

草麻黄根中一个新软木脂类化合物

张博文^{1,2}, 李孟^{1,2}, 王小兰^{1,2}, 杨颖^{1,2}, 周诗琪^{1,2}, 陶思琦^{1,2}, 杨梦^{1,2},
朱登辉^{1,2}, 徐雅桐^{1,2}, 冯卫生^{1,2}, 郑晓珂^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省中药开发工程技术研究中心, 河南 郑州 450046)

摘要: 采用硅胶柱色谱、薄层色谱和半制备液相等多种色谱学技术从草麻黄根中分离得到6个化合物。根据理化性质与波谱数据鉴定其结构, 分别为 (*Z*)-阿魏酸二十二酯 (**1**)、(*E*)-阿魏酸二十二酯 (**2**)、邻苯二甲酸-双(2'-乙基庚基)酯 (**3**)、2,2'-氧代双(1,4-二叔丁基) (**4**)、邻苯二甲酸二异丁酯 (**5**)、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (**6**)。其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2~4**是首次从麻黄植物中分离得到。采用皮质酮诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC-12细胞)细胞损伤模型进行化合物活性筛选, 结果表明, 化合物**1**和**5**能显著改善皮质酮诱导的PC-12细胞损伤, 并且显著升高细胞中5-HT₇ (5-hydroxytryptamine 7)受体蛋白的表达, 具有潜在的抗抑郁活性。

关键词: 麻黄根; 化学成分; 软木脂类; (*Z*)-阿魏酸二十二酯; 抗抑郁活性

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0661-06

A new suberin from roots of *Ephedra sinica* Stapf

ZHANG Bo-wen^{1,2}, LI Meng^{1,2}, WANG Xiao-lan^{1,2}, YANG Ying^{1,2}, ZHOU Shi-qi^{1,2}, TAO Si-qi^{1,2},
YANG Meng^{1,2}, ZHU Deng-hui^{1,2}, XU Ya-tong^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}, ZHENG Xiao-ke^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. The Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Six compounds were isolated from the roots of *Ephedra sinica* Stapf using various chromatographic techniques such as silica gel column chromatography, thin layer chromatography and semi-preparative HPLC. Their chemical structures were identified by analysis of physicochemical properties and spectral data, and determined as (*Z*)-docosanylferulate (**1**), (*E*)-docosanylferulate (**2**), bis (2-ethylheptyl) phthalate (**3**), 2,2'-oxybis (1,4-di-*tert*-butylbenzene) (**4**), diisobutyl phthalate (**5**), bis (2-ethylhexyl) phthalate (**6**). Among them, compound **1** is a new compound, compounds **2-4** were first isolated from *Ephedra*. A corticosterone-induced PC-12 cell injury model was used for compound activity screening. The results showed that compounds **1** and **5** significantly improved corticosterone-induced PC-12 cell injury and significantly increased 5-HT₇ receptor protein expression in the cells, indicating potential antidepressant activity.

Key words: root of *Ephedra sinica* Stapf; chemical constituent; suberin; (*Z*)-docosanylferulate; antidepressant activity

麻黄根别名苦椿菜, 为麻黄科植物草麻黄 (*Ephedra*

sinica Stapf) 或中麻黄 (*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey.) 的干燥根和根茎, 为传统中药, 收载于《中华人民共和国药典》^[1]。麻黄根的现代药理活性主要表现为降压^[2,3]、抗肿瘤^[4,5]、抗炎^[6]和抗氧化^[7]。此外, 相关研究表明, 麻黄根的化学成分主要为生物碱类^[8,9]、黄酮类^[10,11]、酚酸类^[12]和多糖类^[13]等。由于目前对麻黄

收稿日期: 2023-06-08; 修回日期: 2023-08-21.

基金项目: 国家重点研发计划-中医药现代化研究 (2019YFC1708802);
中央引导地方科技发展专项资金 ([2016]149); 河南省高层次人才特殊支持计划 (ZYQR201810080).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-371-60190296, E-mail: zhengxk.2006@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0729

根化学成分研究较少,其活性研究也相当薄弱,这严重遏制了麻黄根的开发利用。为了充分利用我国丰富的麻黄资源,进一步开发麻黄新的药用价值,寻找新的活性成分,本实验选取麻黄根作为研究对象,对其化学成分进行系统分离与鉴定,从中分离得到了6个化合物,包括2个软木脂类化合物,结构见图1。化合物**1**为新化合物,命名为(*Z*)-阿魏酸二十二酯,化合物**2~4**是首次从麻黄植物中分离得到。化合物**1**和**5**对皮质酮诱导的PC12细胞损伤具有显著的保护作用。

结果与讨论

1 结构鉴定

化合物**1**白色无定形粉末,易溶于二氯甲烷。UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 202 (1.11), 321 (1.67) nm; IR 图谱中显示有甲基 (2 925, 2 851 cm^{-1}) 和羰基 (1 713 cm^{-1}) 基团特征吸收峰。HR-ESI-MS 给出 m/z 525.392 6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (计算值为 525.392 0), 确定分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$, 计算不饱和度为 6。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) 谱中, δ_{H} 7.77 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.10 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6), 6.88 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5) 为苯环 ABX 耦合的 3 个芳香氢质子信号, 提示化合物**1**具有 1,3,4 三取代苯环; δ_{H} 6.79 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-7) 和 5.81 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-8) 为顺式烯烃上的两个氢质子信号; δ_{H} 3.93 (3H, s, $-\text{OCH}_3$) 和 δ_{H} 0.88 (3H, t, H-22') 提示结构中含有 1 个甲氧基和 1 个甲基基团; 另外在 δ_{H} 1.2~1.7 为多个亚甲基的氢质子信号, 提示该化合物中可能含有脂肪链的结构片段。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) 谱中, 显示 16 个碳信号, 结合 DEPT-135 和 HSQC 谱发现, 其中包括 4 个季碳信号 [δ_{C} 166.8 (C-9), 147.2 (C-4), 146.0 (C-3), 127.4 (C-1)], 5 个叔碳信号 [δ_{C} 143.8 (C-7), 125.8 (C-6), 117.0 (C-8), 114.0 (C-5), 112.9 (C-2)], 2 个

伯碳信号 [δ_{C} 56.1 (C-10), 14.3 (C-22')] 以及多个仲碳信号。其中, δ_{C} 166.8 (C-9) 为羰基碳信号, δ_{C} 64.1 (C-1') 为 1 个含氧亚甲基碳信号, δ_{C} 56.1 (C-10) 为一个甲氧基的碳信号, δ_{C} 14.3 (C-22') 为 1 个甲基的碳信号。在 HMBC 谱中, δ_{H} 6.79 (H-7) 与 C-2/C-8/C-6 相关, 结合 δ_{H} 5.81 (H-8) 与 C-1/C-7/C-9 相关, 可推测出顺式烯烃的 C-7 与苯环的 C-1 位相连, C-8 与 C-9 位的羰基相连。另外, δ_{H} 3.93 ($-\text{OCH}_3$) 与 C-3 有直接相关, 可推测甲氧基连接在 C-3 位。此外, 结合 HR-ESI-MS 给出的化合物的分子式, 除去已知的分子骨架和脂肪链末端的甲基, 可推测脂肪链亚甲基的个数为 20。化合物**1**的核磁数据与文献报道的已知化合物阿魏酸二十二酯的核磁数据对比^[14], 主要区别在于化合物**1**的 C-7 和 C-8 位的偶合常数不同 (化合物**1**中 $J_{7,8} = 12.9$, 文献^[14]中阿魏酸二十二酯的 $J_{7,8} = 16.0$), 说明两者的 C-7 和 C-8 双键构型不同。基于以上分析, 确定化合物**1**结构为新化合物, 命名为(*Z*)-阿魏酸二十二酯, 数据归属见表 1。

2 抗抑郁活性研究

2.1 化合物1~6**对皮质酮诱导的 PC-12 细胞损伤模型中细胞存活率的影响** 通过使用 CCK8 法检测化合物**1~6**对皮质酮诱导的 PC-12 细胞损伤模型中细胞存活率, 结果如图 2 所示。模型组与正常对照组相比, 细胞活力明显下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 化合物**1**和**5**可以明显地提高细胞活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 改善皮质酮对 PC-12 细胞的损伤。

2.2 化合物1**和**5**对皮质酮诱导的 PC-12 细胞损伤模型中 5-HT₇ 蛋白表达的影响** 5-HT₇受体为抑郁症、精神分裂症、偏头痛等疾病的重要治疗靶点^[15], 通过使用细胞免疫荧光法检测 5-HT₇蛋白的表达, 结果如图 3A、B 所示。与正常对照组相比, 模型组 5-HT₇表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 化合物**1**和**5**在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

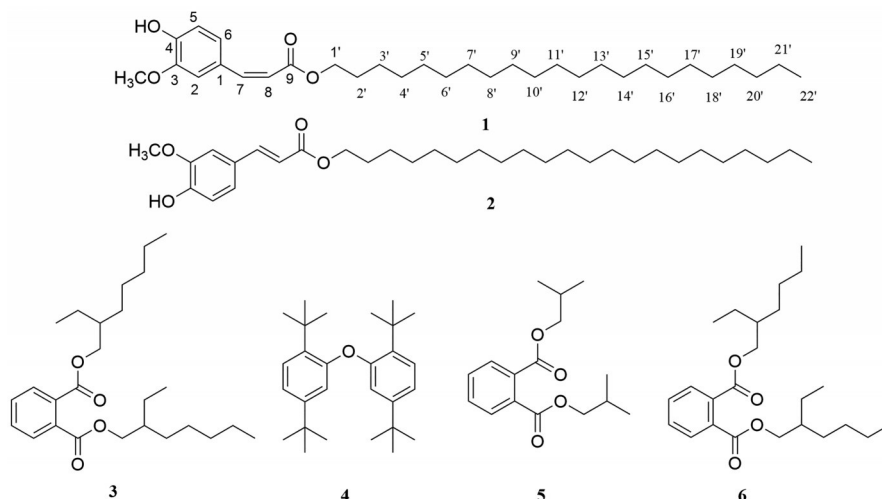


Figure 1 Structures of compounds 1-6

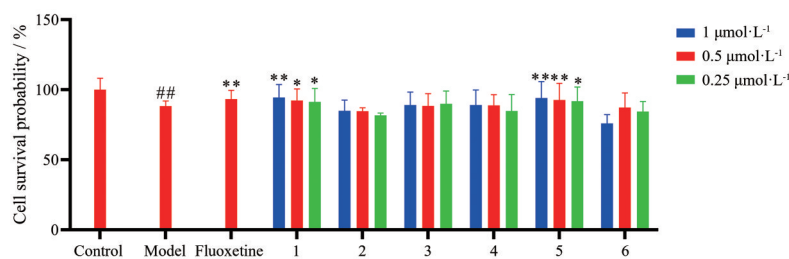


Figure 2 Effect of compounds **1**–**6** on cell survival probability in corticosterone-induced PC-12 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$. $##P < 0.01$ vs control; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs model

Table 1 ^1H NMR (500 MHz in CDCl_3) and ^{13}C NMR (125 MHz in CDCl_3) data of compound **1**

No.	δ_{C}	δ_{H}
1	127.4	–
2	112.9	7.77, d (1.9)
3	146.0	–
4	147.2	–
5	114.0	6.88, d (8.2)
6	125.8	7.10, dd (8.2; 2.0)
7	143.8	6.79, d (12.9)
8	117.0	5.81, d (12.9)
9	166.8	–
OCH_3	56.1	3.93, s
1'	64.1	1.66–1.62, m
22'	14.3	0.88, t
2'–21'	22.8–32.1	1.2–1.7, m

剂量下, 5-HT₇蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$), 提示化合物 **1** 和 **5** 有潜在的抗抑郁活性。

3 讨论

本研究从草麻黄根中分离得到的化合物 **3**、**5** 和 **6** 属于邻苯二甲酸酯类化合物, 查阅相关文献^[16–18], 在麻黄和其他植物中也见有相关报道, 这类化合物有可能是在分离过程中引入乙酸乙酯溶剂所带来^[19]。

实验部分

Bruker AVANCE III 500 型核磁共振仪 (TMS 内标); Bruker maxis HD 型飞行时间质谱 (德国 Bruker 公司); LC-52 型高压制备液相色谱仪 (中国赛谱锐思北京科技有限公司); Thermo EVO300 紫外分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司); N-1300 型旋转蒸发器、A-1000S 型水流抽气机、CA-1115 型冷冻水循环装置 (中国上海爱朗仪器有限公司); 酶标仪 (美国 BioTek 公司), 高内涵成像分析系统 (美国 PerkinElmer 公司); 薄层色谱硅胶 GF254 和硅胶 G、柱色谱硅胶 (100~200 目, 200~300 目, 青岛海洋化工厂); 制备型薄层层析硅胶板 (中国烟台江友硅胶开发有限公司); 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC-12, 购于中国科学院上海细胞库; 皮质酮 (中国上海阿拉丁生化, B2302817); 氟西汀 (美国 Med Chem

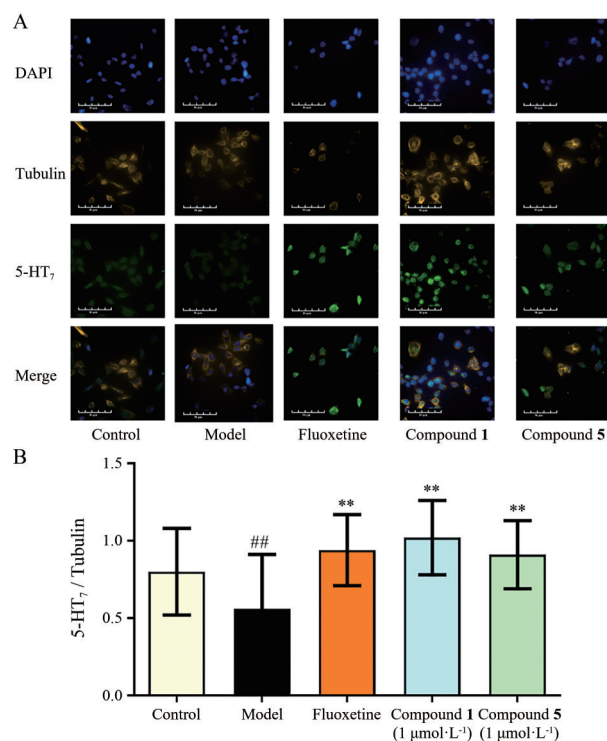


Figure 3 Results of 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT₇) protein expression detection using cellular immunofluorescence assay (plotting scale: 50 μm) (A) and results of compounds **1** and **5** at $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dose on 5-HT₇ protein expression (B) in corticosterone induced PC-12 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$. $##P < 0.01$ vs control; $**P < 0.01$ vs model. DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole

Express 公司, 251273); CCK8 (美国 GLP BIO 公司, 43); 5-HT₇ 抗体 (中国武汉三鹰生物科技有限公司, 00058665); Tubulin 抗体 (GR3398636-5)、DAPI 染色剂 (GR3445296-5), 美国 ABCAM 公司。

山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®]488) 预吸附二抗 (GR3449096-1); 山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®]594) 预吸附二抗 (美国 ABCAM 公司 GR3413419-1); RPMI1640 培养基 (美国 Invitrogen 公司 2315381); 胎牛血清 (南美 ExCell Bio 公司 12A218); 化合物 **1**~**6** 经检测纯度均为 98% 以上, 且使用 DMSO 溶解并低温保

存; 甲醇 (色谱纯, 天津四友精细化学品有限公司); 所用其他分析纯试剂均为天津市富宇精细化工有限公司及天津市致远化学试剂有限公司生产。

草麻黄根于 2021 年 5 月购自亳州药材市场, 经过河南中医药大学药学院董诚明教授鉴定为麻黄科植物草麻黄 (*Ephedra sinica* Stapf) 的干燥根与根茎, 植物标本 (No. 20210517) 保存于河南省中药资源与中药化学重点实验室。

1 提取分离

草麻黄根 40 kg, 经水煎煮后, 药渣用 95% 乙醇提取 2 次, 提取液减压浓缩, 冷冻干燥, 得药渣提取物干重为 727.7 g。提取物用水分散溶解, 依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取, 回收溶剂后得到石油醚部位 211.6 g、二氯甲烷部位 245.1 g、乙酸乙酯部位 335.5 g、正丁醇部位 62.5 g。

将二氯甲烷部位 (170.0 g) 经硅胶柱色谱 (100~200 目) 分离, 先以不同体积比例的石油醚-乙酸乙酯洗脱 (10:1→1:1), 继续以氯仿-甲醇梯度洗脱 (100:0→20:1), TLC 检识并合并相同流分得到 15 个组分, 即 M1~M15。M13 (39.83 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (20:1→1:1) 梯度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到 7 个组分, 即 M13-1~M13-7。M13-2 (1.25 g) 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (40:1→30:1) 梯度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到 6 个组分, 即 M13-2-1~13-2-6; M13-2-3 制备薄层进一步分离纯化, 得到化合物 **1** (15.95 mg) 和 **2** (4.05 mg)。M13-1 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (80:1→20:1) 梯度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到化合物 **5** (20.96 mg)。M13-5 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:1→30:1) 梯度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到 2 个组分, 即 M13-5-1 和 M13-5-2; M13-5-1 (158.59 mg) 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-乙酸乙酯 (10:1→3:1) 梯度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到 5 个组分, 即 M13-5-1-1~13-5-1-5; M13-5-1-2 (37.57 mg) 经半制备型高效液相 (甲醇-水 80:20) 得到化合物 **3** (0.99 mg, $t_R = 28.5$ min) 和化合物 **4** (1.35 mg, $t_R = 39.9$ min)。M13-6 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 以石油醚-乙酸乙酯洗脱 (10:1→3:1), 继续以氯仿-甲醇梯度洗脱 (100:0→5:1), TLC 检识并合并相同流分得到 10 个组分, 即 M13-6-1~13-6-10; M13-6-10 (4.02 g) 经 Toyopearl HW-40C 凝胶柱色谱分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:50) 等度洗脱, TLC 检识并合并相同流分得到 5 个组分, 即 M13-6-10-1~M13-6-10-5; M13-6-10-4 (46.74 mg) 经半制备型高效液相 (甲

醇-水 90:10) 得到化合物 **6** (0.76 mg, $t_R = 21.9$ min)。

2 结构鉴定

化合物 **1**, 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷; HR-ESI-MS m/z 525.392 6 $[M+Na]^+$ (Calcd. 525.392 0), 分子式为 $C_{32}H_{54}O_4$; IR $_{\max}$: 2 925, 2 851, 1 713, 1 472, 1 284 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 202 (1.69), 323 (1.91) nm。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) 和 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) 数据见表 1。

化合物 **2**, 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷, HR-ESI-MS m/z 525.392 1 $[M+Na]^+$ (Calcd. 525.392 0), 分子式为 $C_{32}H_{54}O_4$ 。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H 7.03 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2), 7.07 (1H, dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-6), 6.92 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 7.61 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 6.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8), 4.19 (2H, m, H-1'), 3.93 (3H, s, H-10), 0.88 (3H, t, H-22'), 1.2~1.7 (40H, m, $(CH_2)_{20}$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C 127.2 (C-1), 109.4 (C-2), 148.0 (C-3), 146.9 (C-4), 114.8 (C-5), 115.9 (C-6), 144.8 (C-7), 123.2 (C-8), 167.5 (C-9), 64.8 (C-1'), 56.1 (C-10), 14.3 (C-22'), 22.8~32.1 ($(CH_2)_{20}$)。以上数据与化合物 **1** 进行对比, 确定化合物为 (*E*)-阿魏酸二十二酯。

化合物 **3**, 无色无定形粉末, 易溶于甲醇, ESI-MS m/z 441 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{26}H_{42}O_4$ 。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H 7.71 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-3, 6), 7.53 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-4, 5), 4.22 (4H, m, H-1', 1''), 1.68 (2H, m, H-2', 2''), 1.42 (20H, m, $10 \times CH_2$), 0.91 (12H, m, $4 \times CH_3$); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C 167.9 (C=O), 132.6 (C-1,2), 131.0 (C-3,6), 129.0 (C-4,5), 68.3 (C-1', 1''), 38.9 (C-2', 2''), 30.5 (C-3', 3''), 29.9 (C-4', 4''), 29.0 (C-5', 5''), 23.9 (C-6', 6''), 23.1 (C-a', a''), 14.2 (C-7', 7''), 11.1 (C-b', b'')。以上数据与文献^[20]进行对比, 确定化合物 **3** 为邻苯二甲酸-双(2'-乙基庚基)酯。

化合物 **4**, 无色蜡状物, 易溶于二氯甲烷, ESI-MS m/z 417 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{28}H_{42}O$ 。 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ_H 7.53 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6, 6'), 7.36 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-3, 3'), 7.13 (2H, d, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-5, 5'), 1.33 (18H, s), 1.28 (18H, s); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ_C 147.8 (C-1, 1'), 147.2 (C-2, 2'), 138.7 (C-4, 4'), 124.6 (C-3, 3'), 124.1 (C-5, 5'), 119.3 (C-6, 6'), 35.0 (C-7, 7'), 34.7 (C-11', 11''), 31.6 (C-8, 8', 9, 9', 10, 10'), 30.4 (C-12, 12', 13, 13', 14, 14')。以上数据与文献^[21]报道对照基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 2,2'-氧代双(1,4-二叔丁基)。

化合物 **5**, 白色无定形粉末, 易溶于二氯甲烷, ESI-MS m/z 279 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$ 。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ_H 7.74 (2H, d, $J = 5.7, 3.3$ Hz,

H-2,5), 7.36 (2H, d, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-3,4), 4.07 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-1',1''), 2.03 (2H, m, H-2',2''), 1.00 (12H, s, H-3',3'',4',4''); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} 169.2 (C=O), 133.4 (C-1,6), 132.2 (C-3,4), 129.9 (C-2,5), 72.9 (C-1,1'), 29.0 (C-2,2'), 19.5 (C-3,3',4,4')。以上数据与文献^[22]报道对照基本一致, 故鉴定化合物**5**为邻苯二甲酸二异丁酯。

化合物**6**, 黄色油状物, 易溶于二氯甲烷, ESI-MS m/z 391 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ_{H} 7.70 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-3,6), 7.53 (2H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-4,5), 4.22 (4H, m, H-9,9'), 1.68 (2H, m, H-10,10'), 1.35 (16H, m, H-11,11',12,12',13,13',1',1''), 0.91 (12H, m, H-14,14',2',2''); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} 166.7 (C-7,7'), 131.43 (C-1,2), 129.8 (C-3,6), 127.8 (C-4,5), 67.1 (C-9,9'), 37.7 (C-10,10'), 29.3 (C-11,11'), 27.9 (C-12,12'), 22.7 (C-1',1''), 22.0 (C-13,13'), 13.0 (C-14,14'), 9.9 (C-2',2'')。以上数据与文献^[23]报道对照基本一致, 故鉴定化合物**6**为邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯。

3 抗抑郁症活性实验

3.1 CCK8法检测细胞存活率 PC-12细胞置于5% CO_2 、37 °C恒温培养箱中, 同时使用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液进行培养, 从中选取最佳生长期的细胞, 用0.25%的胰蛋白酶消化, 终止消化后, 用含10%胎牛血清的RPMI1640配制成浓度为每毫升 1×10^4 个的细胞悬液, 接种于96孔板上, 每孔100 μL 细胞悬液, 放入培养箱中, 待细胞贴壁后, 将培养基换为不含血清的培养基。饥饿24 h后, PC-12细胞分为6组: 正常组(control, RPMI1640培养基中培养)、模型组(model, 皮质酮)、阳性对照组(氟西汀, $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、给药组(1~6)高、中、低3个剂量实验组($1, 0.5, 0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。每组6个复孔, 各组均培养24 h后, 更换新的培养基后, 每孔加入10 μL 的CCK8溶液, 37 °C孵育1.5 h后, 酶标仪450 nm下检测吸光度OD值。细胞存活率 = (给药组OD值 - 空白组OD值) / (正常对照组OD值 - 空白组OD值) $\times 100\%$ 。

3.2 细胞免疫荧光检测5-HT_{2A}蛋白的表达 细胞接种方法同上, 化合物**1**和**5**给药剂量为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该浓度为细胞存活率检测结果下的最佳浓度。每组6个复孔, 各组均培养24 h后弃培养基, PBS洗3次, 每次5 min。采用4%的多聚甲醛固定细胞20 min, PBS洗3次, 每次5 min; 采用含有0.1% Triton X-100的PBS室温孵育20 min对细胞进行通透, PBS洗3次, 每次5 min。用PBST配制的10%山羊血清室温封闭20 min, PBS洗3次, 每次3 min。加入一抗5-HT_{2A} (1:500)与Tubulin (1:

1 000)。4 °C过夜, 回收一抗, PBST洗5次, 每次5 min。加入山羊抗兔IgG H&L (Alexa Fluor®488) 预吸附二抗与山羊抗小鼠IgG H&L (Alexa Fluor®594) 预吸附二抗(1:1 000), 37 °C下孵育1 h, PBST洗5次, 每次5 min。DAPI复染细胞核, PBS洗5次, 每次5 min。高内涵细胞成像系统488与597通道观测细胞荧光强度。

3.3 统计学分析 实验数据采用SPSS 18.0数据处理软件进行统计分析, 以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素ANOVA方差分析方法进行显著性检验, 以 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著性差异。

作者贡献: 张博文为本文第一作者, 负责实验实施、数据处理和论文撰写; 郑晓珂和李孟负责论文的审阅和提出写作的建议; 王小兰负责对化合物的活性进行筛选; 杨颖、周诗琪、陶思琦、杨梦、朱登辉、徐雅桐对提取分离和结构鉴定提供了一定帮助; 郑晓珂和冯卫生负责实验设计。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Yue LL, Wang LS, Cheng DY, et al. Research progress in Chinese medicine *Ephedrae Radix et Rhizoma* [J]. *China Pharm* (中国药师), 2015, 18: 1383-1386.
- [2] Yang YF, Lu Y, Wu GF, et al. Experimental study on the hypotensive effect of *Ephedra* root extracts on the spontaneously hypertensive rats [J]. *Chin Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2010, 30: 1434-1436.
- [3] Yang YF, Lu Y, Wu GF, et al. Pharmacological screening of anti-hypertensive active sites of *Ephedrae* root [J]. *Her Med* (医药导报), 2010, 29: 860-862.
- [4] Tao HM, Wang LS, Cui Z, et al. Dimeric proanthocyanidins from the roots of *Ephedra sinica* [J]. *Planta Med*, 2008, 29: 1823-1825.
- [5] Tao HM. The Chemical Constituents of the Roots of *Ephedra sinica* Stapf and *Asparagus filicinus* Buch-Ham (麻黄根及羊齿天门冬化学成分研究) [D]. Changchun: Jilin University, 2009.
- [6] Kim IS, Park YJ, Sung SJ, et al. Ephedrannin A and B from roots of *Ephedra sinica* inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by suppressing nuclear factor- κB activation in RAW 264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 1616-1625.
- [7] Khan A, Jan G, Khan A, et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Ephedra Gerardiana* (root and stem) crude extract and fractions [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 2017: 4040254.
- [8] Tian NN, Yong XH, Zhu YX, et al. Mahuang (herbaceous stem of *Ephedra* spp.): chemistry, pharmacodynamics, and pharmacokinetics [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47:

- 3409-3424.
- [9] Wu HZ, Lu Y, Ai LQ, et al. Research advance on chemical constituents and pharmacological activities of Radix Ephedrae [J]. Asian Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2008, 4: 150-153.
- [10] Tao HM, Zhu QH, Liu YH. Flavonoids from roots of *Ephedra sinica* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 1678-1682.
- [11] Qi Y. Research on ultrasonic extraction process of total flavonoids from the roots of *Ephedra sinica* Stapf [J]. China Mod Med (中国当代医药), 2017, 24: 85-88.
- [12] Li ZJ, Li F, Fei L, et al. Extraction process of polyphenols from *Ephedra sinica* root [J]. Anim Feed Sci Technol (畜牧与饲料科学), 2020, 41: 87-91.
- [13] Tao HM, Wang DS, Cui ZC, et al. Chemical constituents from *Ephedra* root [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 533-536.
- [14] Sonar VP, Fois B, Distinto S, et al. Ferulic acid esters and withanolides: in search of *Withania somnifera* GABA_A receptor modulators [J]. J Nat Prod, 2019, 82: 1250-1257.
- [15] Huang S, Xu P, Shen DD, et al. GPCRs steer G_i and G_s selectivity via TM5-TM6 switches as revealed by structures of serotonin receptors [J]. Mol Cell, 2022, 82: 2681-2695.
- [16] E HC, Zhou W, Liu BS, et al. Secondary metabolites from the fungus *Engyodontium album* associated with the South China Sea starfish *Anthenea pentagonula* [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2013, 32: 7-12.
- [17] Liu YB, Cheng XR, Tan JJ, et al. Chemical constituents of *Toona ciliata* var. *pubescens* [J]. Chin J Nat Med, 2011, 9: 115-119.
- [18] Miao SM, Zhang XB, Wang JL, et al. A review of the phytochemistry and pharmacological activities of *Ephedra* herb [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18: 321-344.
- [19] Sun GB, Sun JR. Discussion about the natural existence and safety of phthalic acid esters [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2011, 11: 1-8.
- [20] Ma Y, Gui W. Chemical constituents from *Dryopteris cryoitoana* Kurata [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37: 1315-1317.
- [21] Zhang YY, Gan JY, Lu CS, et al. Studies on chemical constituents of Zhuang Medicine *Alysicarpus svagnalis* Herb [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2021, 44: 1138-1141.
- [22] Feng WS, Li Q, Zheng XK. Studies on chemical constituents of *Lysionotus pauciflorus* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2007, 42: 337-338.
- [23] Nu F, Xie GB, Cui Z, et al. Chemical constituents from roots of *Semiaquilegia adoxoides* [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15: 251-254.