

木瓣树中3个新的倍半萜类化合物及其法尼醇X受体激活作用研究

王亚玲, 陈琳, Chibuzor Stephen, 孟凡成, 陈敏, 王国伟*

(西南大学药学院, 重庆 400715)

摘要: 采用硅胶、ODS和半制备HPLC等多种色谱学技术从木瓣树枝叶中分离得到了11个化合物。化学结构经高分辨质谱、核磁共振谱、ECD等多种波谱分析方法, 鉴定为: vielana A (1)、vielana B (2)、vielana C (3)、10-oxo-isodauc-3-en-15-al (4)、1 α -hydroxyisodauc-4-en-15-al (5)、mokko lactone (6)、11 β ,13-dihydrocostunolide (7)、eurylosesquiterpenol E (8)、*epi*- α -cadinol (9)、mustakone (10)、7-*epi*-amiteo (11)。化合物1~3为新化合物, 其余化合物均首次从木瓣树中分离得到。化合物1和2增加了法尼醇X受体 (farnesoid X receptor, FXR) 下游靶基因 *BSEP* 启动子的转录活性, 表明其具有潜在的FXR激活作用。

关键词: 木瓣树; 化学成分; 倍半萜类; 法尼醇X受体

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1341-07

Three new sesquiterpenes from *Xylopia vielana* Pierre and their effects of farnesoid X receptor activation

WANG Ya-ling, CHEN Lin, Stephen Chibuzor, MENG Fan-cheng, CHEN Min, WANG Guo-wei*

(Southwest University College of Pharmaceutical Science, Chongqing 400715, China)

Abstract: Eleven compounds were isolated from the twigs and leaves of *Xylopia vielana* Pierre by various chromatographic techniques such as silica gel, ODS and the semi-preparative HPLC. Their chemical structures were identified by HR-ESI-MS, NMR, ECD and other spectroscopic methods as vielana A (1), vielana B (2), vielana C (3), 10-oxo-isodauc-3-en-15-al (4), 1 α -hydroxyisodauc-4-en-15-al (5), mokko lactone (6), 11 β ,13-dihydrocostunolide (7), eurylosesquiterpenol E (8), *epi*- α -cadinol (9), mustakone (10), 7-*epi*-amiteo (11). Among them, compounds 1–3 were new compounds, and the rest compounds were isolated from this plant for the first time. Compounds 1 and 2 increased the transcriptional activity of the farnesoid X receptor (FXR) downstream target gene *BSEP* promoter, indicating that they have potential of FXR activation.

Key words: *Xylopia vielana* Pierre; chemical constituent; sesquiterpene; farnesoid X receptor

木瓣树 (*Xylopia vielana* Pierre) 番荔枝科木瓣树属乔木, 分布于热带和亚热带地区^[1]。木瓣树枝叶有镇痛、治疗风湿病、疟疾、免疫性疾病等功效^[2]。现代植物化学研究表明, 木瓣树枝叶中富含萜类^[3-6]、黄酮类^[7]和生物碱类^[8,9]化合物, 其中有多种骨架类型的倍

半萜被认为是其主要的活性成分。实验室前期研究结果表明从木瓣树中分离得到的倍半萜类化合物通过激活法尼醇X受体 (FXR) 相关通路缓解了 α -萘基异硫氰酸酯 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 诱导的小鼠胆汁淤积^[10]。

胆汁酸受体FXR在肝脏、小肠和肾脏中高度表达, 参与胆汁酸合成、转运和代谢过程, 维持体内胆汁酸稳态。许多有FXR调节作用的化合物已经证实, 激活FXR可以改善非酒精性脂肪性肝炎、原发性胆汁性胆管炎和糖尿病患者的胆汁酸、葡萄糖、脂质代谢, 并

收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2024-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073724); 国家自然科学基金联合基金资助项目 (U20A20401); 西南大学自然科学领域一校级青年领军团队项目 (SWU-XJLJ202306).

*通讯作者 E-mail: wangguowei@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1248

减少炎症^[11]。FXR的激活被证明对胆结石和炎症性肠道疾病也有益^[12,13]。因此,FXR是治疗肝脏和肠道疾病的重要靶点^[14]。本文对从木瓣树中分离到的11个倍半萜进行了初步的FXR激动作用研究,双荧光素酶报告基因实验结果表明化合物**1**和**2**有潜在的FXR激活作用。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1** 无色油状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 223.169 2 $[M+H]^+$ (计算值 $C_{14}H_{23}O_2$, 223.169 3), 推测其分子式为 $C_{14}H_{22}O_2$, 不饱和度为4。化合物**1**的¹H NMR谱(400 MHz, $CDCl_3$, 表1)显示了4个甲基氢信号 δ_H 2.13 (3H, s, H-10)、1.92 (3H, s, H-14)、0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-12)、0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13), 4个亚甲基氢信号 2.53 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7)、2.45 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-8)、2.33 (2H, d, $J = 10.8$ Hz, H-4)、1.90 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6a)、1.74 (1H, m, H-6b)和2个次甲基氢信号 2.32 (1H, m, H-11)、2.01 (1H, dt, $J = 10.8$, 4.8 Hz, H-5)。¹³C NMR谱(100 MHz, $CDCl_3$, 表1)给出了14个碳共振信号,结合DEPT谱提示化合物**1**有4个甲基 δ_C 29.9 (C-10)、20.8 (C-12)、18.8 (C-13)、21.1 (C-14), 4个亚甲基 32.0 (C-4)、22.7 (C-6)、20.6 (C-7)、42.9 (C-8), 2个次甲基 52.2 (C-5)、26.4 (C-11), 2个羰基 200.6 (C-1)、208.9 (C-9)和1个双键 154.8 (C-2), 134.2 (C-3)。以上数据与已知化合物7(*S*)-(hydroxypropanyl)-3-methyl-2-(4-oxopentyl) cyclohex-2-en-1-one^[15]的波谱

数据相似,主要区别是已知化合物在链上多一个碳信号,在C-11位多一个羟基信号。

在化合物**1**(图1)的¹H-¹H COSY谱(图2)中可以观察到H6/H5/H11/H12/H13这组自旋耦合体系,结合HMBC谱中,H-12与C-5/C-11/C-13相关,H-13与C-5/C-11/C-12相关,提示C-5位连接了一个异丙基;H-7与C1/C2/C3/C-8/C-9相关,H-8与C-2/C-7/C-9相关,H-10与C-8/C-9相关,表明C7-C8-C9-C10连成一条链,与C-2位相连,由此确定了化合物**1**的平面结构。化合物**1**的绝对构型可通过比较实验测试的ECD曲线与ECD的计算结果来确定,化合物**1**的实验ECD光谱在219 nm处显示负Cotton效应,在242 nm处显示正Cotton效应,5*S*-**1**的玻尔兹曼平均ECD谱与实验曲线相似(图3)。因此化合物**1**的绝对构型被确定为5*S*,命名为vielana A。

化合物**2** 无色油状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 301.177 3 $[M+Na]^+$ (计算值 $C_{17}H_{26}O_3Na$, 301.177 4), 推测其分子式为 $C_{17}H_{26}O_3$, 不饱和度为5。化合物**2**的¹H NMR谱(400 MHz, $CDCl_3$, 表1)显示了2个甲氧基氢信号 δ_H 3.32 (6H, s, H-16,17), 3个甲基氢信号 1.99 (3H, s, H-11)、0.97 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-13)、0.70 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-14), 4个芳香质子信号 7.28 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-4)、7.25 (1H, dd, $J = 5.1$, 4.8 Hz, H-5)、7.17 (1H, s, H-2)、7.05 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6), 2个亚甲基氢信号 2.18 (1H, m, H-8a)、1.81 (1H, m, H-8b), 2.18 (2H, m, H-9)和3个次甲基氢信号 2.18 (1H, m, H-7)、1.81 (1H, m, H-12)、5.37 (1H, s, H-15)。¹³C

Table 1 ¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) and ¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) data of **1**, **2** and **3**

No.	1		2		3	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	200.6		143.6		57.0	
2	154.8		126.7	7.17, s	35.1	1.35, m
3a	134.2		137.9		35.7	1.98, m,
3b						1.68, m
4	32.0	2.33, d (10.8)	124.6	7.28, d (5.1)	47.0	1.08, m
5	52.2	2.01, dt (4.8, 10.8)	128.1	7.25, dd (4.8, 5.1)	67.6	2.25, t (7.0)
6a	22.7	1.90, d (4.8)	128.4	7.05, d (4.8)	74.8	4.87, d (7.0)
6b		1.74, m				
7	20.6	2.53 t (7.0)	52.4	2.18, m	146.3	
8a	42.9	2.45, t (7.0)	26.8	2.18, m	147.5	6.76, ddd, (4.2, 2.9, 1.3)
8b				1.81, m		
9a	208.9		42.1	2.18, m	31.2	2.81, dddd (20.4, 5.5, 2.9)
9b						2.36, dd (20.4, 4.2)
10	29.9	2.13, s	209.4		82.8	4.07, m
11	26.4	2.32, m	29.9	1.99, s	33.9	1.40, m
12	20.8	0.92, d (7.0)	33.6	1.81, m	21.8	0.91, d (6.7)
13	18.8	0.84, d (7.0)	20.9	0.97, d (6.6)	21.0	0.81, d (6.7)
14	21.1	1.92, s	20.8	0.70, d (6.6)	191.1	9.40, s
15			103.3	5.37, s	30.4	1.25, s
16			52.7	3.32, s		
17			52.6	3.32, s		

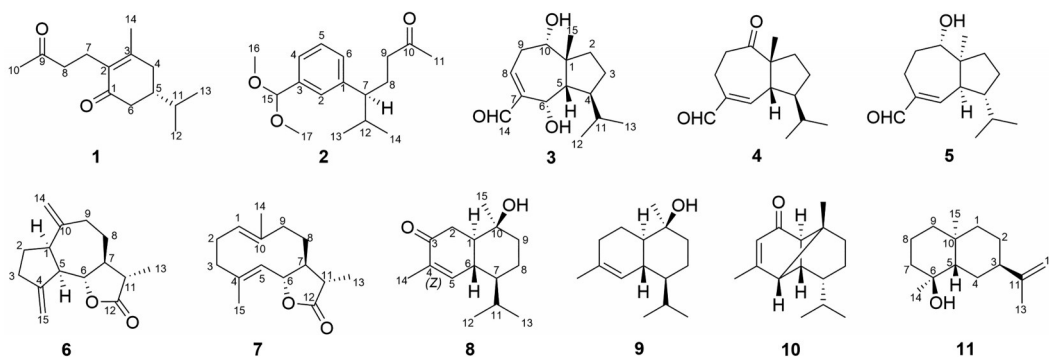


Figure 1 Structures of compounds 1–11

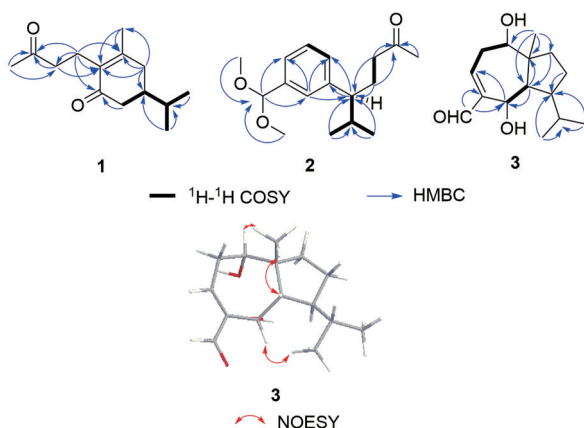


Figure 2 Key NOESY correlations of compound 3 and ^1H - ^1H COSY, HMBC correlations of compounds 1, 2 and 3

NMR谱 (100 MHz, CDCl_3 , 表 1) 给出了 17 个碳共振信号, 结合 DEPT 谱提示化合物 2 有 3 个甲基 δ_{C} 29.9 (C-11)、20.9 (C-13)、20.8 (C-14), 2 个甲氧基 52.7 (C-16)、52.6 (C-17), 2 个亚甲基 26.8 (C-8)、42.1 (C-9), 7 个次甲基 126.7 (C-2)、124.6 (C-4)、128.1 (C-5)、128.4 (C-6)、52.4 (C-7)、33.6 (C-12)、103.3 (C-15), 1 个羰基 209.4 (C-10) 和 2 个季碳 143.6 (C-1)、137.9 (C-3)。以上数据与已知化合物 sesquichamaenol^[16] 的波谱数据相似, 主要区别是化合物 2 在苯环上多两个甲氧基信号 (16-OCH₃, 17-OCH₃), 少一个羟基和甲基信号。

化合物 2 的 HMBC 谱 (图 2) 中显示, H-16/H-17 与 C-15 相关, H-15 与 C-2/C-4/C-16/C-17/相关, 表明两个甲氧基与 C-15 相连, C-15 连接在苯环的 C-3 位。由此确

定了化合物 2 的平面结构 (图 1)。计算 ECD 结果显示化合物 2 在 204 nm 处显示正 Cotton 效应, 在 237 nm 显示负 Cotton 效应, 7*S*-2 的玻尔兹曼平均 ECD 谱与实验曲线高度相似 (图 3)。化合物 2 与其结构类似的已知化合物 sesquichamaenol 都只有一个手性碳且在相同位置, 通过对比两个化合物的比旋光度值, sesquichamaenol $[\alpha]_{\text{D}}^{22} -5.95^\circ$ (c 0.042, CH_2Cl_2), 化合物 2 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -10.45^\circ$ (c 0.3, CH_2Cl_2), 推断出化合物 2 的绝对构型与已知化合物 sesquichamaenol 相同^[16], 为 *S* 构型。进一步用计算碳谱进行验证, 经计算碳谱和 DP4+ 分析后, 7 位 *S* 构型的可能性是 96.73%, 认为可信, 最终推断出化合物 2 的绝对构型为 7*S*, 命名为 vielana B。

化合物 3 无色油状物。HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 m/z 275.161 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$, 275.161 7), 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 不饱和度为 4。化合物 3 的 ^1H NMR 谱 (400 MHz, CDCl_3 , 表 1) 显示了 3 个甲基氢信号 δ_{H} 1.25 (3H, s, H-15)、0.91 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-12)、0.81 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-13), 1 个醛基氢信号 9.40 (1H, s, H-14), 1 个双键氢信号 6.76 (1H, ddd, $J = 4.2, 2.9, 1.3$ Hz, H-8), 3 个亚甲基氢信号 2.81 (1H, dddd, $J = 20.4, 5.5, 2.9$ Hz, H-9a)、2.36 (1H, dd, $J = 20.4, 4.2$ Hz, H-9b)、1.98 (1H, m, H-3a), 1.68 (1H, m, H-3b)、1.35 (2H, m, H-2) 和 5 个次甲基氢信号 4.87 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-6)、4.07 (1H, m, H-10)、2.25 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-5)、1.40 (1H, m, H-11)、1.08 (1H, m, H-4)。 ^{13}C NMR 谱 (100 MHz, CDCl_3 , 表 1) 给出了 15 个

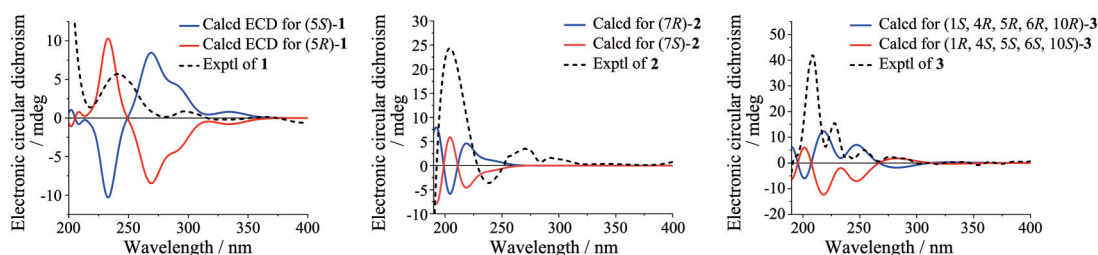


Figure 3 Experimental and calculated ECD spectra of compounds 1, 2 and 3

碳共振信号, 结合 DEPT 谱提示化合物 **3** 有 3 个甲基 δ_c 21.8 (C-12)、21.0 (C-13)、30.4 (C-15), 3 个亚甲基 35.1 (C-2)、35.7 (C-3)、31.2 (C-9), 5 个次甲基 47.0 (C-4)、67.6 (C-5)、74.8 (C-6)、82.8 (C-10)、33.9 (C-11), 1 个醛基 191.1 (C-14) 和 1 个双键 146.3 (C-7), 147.5 (C-8)。以上数据与已知化合物 amouanglienoid A^[17] 的波谱数据相似, 主要区别是化合物 **3** 在 C-6 (δ_c 74.8) 和 C-10 (δ_c 82.8) 位连接了两个羟基, 由此推出化合物 **3** 的平面结构 (图 1)。

化合物 **3** 的 NOESY (图 2) 谱显示 H-5/H-15 相关, H-6/H-12 相关, H-10/H-15 相关, 提示化合物 **3** 的相对构型为 1 α , 6 α , 5 β , 6 β , 10 β 。最后通过比较实验测试 ECD 曲线和计算 ECD 的结果来确定化合物 **3** 的绝对构型, 化合物 **3** 在 208 nm 处和 228 nm 处显示正 Cotton 效应, 在 219 nm 处显示负 Cotton 效应, 1R, 4S, 5S, 6S, 10S-**3** 的玻尔兹曼平均 ECD 谱与实验曲线高度相似 (图 3)。因此化合物 **3** 的绝对构型被确定为 1R, 4S, 5S, 6S, 10S, 命名为 vielana C。

2 FXR 激活作用研究

通过双荧光素酶报告基因实验对化合物 **1**~**11** 激活 FXR 的能力进行评价。FXR 转录复合物与下游靶基因 *BSEP* 启动子区域结合, 会促进靶基因的表达^[18]。通过在萤火虫荧光素酶表达序列前方插入 FXR 靶基因 *BSEP* 的启动子特定片段, 构建报告基因质粒, 检测萤火虫荧光素酶的化学发光值与内参海肾荧光素酶的化学发光值比值来判断靶基因激活程度, 结果如表 2 所示。与正常对照组相比, 给予化合物 **1**、**2** 处理后, *BSEP* 启动子的萤火虫荧光素酶发光值与内参海肾荧光素酶发光值的比值显著增加 ($P < 0.01$), 结果表明化合物 **1**、**2** 可激活 FXR, 从而增加其下游靶基因 *BSEP* 启动子的转录活性。

Table 2 The relative fluorescence value of farnesoid X receptor (FXR) downstream target gene *BSEP* promoter. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$; ** $P < 0.01$ vs control group

Group	Dose/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Relative fluorescence value
Basic	-	0.220 \pm 0.014
Control	-	1.000 \pm 0.061
1	20	1.369 \pm 0.234**
2	20	1.439 \pm 0.257**
3	20	1.099 \pm 0.183
4	20	1.008 \pm 0.015
5	20	1.081 \pm 0.057
6	20	1.142 \pm 0.129
7	20	0.870 \pm 0.049
8	20	1.088 \pm 0.170
9	20	1.055 \pm 0.114
10	20	0.736 \pm 0.039
11	20	1.102 \pm 0.102

FXR 已被公认为是治疗各种代谢性疾病如糖尿病、非酒精性脂肪肝、慢性肾脏疾病的潜力药物靶点。近年来, 大量的 FXR 配体被开发并进入临床试验。然而, 由于长期给药的不良反应, 开发靶向 FXR 的药物仍然很迫切。根据其化学结构, FXR 激动剂可分为甾体和非甾体类药物。大多数甾体候选药物显示出不良反应, 因此希望从天然产物中发现有 FXR 激活作用的前导化合物。

实验部分

岛津液相色谱仪 (检测器: SPD-20A, 泵: LC-20AD, 控制器: CBM-20A, 日本岛津), Bruker Avance-400M 型核磁共振仪, Bruker impact II 高分辨质谱仪 (Bruker 公司, 德国), WZZ-3 自动旋光仪 (上海仪电物理光学仪器有限公司), 快速中压制备层析系统 (苏州利穗科技有限公司), YMC-Pack ODS-A 色谱柱 (250 mm \times 10 mm, 5 μm), LIBBOR-PL203 型精密电子天平 (岛津公司, 日本), RE-2000A 型旋转蒸发仪, 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄, 柱色谱硅胶 200~300 目、300~400 目 (青岛海洋化工厂); 甲醇 (制备纯) 及所用其他分析纯试剂均为成都科隆化学品有限公司生产。木瓣树枝叶 2018 年购买自中国广西东兴市, 鉴定为番荔枝科木瓣树属木瓣树, 标本保存于西南大学药学院。

1 提取分离

木瓣树干燥枝叶 (5 kg) 粉碎后, 用 95% 乙醇浸渍提取 3 次。提取液经减压浓缩得到粗浸膏 (163.2 g), 悬浮于水中, 依次用石油醚、二氯甲烷和乙酸乙酯进行萃取, 得到石油醚部位 50.3 g、二氯甲烷部位 55.1 g 和乙酸乙酯部位 42.9 g。

取二氯甲烷部位经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯系统 (100:1, 80:1, 60:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1) 梯度洗脱, 通过 TLC 合并相似成分得到 Fr. A~Fr. M 共 13 个馏分。取 Fr. G (4.96 g) 通过 300~400 目硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯系统 (1:0~0:1) 为流动相, 进行梯度洗脱得到 11 个亚组分: Fr.G1~Fr.G11。选取其中 Fr.G9 (245 mg), 经过 HPLC 分离 (YMC ODS, 54% 甲醇, 2 mL \cdot min⁻¹) 得到化合物 **1** (3.0 mg, $t_R = 31.0$ min)、化合物 **2** (3.0 mg, $t_R = 32.4$ min)、化合物 **7** (3.0 mg, $t_R = 53.2$ min)。Fr.G8 (130 mg) 经过 HPLC 分离 (YMC ODS, 75% 甲醇, 2 mL \cdot min⁻¹) 得到化合物 **3** (3.0 mg, $t_R = 52.1$ min)。Fr.D (4.12 g) 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯系统 (1:0~0:1) 为流动相, 进行梯度洗脱得到 15 个亚组分: Fr.D1~Fr.D15。选取其中 Fr.D15 (320 mg), 经过 HPLC 分离 (YMC ODS, 63% 甲醇, 2 mL \cdot min⁻¹) 得到化合物 **4** (5.0 mg, $t_R = 28.7$ min)、

化合物**5** (3.0 mg, $t_R = 29.9$ min)、化合物**6** (4.0 mg, $t_R = 34.0$ min)。Fr.M (9.70 g) 经硅胶柱色谱分离, 以石油醚-乙酸乙酯系统 (1:0→0:1) 为流动相, 进行梯度洗脱得到20个亚组分: Fr.M1~Fr.M20。选取其中Fr.M15 (164.0 mg), 经过HPLC分离 (YMC ODS, 60% 甲醇, $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 得到化合物**8** (7.0 mg, $t_R = 35.3$ min) 和化合物**9** (4.0 mg, $t_R = 38.2$ min)。Fr.M16 (170.0 mg), 经过HPLC分离 (YMC ODS, 72% 甲醇, $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 得到化合物**10** (10.0 mg, $t_R = 44.0$ min) 和化合物**11** (4.0 mg, $t_R = 47.3$ min)。

2 结构鉴定

化合物**1** 无色油状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 223.169 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值 $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_2$, 223.169 3), 推测其分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 和 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 数据见表1。

化合物**2** 无色油状物。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 301.177 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$, 301.177 4), 推测其分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 和 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 数据见表1。

化合物**3** 无色油状。HR-ESI-MS给出准分子离子峰 m/z 275.161 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$, 275.161 7), 推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 和 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 数据见表1。

化合物**4** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 9.35 (1H, s, H-14), 6.63 (1H, dd, $J = 5.5, 1.0$ Hz, H-6), 2.80 (2H, m, H-2), 2.53 (2H, m, H-3), 2.50 (1H, m, H-4), 2.23 (1H, m, H-5), 1.66 (1H, m, H-11), 1.32 (3H, s, H-15), 0.95 (3H, d, $J = 0.8$ Hz, H-12), 0.93 (3H, d, $J = 0.9$ Hz, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 59.7 (C-1), 26.9 (C-2), 19.9 (C-3), 53.4 (C-4), 55.5 (C-5), 158.6 (C-6), 143.9 (C-7), 35.4 (C-8), 39.1 (C-9), 212.3 (C-10), 32.5 (C-11), 22.1 (C-12), 19.6 (C-13), 192.9 (C-14), 25.2 (C-15)。以上数据与文献^[19]进行对比, 确定该化合物为 10-oxo-isodauc-3-en-15-al。

化合物**5** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 9.36 (1H, s, H-14), 6.60 (1H, m, H-6), 3.50 (1H, dd, $J = 3.8, 7.3$ Hz, H-10), 2.96 (1H, m, H-8a), 2.24 (1H, dd, $J = 10.2, 5.2$ Hz, H-5), 2.05 (1H, m, H-4), 1.94 (1H, m, H-3a), 1.82 (3H, m, H-2a, H-8b, H-9a), 1.62 (1H, m, H-11), 1.51 (2H, m, H-2b, H-3b), 1.26 (1H, m, H-9b), 0.89 (6H, t, $J = 0.9$ Hz, H-12, H-13), 0.73 (3H, s, H-15); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 49.5 (C-1), 39.6 (C-2), 25.1 (C-3), 50.4 (C-4), 50.1 (C-5), 159.6 (C-6), 143.9 (C-7), 19.7 (C-8), 29.0 (C-9), 83.4 (C-10), 32.3 (C-11), 19.5 (C-12), 21.7 (C-13), 193.2 (C-14),

13.5 (C-15)。以上数据与文献^[20]进行对比, 确定该化合物为 1 α -hydroxyisodauc-4-en-15-al。

化合物**6** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.20 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-15a), 5.04 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-15b), 4.88 (1H, brs, H-14a), 3.92 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-6), 4.78 (1H, brs, H-14b), 2.88 (1H, dt, $J = 8.0, 4.7$ Hz, H-1), 2.81 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-5), 2.49 (3H, m, H-3, 11), 2.21 (1H, dd, $J = 11.7, 7.0$ Hz, H-9), 2.10 (1H, m, H-7), 2.03 (1H, dd, $J = 12.3, 5.1$ Hz, H-9), 1.96 (1H, m, H-2), 1.94 (1H, m, H-8), 1.87 (1H, m, H-2), 1.30 (1H, m, H-8), 1.24 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 47.3 (C-1), 30.3 (C-2), 32.6 (C-3, 8), 151.8 (C-4), 52.1 (C-5), 85.3 (C-6), 42.2 (C-7), 37.7 (C-9), 150.1 (C-10), 50.1 (C-11), 178.7 (C-12), 13.4 (C-13), 112.0 (C-14), 109.3 (C-15)。以上数据与文献^[21]进行对比, 确定该化合物为 mokko lactone。

化合物**7** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.82 (1H, m, H-1), 4.64 (1H, dq, $J = 10.0, 1.4$ Hz, H-5), 4.55 (1H, dd, $J = 9.9, 8.6$ Hz, H-6), 2.37 (1H, dq, $J = 13.2, 7.2$ Hz, H-11), 2.31 (1H, m, H-9a), 2.27 (1H, m, H-3a), 2.25 (1H, m, H-3b), 2.10 (4H, m, H-2a, H-2b, H-7, H-9b), 1.90 (1H, m, H-8a), 1.69 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, H-15), 1.68 (1H, m, H-8b), 1.42 (3H, s, H-14), 1.26 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 127.2 (C-1), 28.7 (C-2), 39.7 (C-3), 140.4 (C-4), 127.5 (C-5), 81.6 (C-6), 54.9 (C-7), 26.3 (C-8), 41.3 (C-9), 137.0 (C-10), 42.5 (C-11), 178.7 (C-12), 13.4 (C-13), 16.3 (C-14), 17.4 (C-15)。以上数据与文献^[22]进行对比, 确定该化合物为 11 β ,13-dihydrocostunolide。

化合物**8** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 6.88 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-5), 2.61 (1H, dd, $J = 16.4, 3.4$ Hz, H-2a), 2.38 (1H, m, H-2b), 2.39 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-1), 2.25 (1H, m), 1.78 (3H, dd, $J = 2.5, 1.3$ Hz, H-14), 1.75 (1H, m, H-9a), 1.47 (1H, m, H-9b), 1.71 (1H, m, H-6), 1.50 (2H, m, H-8), 1.19 (3H, s, H-15), 1.17 (1H, m, H-7), 0.98 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12), 0.85 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 38.9 (C-1), 38.6 (C-2), 200.7 (C-3), 135.1 (C-4), 147.3 (C-5), 49.9 (C-6), 45.2 (C-7), 19.5 (C-8), 40.0 (C-9), 70.1 (C-10), 26.6 (C-11), 21.5 (C-12), 15.4 (C-13), 16.1 (C-14), 28.2 (C-15)。以上数据与文献^[23]进行对比, 确定该化合物为 eurylosesquiterpenol E。

化合物**9** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.5 (1H, s, H-5), 2.20 (1H, m, H-6), 1.97 (5H, m, H-1, 2, 3), 1.76 (1H, m, H-11), 1.67 (3H,

s, H-14), 1.63 (5H, m, H-7, 8, 9), 1.22 (3H, s, H-15), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-11), 0.79 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 48.0 (C-1), 22.6 (C-2), 30.9 (C-3), 134.3 (C-4), 122.7 (C-5), 46.7 (C-6), 37.8 (C-7), 19.8 (C-8), 40.3 (C-9), 70.7 (C-10), 23.7 (C-11), 21.4 (C-12), 15.2 (C-13), 28.5 (C-14), 26.2 (C-15)。以上数据与文献^[24]进行对比, 确定该化合物为 *epi- α -cadinol*。

化合物 **10** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 5.75 (1H, s, H-3), 2.70 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1), 2.67 (1H, s, H-6), 1.98 (3H, s, H-14), 1.97 (1H, dd, $J = 1.4, 6.7$ Hz, H-5), 1.75 (2H, m, H-9), 1.64 (1H, m, H-7), 1.59 (2H, m, H-8), 1.52 (1H, m, H-11), 0.94 (3H, s, H-15), 0.87 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-12), 0.85 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-13); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 56.7 (C-1), 204.1 (C-2), 121.6 (C-3), 170.0 (C-4), 56.2 (C-5), 54.7 (C-6), 45.6 (C-7), 22.2 (C-8), 36.9 (C-9), 57.4 (C-10), 31.9 (C-11), 19.7 (C-12), 20.1 (C-13), 20.5 (C-14), 23.8 (C-15)。以上数据与文献^[25]进行对比, 确定该化合物为 *mustakone*。

化合物 **11** 无色油状, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} 4.90 (2H, d, H-12), 2.21 (1H, m, H-3), 1.75 (3H, s, H-13), 1.58 (13H, m, H-1, 2, 4, 5, 7, 8, 9), 1.10 (3H, s, H-14), 0.93 (3H, s, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ_{C} 40.3 (C-1), 22.7 (C-2), 39.3 (C-3), 23.5 (C-4), 49.2 (C-5), 72.1 (C-6), 43.6 (C-7), 20.1 (C-8), 41.4 (C-9), 35.3 (C-10), 146.9 (C-11), 110.8 (C-12), 22.3 (C-13), 18.4 (C-14), 22.8 (C-15)。以上数据与文献^[26]进行对比, 确定该化合物为 *7-epi-amiteo*。

3 FXR 激活作用研究 (双荧光素酶报告基因实验)

3.1 FXR 过表达质粒、BSEP 启动子质粒与海肾内参质粒的扩增

FXR 过表达质粒由吉满生物科技 (上海) 有限公司构建提供。50 mL 灭菌 EP 管中加入 10 mL 含氨苄霉素的 LB 肉汤, 用枪头挑取琼脂平板上单克隆菌体加入到 LB 肉汤中, 将 EP 管置于 37 °C, 200 r·min⁻¹ 的摇床中, 过夜摇菌培养。BSEP 启动子质粒与海肾内参质粒甘油菌液由武汉金开瑞生物工程有限公司构建提供。LB 琼脂培养基微波炉加热熔化, 降温至 60 °C 左右后加入氨苄霉素混匀, 倒于灭菌培养皿中待其冷却凝固。从冰箱 -20 °C 取出启动子质粒甘油菌液和海肾质粒甘油菌液, 用涂布棒蘸取菌液均匀涂布于 LB 琼脂平板表面, 然后放入 37 °C 培养箱中, 倒扣过夜培养。用枪头挑取平板上单克隆菌体, 加入 10 mL 含氨苄霉素的 LB 肉汤, 200 r·min⁻¹ 过夜摇菌培养。

3.2 FXR 过表达质粒、BSEP 启动子质粒和海肾内参质粒的提取

根据天根小提质粒试剂盒说明书, 分别提取菌液中 FXR 过表达质粒、启动子质粒和海肾内参质粒, 最后用 ddH₂O 溶解质粒, 测定各自 DNA 的浓度, 分装后置于 -20 °C 保存。

3.3 FXR 过表达质粒、BSEP 启动子质粒和海肾内参质粒的共转染

3.3.1 HEK293T 细胞培养 HEK293T 细胞用 DMEM 完全培养基 (1% 双抗, 10% 胎牛血清), 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 观察细胞的状态, 当细胞密度达到 80% 左右, 弃去原培养基, 加入 1 mL 完全培养基终止反应并传代。

3.3.2 质粒转染 当 96 孔细胞培养板孔内细胞密度达到 70%~80% 时, 可进行质粒的转染。吸去原培养基, 用减血清转染专用培养基 (不含双抗) 稀释转染试剂和质粒。每孔中瞬时共转染 FXR 过表达质粒:BSEP 启动子质粒:海肾内参质粒 = 100 ng:100 ng:10 ng, 共 210 ng DNA。

转染 6 h 后, 除对照组更换为正常 DMEM 完全培养基外, 化合物组分别给予含 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 化合物的 DMEM 完全培养基。置于细胞培养箱中继续培养 24 h。

3.4 双荧光素酶报告基因的检测

取出细胞培养板, 室温下放置 10 min, 按碧云天双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明, 使用具有检测化学发光功能的多功能酶标仪测定每孔中萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的化学发光值, 将海肾荧光素酶的化学发光值作为内参, 以萤火虫荧光素酶 RLU 值除以海肾荧光素酶 RLU 值, 根据两者比值来反映不同化合物间 FXR 的激活程度。

3.5 统计学分析

实验数据均以“均数 \pm 标准差 (SD)”表示, 采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析, 两组间比较选用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

4 化合物 1~3 的 ECD 计算及化合物 2 的碳谱计算

Chemdraw3D 获取化合物三维结构, 用分子力学方法在 MM2 力场下进行粗略优化, 用 SYBYL-X 2.0 搜索化合物构象, 选择能量在 10 kcal·mol⁻¹ 以内的进行 DFT 构象优化, 3 个化合物分别得到了 76、352、174 个初始构象, 基于 OPLS-2005 力场提供的吉布斯自由能得到的各个构象的玻尔兹曼分布, 排除重复构象, 取玻尔兹曼分布大于 1% 的构象, 最后分别得到 4、3、8 个构象用于进一步优化。所选构象的再优化及后续的密度泛函计算均采用 Gaussian 软件在 B3LYP/6-31+G(d,p)

水平上进行。最后用Origin软件根据玻尔兹曼分布加权拟合出ECD谱图。

化合物2两种构象的搜索及优化同ECD计算的前处理方法,取玻尔兹曼分布在2%左右的构象,分别得到了8、7个构象,用Gaussian 09软件在B3LYP/6-31+G(d)理论级别下优化分子构象,用DP4+将化合物2实测碳谱数据与计算的碳谱数据进行对比,溶剂模型为氘代氯仿,得出置信度最高的为化合物构象。

作者贡献:王亚玲负责化合物的分离、鉴定和文章撰写;陈琳负责对化合物FXR激动活性进行筛选;Chibuzor Stephen对化合物提取分离提供了一定帮助;孟凡成对化合物绝对构型的确定提供了帮助;王国伟、陈敏对课题进行监管给予实验指导,同时负责文章审阅和稿件修改。

利益冲突:不存在任何利益冲突。

References

- [1] Hang R, Wei X, Hang Y, et al. Study on floristic geography of Annonaceae in Guangdong [J]. For Environ Sci (林业与环境科学), 2019, 35: 80-90.
- [2] Cheng L, Dai W, Zhang M, et al. Chemical constituents of the methanol extract from the leaves of *Xylopiavielana* [J]. J Plant Resour Environ (植物资源与环境学报), 2021, 30: 74-76.
- [3] Chen L, Yang P, Zha M, et al. Two new sesquiterpenes from *Xylopiavielana* [J]. Nat Prod Res, 2023, 37: 1199-1204.
- [4] Xie YG, Guo YG, Wu GJ, et al. Xylopiasides A-D, four rare guaiane dimers with two unique bridged pentacyclic skeletons from *Xylopiavielana* [J]. Org Biomol Chem, 2018, 16: 8408-8412.
- [5] Xie YG, Wu GJ, Cheng TF, et al. Vielopsides A-E, five new guaiane-type sesquiterpenoid dimers from *Xylopiavielana* [J]. Fitoterapia, 2018, 130: 43-47.
- [6] Zhang YL, Xu QQ, Zhou XW, et al. Rare dimeric guaianes from *Xylopiavielana* and their multidrug resistance reversal activity [J]. Phytochemistry, 2019, 158: 26-34.
- [7] Chokchaisiri R, Kunkaewom S, Chokchaisiri S, et al. Potent cytotoxicity against human small cell lung cancer cells of the heptenes from the stem bark of *Xylopiapierrei* Hance [J]. Med Chem Res, 2017, 26: 1291-1296.
- [8] Guo YG, Ding YH, Wu GJ, et al. Three new alkaloids from *Xylopiavielana* and their anti-inflammatory activities [J]. Fitoterapia, 2018, 127: 96-100.
- [9] Guo YG. Studys on the Chemical Constituents of *Clausena dunniana* var. *robusta* and *Xylopiavielana* Pierre (毛齿叶黄皮及木瓣树的化学成分研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018.
- [10] Yao ZW, Chen L, Hu M, et al. The discovery of a new potent FXR agonist based on natural product screening [J]. Bioorg Chem, 2024, 143: 106979.
- [11] Fang Y, Hegazy L, Finck BN, et al. Recent advances in the medicinal chemistry of farnesoid X receptor [J]. J Med Chem, 2021, 64: 17545-17571.
- [12] Liu ZX, Liu D, Chen MY, et al. Effects of Sedi Herba (*Sedum sarmentosum*) on attenuating cholestasis by the activation of the farnesoid X receptor (FXR) -mediated signaling [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 155: 113803.
- [13] Meng F, Ma Y, Zhan H, et al. Lignans from the seeds of *Herpetospermum pedunculatum* and their farnesoid X receptor-activating effect [J]. Phytochemistry, 2022, 193: 113010.
- [14] Massafra V, Pellicciari R, Gioiello A, et al. Progress and challenges of selective farnesoid X receptor modulation [J]. Pharmacol Ther, 2018, 191: 162-177.
- [15] Muhammad I, Luo W, Shoaib RM, et al. Guaiane-type sesquiterpenoids from *Cinnamomum migao* H. W. Li: and their anti-inflammatory activities [J]. Phytochemistry, 2021, 190: 112850.
- [16] Koorbanally NA, Randrianarivoelosia M, Mulholland DA, et al. Bioactive constituents of *Cedrelopsis microfoliata* [J]. J Nat Prod, 2002, 65: 1349-1352.
- [17] Xia MJ, Zhang M, Li SW, et al. Anti-inflammatory and PTP1B inhibitory sesquiterpenoids from the twigs and leaves of *Aglaialawii* [J]. Fitoterapia, 2022, 162: 105260.
- [18] Li G, Guo GL. Farnesoid X receptor the bile acid sensing nuclear receptor in liver regeneration [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5: 93-98.
- [19] Hou L, Tang GH, Zhang Y, et al. A new carotane sesquiterpene from *Walsura robusta* [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 84-86.
- [20] Xue Y, Zhang C, Wu Z, et al. Sesquiterpenes from *Artemisia giraldii* var. *longipedunculata* [J]. J Chin Pharm Sci, 2018, 27: 576-581.
- [21] Choi SZ, Yang MC, Choi SU, et al. Cytotoxic terpenes and lignans from the roots of *Ainsliaea acerifolia* [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29: 203-208.
- [22] Choi JY, Choi EH, Jung HW, et al. Melanogenesis inhibitory compounds from Saussureae Radix [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31: 294-299.
- [23] Yan J, Hao M, Han Y, et al. Sesquiterpenes from *Oplopanax elatus* stems and their anti-photoaging effects by down-regulating matrix metalloproteinase-1 expression via anti-inflammation [J]. Front Chem, 2021, 9: 766041.
- [24] Chang ST, Wang SY, Wu CL, et al. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania (Taiwania cryptomerioides)* Hayata heartwood [J]. Holzforschung, 2000, 54: 241-245.
- [25] Metuge JA, Babiaka SB, Mbah JA, et al. Anti-onchocerca metabolites from *Cyperus articulatus*: isolation, *in vitro* activity and *in silico* 'drug-likeness' [J]. Nat Prod Bioprospect, 2014, 4: 243-249.
- [26] Sheu JH, Chang KC, Sung PJ, et al. Chemical constituents of a formosan soft coral *Sinularia* sp. [J]. J Chin Chem Soc, 1999, 46: 253-257.