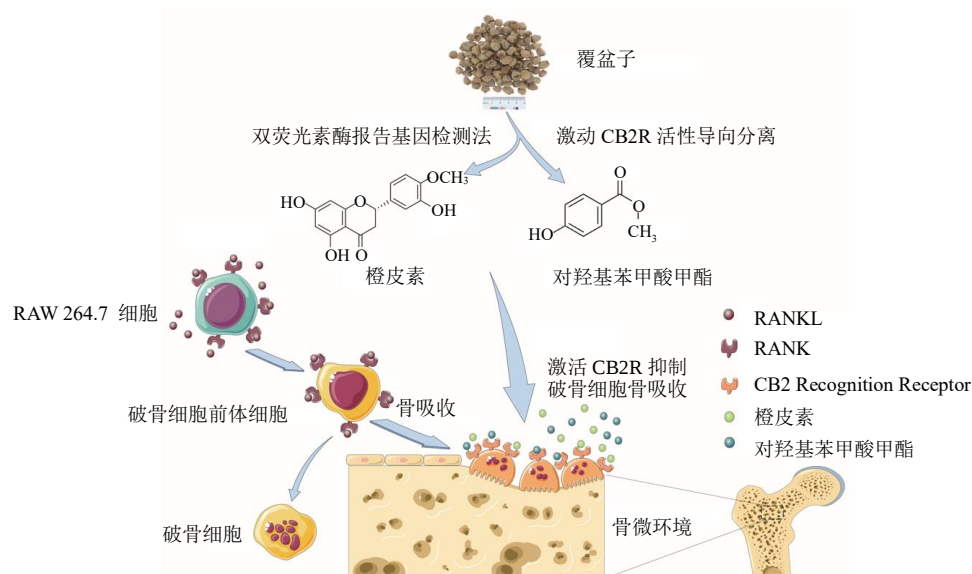


图 6 本研究整体示意图

Fig. 6 Graphic abstract of this study

植物来源的大麻素因其高效和低毒成为治疗各种慢性病的首选化合物之一^[39]。CB2R 的特异性激动剂具有良好的前景，因为它们骨丢失中发挥着有益的调节作用，并且对中枢神经系统没有不良反应。成骨细胞和破骨细胞之间的平衡失调是导致骨质疏松发生的主要原因之一。成骨细胞和破骨细胞表面均存在 CB2R，当细胞表面的 CB2R 被激活时，可以通过调节成骨细胞和破骨细胞之间的平衡来维持正常的骨代谢，从而防止骨质疏松的发生。

基于上述实验结果，本研究筛选鉴定了 2 个新的可特异性激动 CB2R 的化合物（橙皮素和对羟基苯甲酸甲酯）。橙皮素属于二氢黄酮，其主要药理作用包括抗氧化、抗炎和调血脂作用。现有研究表明，橙皮素可以通过减少破骨细胞的数量和血清中 I 型胶原 C 端交联肽的水平来改善去卵巢小鼠的骨丢失并调节骨代谢^[40]。对羟基苯甲酸甲酯主要用作食品和化妆品中的抗菌防腐剂，但其抗骨质疏松作用尚无报道。本研究为以 CB2R 为靶点治疗骨质疏松的药物来源提供了参考，并为揭示了掌叶覆盆子的抗骨质疏松作用与其补肾作用的关系提供。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yu G H, Luo Z Q, Wang W B, *et al.* *Rubus chingii* Hu: A review of the phytochemistry and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 799.
- [2] Sheng J Y, Wang S Q, Liu K H, *et al.* *Rubus chingii* Hu: An overview of botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2020, 18(6): 401-416.
- [3] 王静宜, 余俊东, 陈悦, 等. 覆盆子的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(13): 3897-3903.
- [4] 王昭洪, 曾涛. 补肾中药治疗骨质疏松的实验研究进展 [J]. *环球中医药*, 2011, 4(3): 235-238.
- [5] Wilkinson S T, D'Souza D C. Problems with the medicalization of marijuana [J]. *JAMA*, 2014, 311(23): 2377.
- [6] Zhu M, Yu B Q, Bai J X, *et al.* Cannabinoid receptor 2 agonist prevents local and systemic inflammatory bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(4): 739-751.
- [7] Pertwee R G. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: From THC to anandamide and beyond [J]. *Addict Biol*, 2008, 13(2): 147-159.
- [8] Whiteside G T, Lee G P, Valenzano K J. The role of the cannabinoid CB2 receptor in pain transmission and therapeutic potential of small molecule CB2 receptor agonists [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(8): 917-936.
- [9] Xu A H, Yang Y, Shao Y, *et al.* Activation of cannabinoid receptor type 2-induced osteogenic differentiation involves autophagy induction and p62-mediated Nrf2 deactivation [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 9.
- [10] Ofek O, Karsak M, Leclerc N, *et al.* Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(3): 696-701.
- [11] Hu S J, Cheng G, Zhou H, *et al.* Identification of novel cannabinoid CB2 receptor agonists from botanical compounds and preliminary evaluation of their anti-osteoporotic effects [J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 702.
- [12] 杨宝, 范真, 朱锦萍, 等. 金鸡脚化学成分研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3053-3056.
- [13] 周志强. 裸花紫珠化学成分的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [14] 李克新, 钱程. 绿萝花中化合物分离与抗氧化活性研究 [J]. *现代盐化工*, 2018, 45(5): 48-49.
- [15] Wu S H, Ma Y B, Dong L X, *et al.* The chemical constituents from *Toricellia angulata* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2000, 22(2): 1-3.
- [16] 张丽, 肖健, 王煜丹, 等. 野番豆茎的化学成分研究 [J]. *云南民族大学学报: 自然科学版*, 2023, 32(1): 1-5.
- [17] 毕丹, 孙云波, 宋联强, 等. 连花清瘟胶囊化学成分研究 (I) [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 795-800.
- [18] 孙印石, 王建华. 虎杖花的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2219-2222.
- [19] 孙明月. 牡丹皮乙酸乙酯层化学成分及其抗肿瘤活性研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2022.
- [20] Kang N S, Lee J H. Characterisation of phenolic phytochemicals and quality changes related to the harvest times from the leaves of Korean purple *Perilla* (*Perilla frutescens*) [J]. *Food Chem*, 2011, 124(2): 556-562.
- [21] 徐凡. 对羟基苯甲酸乙酯的合成 [J]. *化工设计通讯*, 2019, 45(2): 136.
- [22] 张蔓莉. 大苞荆芥脂溶性成分分离及其体外抗炎活性的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2022.
- [23] 王欣, 唐志书, 杨楠, 等. 软紫草中抑制 PTP1B 活性成分的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(13): 1120-1123.
- [24] 方冬林, 顾迎迎, 李鹏飞, 等. 心叶紫金牛根茎化学成分研究 [J]. *中药材*, 2016, 39(6): 1311-1313.
- [25] 周柏松. 山茄子化学成分及其生物活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [26] 车桐. 余甘子味觉成分研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.
- [27] 王 暉, 杨崇仁, 张颖君. 草果果实中的酚性成分 [J]. *云南植物研究*, 2009, 31(3): 284-288.

- [28] Mansoor T A, Shinde P B, Luo X, *et al.* Renierosides, cerebrosides from a marine sponge *Haliclona (Reniera)* sp [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(9): 1481-1486.
- [29] 闫慧娇, 陈雨洁, 李兵, 等. 红果榿木叶化学成分研究 [J]. 山东科学, 2019, 32(6): 15-19.
- [30] Chung C P, Hsu C Y, Lin J H, *et al.* Antiproliferative lactams and spiroenone from adlay bran in human breast cancer cell lines [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(4): 1185-1194.
- [31] Xia S F, Shao J, Zhao S Y, *et al.* Niga-ichigoside F1 ameliorates high-fat diet-induced hepatic steatosis in male mice by Nrf2 activation [J]. *Food Funct*, 2018, 9(2): 906-916.
- [32] 尹鹏, 郭新, 梁梓, 等. 正交试验法优选旱芹叶总黄酮提取工艺 [J]. 南方农业学报, 2015, 46(6): 1074-1078.
- [33] 张汝胜, 李霞, 黄永林, 等. 广西地不容非药用部位化学成分研究 [J]. 广西植物, 2023, 43(1): 103-110.
- [34] 王博, 仇文卫, 喻艳华, 等. 山楂酸的研究进展 [J]. 生命科学, 2009, 21(2): 264-269.
- [35] 刘晓, 叶江海, 李继新, 等. 道真产淡黄香茶菜化学成分研究 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3187-3192.
- [36] Halling L C, Ek-Rylander B, Krumpel M, *et al.* Bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase: Potential co-regulators of bone mineralization [J]. *Calcif Tissue Int*, 2017, 101(1): 92-101.
- [37] Clezardin P, Coleman R, Puppo M, *et al.* Bone metastasis: Mechanisms, therapies, and biomarkers [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3): 797-855.
- [38] El Demellawy D, Davila J, Shaw A, *et al.* Brief review on metabolic bone disease [J]. *Acad Forensic Pathol*, 2018, 8(3): 611-640.
- [39] Mammana S, Cavalli E, Gugliandolo A, *et al.* Could the combination of two non-psychotropic cannabinoids counteract neuroinflammation? effectiveness of cannabidiol associated with cannabigerol [J]. *Medicina*, 2019, 55(11): 747.
- [40] Yang H, Wang Y J, Xu S, *et al.* Hesperetin, a promising treatment option for diabetes and related complications: A literature review [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(28): 8582-8592.

[责任编辑 王文倩]