DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.049

党参中木脂素类化学成分及其抗缺氧活性研究

闫萌[1],王盈静[1],李建宽[1],周江韬[1],李晓敏[2],程卓阳[1],高建平[1]
(1.山西医科大学药学院,山西 晋中 030600;2.平顺县农业农村局,山西 平顺 047400)

摘要:研究党参中木脂素类化学成分的结构及其抗缺氧活性。对党参醇提物通过系统溶剂萃取、D-101大孔吸附树脂、硅胶和ODS柱色谱,结合制备型高效液相色谱等进行单体化合物的分离纯化,利用化合物理化性质和多种波谱学方法进行结构鉴定。通过$CoCl_2$建立PC12细胞缺氧模型进行化合物抗缺氧活性体外筛选。检测高活性单体化合物在不同浓度条件下对缺氧细胞的乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)、活性氧(Reactive oxygen species,ROS)、线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential,MMP)的影响。最终从党参中分离纯化得到10个木脂素类化合物,分别为五味子醇甲(1),Gomisin N(2),五味子酯甲(3),当归酰基戈米辛Q(4),当归酰基戈米辛H(5),苯甲酰戈米辛Q(6),五味子醇乙(7),和厚朴酚(8),厚朴酚(9),Codonopiloneolignanin A(10),其中化合物1、3~7、10能增加缺氧PC12细胞的活力,化合物1、3、4和6在10 μmol/L浓度条件下保护率达到20%。化合物3(五味子酯甲)能够减少$CoCl_2$缺氧诱导的PC12细胞中LDH的泄漏量,增强细胞活力,减少缺氧细胞中ROS的生成、减缓缺氧导致的线粒体膜电位下降。从党参中分离得到10个木脂素类化合物中,1~7为联苯环辛烯型木脂素,8~9为联苯类木脂素,10是具有独特桥环碳环骨架的新木脂素化合物,其中1~9为首次从党参属中分离获得。化合物1、3~7、10对缺氧导致的神经细胞损伤有保护作用。化合物1、3、4和6在10 μmol/L浓度条件下保护率达到20%。化合物3(五味子酯甲)可能通过抑制缺氧细胞中ROS的生成、减缓缺氧导致的MMP去极化程度保护缺氧PC12细胞。

关键词:党参;化学成分;联苯环辛烯型木脂素;缺氧;线粒体膜电位
中图分类号:R284.1;R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0248-10

Lignans from Dangshen(*Codonopsis pilosula*) and Study of Their Anti-hypoxic Activities

YAN Meng[1],WANG Yingjing[1],LI Jiankuan[1],ZHOU Jiangtao[1],LI Xiaomin[2],CHENG Zhuoyang[1],GAO Jianping[1]
(1. School of Pharmacy of Shanxi Medical University,Jinzhong 030600,Shanxi,China;
2. Pingshun County Agricultural and Rural Bureau,Pingshun 047400,Shanxi,China)

Abstract:To study the structure of lignans from Dangshen(*Codonopsis pilosula*) and their anti-hypoxic activities. The ethanol extracts of Dangshen(*Codonopsis pilosula*) were separated and purified by D-101 column,silica gel column,ODS column and preparation HPLC. The structures were identified by physicochemical properties and various spectroscopic data. Highly differentiated PC12 cells with neuro-like properties were used to establish a chemical hypoxia model by $CoCl_2$ to screen the anti-hypoxic activity of the isolated compounds. The compound with the best anti-hypoxia activity was chosen for further investigation for the effects on lactate dehydrogenase(LDH),reactive oxygen species(ROS) and mitochondrial membrane potential(MMP) under different concentrations. Ten compounds were classified as schisandrin A(1),Gomisin N(2),schisandrol A(3),angylogyl gomisin Q(4),angylogyl gomisin H(5),benzoylgomisin Q(6),gomisin A(7),honokiol(8),magnolol(9) and Codonopiloneolignanin A(10). Compounds 1,3-7 and 10 could increase the viability of hypoxic PC12 cells. The protection rates of compounds 1,3,4 and 6 were more than 20% at 10 μmol/L. Compound 3(schisandrol A) could reduce the leakage of LDH in PC12 cells of hypoxia induced by $CoCl_2$,reduce the production of ROS and slow down the decline of mitochondrial membranepotential caused by hypoxia. Ten lignans were isolated from Dangshen(*Codonopsis pilosula*). Compounds 1-7 were dibenzo(a,c) cyclooctene lignans,compounds 8-9 were biphenyl lignans,compound 10 was new lignans with unique bridge ring carbon ring skeleton. Compounds 1-9 were isolated from the genus of Codonopsis for the first time. Compounds 1,3-7 and 10 had a protective effect on neuronal cell damage caused by hypoxia. The protection rate of compounds 1,3,4 and 6 were more than 20% at 10 μmol/L. Compound 3(schisandrol A) might exert its protective activity by inhibiting the production of ROS in hypoxic cells and slowing down the degree of MMP depolarization caused by hypoxia.

Keywords:Dangshen(*Codonopsis pilosula*);chemical components;dibenzo(a,c) cyclooctene lignans;hypoxia;mitochondrial membrane potential

基金项目:山西省科技厅青年科学研究项目(202203021212380);山东省科技厅技术创新引导计划项目(YDZX2023027)
作者简介:闫萌(1998-),女,甘肃酒泉人,硕士在读,研究方向:天然药物化学。
通讯作者:高建平(1963-),女,山西阳泉人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药药效物质基础与质量评价。E-mail:jpgao123@163.com。
程卓阳(1992-),女,山西临汾人,讲师,博士,研究方向:中药及天然药物中活性成分的研究与开发。E-mail:chengzy0328@163.com。

氧气是生命活动的重要物质基础,当机体的供氧量不足或者用氧障碍时,机体便会因缺氧而产生过度的氧化应激,引发炎症反应、细胞凋亡及能量代谢紊乱等[1]。近年来,天然来源的抗缺氧药物成为一大研究热点,生物碱、萜类、黄酮等成分均被证实具有良好的抗缺氧活性[2-5]。党参来源于桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula*(Franch.)Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta*(Nannf.)L. T. Shen 或川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根[6]。产于山西长治市平顺县、壶关县和晋城市陵川县等地区的党参称为"潞党参",是著名的道地药材。课题组长期从事潞党参化学成分和质量标准的研究,从潞党参中提取分离出菊粉型均一多糖、三萜、甾体、苯丙素等类型化合物,且具有抗炎、抗胃溃疡等生物活性[7-10]。已有研究发现富硒板党、党参保健酒、党参超微饮片等具有提高机体缺氧耐受能力的作用,且以党参为君药的复方党参片和复方党参胶囊用于防治急性高原病,对于高原低氧环境造成的人脑功能的损伤有明显防治作用[11-15],但目前对于党参抗缺氧作用的研究主要集中在党参的粗提物如醇提物、党参多糖、党参总皂苷等[16-17],未见具体小分子成分抗缺氧作用的相关报道。本实验从党参中分离得到10个木脂素类化合物,通过具有类神经特性的高分化PC12细胞,建立 $CoCl_2$ 化学缺氧模型筛选其抗缺氧活性,以期为党参抗缺氧功能产品的开发利用提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器 KDM型调温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);A-1000s型真空水流抽气机(上海爱朗仪器有限公司);DLSB-5/20型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司);TH-Ⅱ型数控薄层显色加热器(上海科哲生化有限公司);LC-AT20型高效液相色谱仪(日本岛津);HF90型 CO_2 培养箱(力康生物医疗有限公司);AMR-100型全自动酶标分析仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 主要试剂和药材 柱层析硅胶(青岛海洋化工厂);D-101大孔吸附树脂(成都科龙化工试剂厂);ODS(日本YMC公司);其他分析纯和色谱纯试剂(天津风船化学试剂有限公司和天津科密欧化学品有限公司);RPMI 1640培养基(Gibco公司);胎牛血清、青霉素链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶溶液(武汉普诺赛公司);JC-1检测试剂盒(北京索莱宝公司);活性氧(Reactive oxygen species,ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术公司)。

党参药材由课题组于2020年购自山西省长治市平顺县党参种植基地,经山西医科大学药学院高建平教授鉴定为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula*(Franch.)Nannf. 的干燥根,样品存放于山西医科大学药学院中药教研室(样品编号20180601);大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC12购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0481)。

2 方法

2.1 提取分离 将10 kg党参用70%的乙醇加热回流提取3次,每次1.5 h,合并提取液后旋转蒸发得到浓缩浸膏,将浸膏分散至水中,分别用石油醚、乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,减压浓缩后得到石油醚部分(18.2 g),乙酸乙酯部分(60.4 g),正丁醇部分(230 g)。将乙酸乙酯部分通过减压硅胶柱进行分离,溶剂系统采用二氯甲烷/甲醇,分别用体积比为100/0→100/1→50/1→30/1→20/1→10/1→5/1→3/1→1/1→0/1梯度洗脱,洗脱液浓缩后经薄层色谱(Thin layer chromatography,TLC)检测,合并相似组分,得到5个部分:Fr. A、Fr. B、Fr. C、Fr. D、Fr. E。将Fr. A、Fr. B、Fr. C分别通过D-101大孔树脂柱分离,溶剂系统采用乙醇/水,依次用30%、60%、95%的乙醇洗脱,洗脱液浓缩后经过HPLC分析(分析条件为:10%~100%甲醇,60 min,检测波长210 nm),合并出峰时间段相似的组分,得到Fr. a(11 g)、Fr. b(30 g)、Fr. c(10.6 g)3个部分。然后通过十八烷基硅烷键合硅胶填料(Octadecylsilyl,ODS)柱色谱分别将这3个部分分离,溶剂系统采用甲醇/水,根据HPLC分析结果设置梯度浓度洗脱,具体条件如下:Fr. a(10%、35%、60%、100%)、Fr. b(40%、60%、80%,100%)、Fr. c(70%、80%、90%、100%)。洗脱成分通过TLC以及HPLC检测,合并相似组分,得到6个馏分:Fr. 1,Fr. 2,Fr. 3,Fr. 4,Fr. 5,Fr. 6。将Fr. 5(15 g)用硅胶柱分离,得到Fr. 5.1~5.10共10个馏分,然后通过制备柱与半制备柱分离纯化。Fr. 5.3经过半制备得到化合物2(21.6 mg);Fr. 5.4经过半制备柱得到化合物9(2.1 mg);Fr. 5.5经过半制备柱得到化合物1(4.0 mg)、8(28.4 mg);Fr. 5.6经过半制备柱得到化合物8(3.4 mg)。将Fr. 4(13 g)用硅胶柱分离,得到Fr. 4.1~4.14 14个馏分,Fr. 4.7经过半制备柱得到化合物7(2.8 mg);Fr. 4.8经过半制备柱得到化合物4(4.4 mg);Fr. 4.9经过半制备柱得到化合物3(10.2 mg)、5(6.2 mg)、6(1.7 mg)、10(6.8 mg);Fr. 4.10经过半制备柱得到化合物3(4.0 mg)。见图1。

2.2 细胞培养 PC12细胞采用含有10%胎牛血清、1%青-链霉素(1×10^5 μg/L)的RPMI 1640培养基培养,条件为37 ℃、5% CO_2,待细胞汇合率达到70%~80%时进行1/2~1/4传代。实验所用细胞均状态良好。

2.3 细胞缺氧模型的建立 取对数生长期的细胞,以 1×10^5 cells/mL,100 μL/孔接种于96孔细胞板,置于37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养24 h细胞贴壁后用 $CoCl_2$ 造模[18],设置 $CoCl_2$ 浓度为:0、100、200、300、400、500、1000 μmol/L。同时设置空白组(只加完全培养基),每个浓度设置4个平行孔。给药后置于培养箱中培养,12 h后用CCK-8法检测细胞活力。

2.4 化合物对PC12细胞活力的影响 将分离得到的化合物用DMSO配置成50 mol/L的母液备用。取对数生长期的细胞,以 1×10^5 cells/mL,100 μL/孔接种于96孔细胞板,置于37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养24 h细胞贴壁后给药,药物浓度为:0、0.1、1、10、50、100、250、500 μmol/L,同时设置空白组(只加完全培养基),每个浓度设置4个平行孔。给药后置于培养箱中培养,24 h后用CCK-8法检测细胞活力[细胞活力(%)=$OD_{给药}-OD_{空白}/OD_{0加药}-OD_{空白}\times100$]。

2.5 化合物对缺氧细胞的保护作用 选择50 μmol/L浓度内对细胞没有毒性的药物,取对数生长期的细胞,以 1×10^5 cells/mL、100 μL/孔接种于96孔细胞板,置于37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养24 h细胞贴壁后给药处理,药物浓度设置为10、25、50 μmol/L。同时设置空白组(只加完全培养基)和对照组(只加细胞和培养基),每组4个复孔。预给药12 h后换含有400 μmol/L $CoCl_2$ 的RPMI 1640培养基,培养箱继续培养12 h。用CCK-8法检测细胞活力,在450 nm条件下用酶标仪检测OD值,用保护率反映药物对缺氧细胞的保护作用[保护率(%)=(给药组OD值-模型组OD值)/(对照组OD值-模

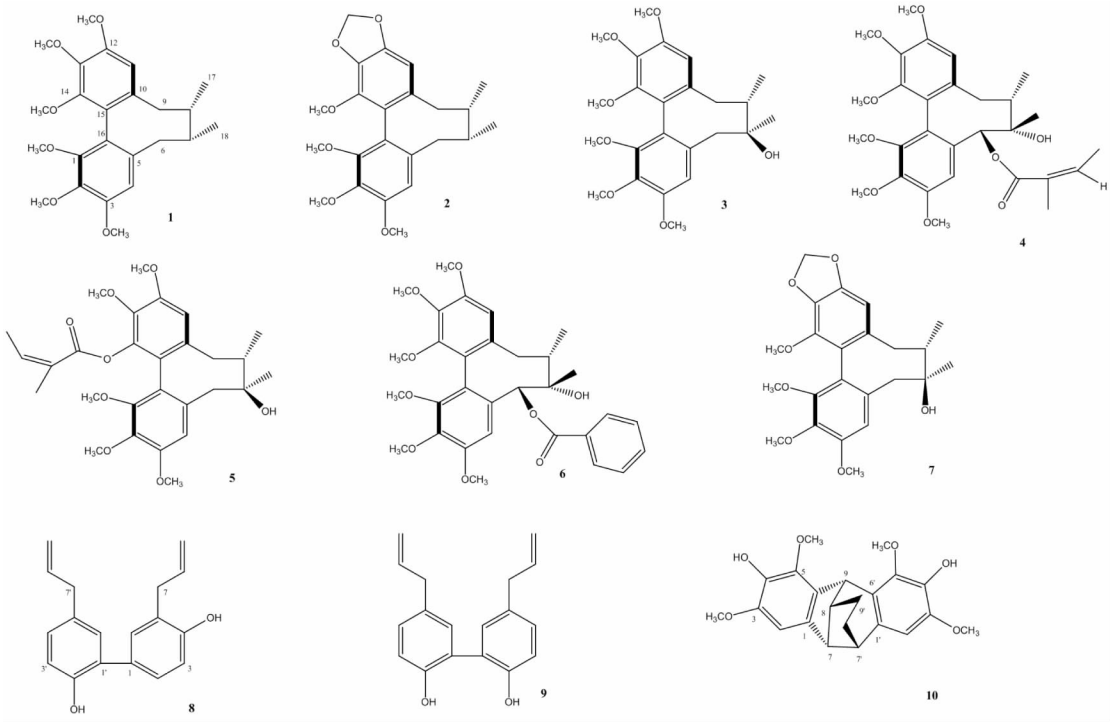


图1 化合物1~10的化学结构式

型组OD值)×100]。

2.6 药物对缺氧PC12细胞LDH的影响 取对数生长期的细胞,以1×10^5 cells/mL、100 μL/孔接种于96孔细胞板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h细胞贴壁后给药处理,药物浓度设置为20、40、80 μmol/L。同时设置空白组(只加完全培养基)和对照组(只加细胞和培养基),每组4个复孔。预给药12 h后换含有400 μmol/L $CoCl_2$的RPMI 1640培养基,培养箱继续培养12 h。按照乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒说明书测定LDH含量。

2.7 药物对缺氧PC12细胞ROS的影响 取对数生长期的细胞,以1×10^5 cells/mL、1 mL/孔接种于12孔细胞板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h细胞贴壁后给药处理,药物浓度设置为20、40、80 μmol/L,同时设置对照组(只加细胞和培养基)。预给药12 h后换含有400 μmol/L $CoCl_2$的RPMI 1640培养基,培养箱继续培养12 h。按照ROS试剂盒说明书安装探针,后置于荧光显微镜下检测荧光,用Image J软件定量分析。

2.8 药物对缺氧PC12细胞线粒体膜电位的影响 JC-1是一种荧光探针,能靶向进入线粒体中聚集在带负电的线粒体内部,在线粒体中表现出电位依赖性,可以用红绿荧光的比值反映线粒体膜电位去极化程度。取对数生长期的细胞,以1×10^5 cells/mL、1 mL/孔接种于12孔细胞板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养24 h细胞贴壁后给药处理,药物浓度设置为20、40、80 μmol/L。同时设置对照组(只加细胞和培养基)。预给药12 h后换含有400 μmol/L $CoCl_2$的1640培养基,培养箱继续培养12 h。按照JC-1试剂盒说明安装探针,后置于荧光显微镜下分别检测红绿荧光,用Image J软件定量分析。

3 结果

3.1 结构鉴定 化合物1:黄色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈紫红色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:439.2 [M+Na]$^+$,分子式为$C_{24}H_{32}O_6$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.54(1H,s,H-4),6.53(1H,s,H-11),3.90(3H,s,14-OCH_3),3.89(3H,s,13-OCH_3),3.88(3H,s,12-OCH_3),3.87(3H,s,3-OCH_3),3.59(3H,s,2-OCH_3),3.58(3H,s,1-OCH_3),2.58(1H,dd,J=13.6,7.5 Hz,H-6α),2.50(1H,dd,J=13.6,1.8 Hz,H-6β),2.28(1H,dd,J=13.3,9.6 Hz,H-9α),2.05(1H,d,J=13.1 Hz,H-9β),1.91(1H,m,H-7),1.81(1H,m,H-8),1.02(3H,d,J=7.1 Hz,7-CH_3),0.74(3H,d,J=7.1 Hz,8-CH_3)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 153.0(C-3),151.7(C-1),151.7(C-12),151.5(C-14),140.2(C-2),139.8(C-13),139.3(C-5),134.1(C-10),123.5(C-15),122.4(C-16),110.6(C-11),107.3(C-4),61.1(1-OCH_3),61.1(14-OCH_3),61.1(2-OCH_3),60.7(13-OCH_3),56.1(3-OCH_3),56.0(12-OCH_3),40.9(C-7),39.3(C-9),35.7(C-6),33.9(C-8),30.7(C-18),12.8(C-17)。以上数据与文献报道的五味子醇甲(Schisandrin A)[19]基本一致。

化合物2:白色晶体,10%浓硫酸-香草醛显色呈紫色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:423.19[M+Na]$^+$,分子式为$C_{23}H_{28}O_6$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.55(1H,s,H-4),6.47(1H,s,H-11),5.95(d,J=1.2 Hz,1H,-O-CH_2-O-),5.95(2H,d,J=1.2 Hz,-O-CH_2-O-),3.89,3.88,3.81,3.54(12H,s,14,3,2,1-OCH_3),2.57(1H,dd,J=13.7,7.3 Hz,H-6β),2.52(1H,dd,J=13.7,2.0 Hz,H-6α),2.22(1H,dd,J=13.4,9.4 Hz,H-9α),2.02(1H,d,J=13.1,H-9β),1.89(1H,m,H-8),1.79(1H,m,H-7),0.97(3H,d,J=7.2 Hz,7-CH_3),0.73(3H,d,J=7.1 Hz,8-CH_3)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 151.8(C-1),151.7(C-3),148.8(C-12),141.2(C-14),140.2(C-2),138.0(C-10),134.7(C-13),134.2(C-5),123.4(C-16),121.5(C-15),110.7(C-4),103.1(C-11),100.9

(-O-CH_2-O-),61.2(C-2),60.7(C-1),59.8(C-14),56.0(C-3),40.8(C-8),39.3(C-6),35.6(C-9),33.7(C-7),21.7(C-17),13.0(C-18)。以上数据与文献报道的Gomisin N[20]基本一致。

化合物3:白色晶体,10%香草醛-浓硫酸显色呈橙色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:455.16[M+Na]$^+$,分子式为$C_{24}H_{32}O_7$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.61(1H,s,H-11),6.54(1H,s,H-4),3.90(3H,s,12-OCH_3),3.89(3H,s,3-OCH_3),3.88(3H,s,1-OCH_3),3.88(3H,s,13-OCH_3),3.59(3H,s,14-OCH_3),3.58(3H,s,2-OCH_3),2.67(1H,d,J=2.0 Hz,H-9α),2.63(1H,d,J=2.0 Hz,H-9β),2.39(1H,d,J=7.7 Hz,H-6α),2.35(1H,d,J=7.7 Hz,H-6β),1.89(1H,s,H-8),1.25(3H,s,H-18),0.82(3H,d,*J*=7.2 Hz,H-17)。^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ_C 152.5(C-3),152.2(C-1),152.0(C-12),151.7(C-14),140.9(C-2),140.3(C-13),134.0(C-10),132.0(C-5),124.3(C-16),122.9(C-15),110.6(C-4),110.1(C-11),72.0(C-7),61.1(2-OCH_3),60.8(1-OCH_3),60.7(14-OCH_3),56.1(3-OCH_3),56.0(12-OCH_3),42.0(C-8),41.0(C-6),34.4(C-9),30.0(C-18),16.0(C-17)。以上数据与文献报道的五味子酯甲(Schisandrol A)[21]基本一致。

化合物4:黄色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈橙色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:553.29[M+Na]$^+$,分子式为$C_{29}H_{38}O_9$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.77(1H,s,H-4),6.54(1H,s,H-11),5.95(1H,q,J=6.7 Hz,H-3′),5.71(1H,s,H-6),3.93(3H,s,13-OCH_3),3.89(3H,s,3-OCH_3),3.88(3H,s,12-OCH_3),3.81(3H,s,2-OCH_3),3.57(3H,s,14-OCH_3),3.51(3H,s,1-OCH_3),2.33(1H,dd,J=14.0,9.9 Hz,H-9α),2.19(1H,d,J=14.0 Hz,H-9β),1.99(1H,m,H-8),1.81(3H,dd,J=7.3,1.7 Hz,H-4′),1.33(3H,s,H-18),1.30(3H,t,J=1.8 Hz,H-5′),1.16(3H,s,H-17)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 166.0(C-1′),153.3(C-12),152.3(C-1),152.1(C-3),150.9(C-14),142.0(C-3′),141.0(C-2),140.0(C-13),136.6(C-10),130.3(C-5),127.0(C-2′),122.6(C-16),122.3(C-15),110.1(C-4),107.4(C-11),84.4(C-6),72.5(C-7),61.0(2-OCH_3),60.8(13-OCH_3),60.7(1-OCH_3),60.3(14-OCH_3),56.2(12-OCH_3),56.1(3-OCH_3),42.2(C-8),36.9(C-9),28.3(C-18),19.9(C-5′),19.2(C-17),15.8(C-4′)。以上数据与文献报道的当归酰基戈米辛Q(Angylogyl gomisin Q)[22]基本一致。

化合物5:白色晶体,10%香草醛-浓硫酸显色呈绿色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:523.28[M+Na]$^+$,分子式为$C_{28}H_{36}O_8$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.69(1H,s,H-11),6.56(1H,s,H-4),5.88(1H,m,H-3′),3.91(3H,s,12-OCH_3),3.88(3H,s,3-OCH_3),3.84(6H,s,2/13-OCH_3),3.55(3H,s,1-OCH_3),2.70(1H,m,H-6α),2.70(1H,m,H-9α),2.38(1H,dd,J=14.3,7.7 Hz,H-9β),2.34(1H,d,J=13.8 Hz,H-6β),1.82(1H,m,H-8),1.77(1H,m,H-4′),1.75(3H,d,J=2.8 Hz,H-5′),1.25(3H,s,H-18),0.85(3H,d,J=7.3 Hz,H-17)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 152.7(C-3),152.0(C-12),151.8(C-1),142.4(C-14),140.5(C-2),139.8(C-13),137.5(C-3′),134.0(C-10),133.2(C-5),127.8(C-2′),123.3(C-15),123.0(C-16),112.9(C-11),110.2(C-4),72.1(C-7),61.1(1-OCH_3),60.9(13-OCH_3),60.8(2-OCH_3),56.2(3/12-OCH_3),56.2(12-OCH_3),42.1(C-8),40.8(C-6),34.4(C-9),29.8(C-18),20.5(C-5′),16.0(C-17),15.5(C-4′)。以上数据与文献报道的当归酰戈米辛H(Angylogyl gomisin H)[21]基本一致。

化合物6:黄色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈紫色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:575.2[M+Na]$^+$,分子式为$C_{31}H_{36}O_9$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 7.46(1H,t,J=7.7 Hz,H-2′),7.36(2H,d,J=7.7 Hz,H-6′),7.27(1H,s,H-3′),7.25(1H,s,H-4′),6.82(1H,s,H-4),6.69(1H,s,H-11),5.95(1H,s,H-6),3.99(3H,s,3-OCH_3),3.95(3H,s,12-OCH_3),3.89(3H,s,13-OCH_3),3.59(3H,s,2-OCH_3),3.39(3H,s,14-OCH_3),3.17(3H,s,1-OCH_3),2.42(1H,d,J=14.1 Hz,H-9α),2.30(1H,d,J=14.1 Hz,H-9β),2.14(1H,m,H-8),1.36(3H,s,H-18),1.21(3H,d,J=7.1 Hz,H-17)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 165.8(-CO-),153.4(C-12),152.3(C-1),152.1(C-3),150.8(C-14),142.9(C-2),140.1(C-13),136.5(C-10),133.4(C-4′),130.0(C-5),129.7(C-2′/6′),129.3(C-1′),127.9(C-3′/5′),122.6(C-15),122.6(C-16),110.3(C-4),107.2(C-11),84.6(C-6),72.7(C-7),61.0(2-OCH_3),60.9(13-OCH_3),60.3(1-OCH_3),59.9(14-OCH_3),56.2(3-OCH_3),56.2(12-OCH_3),42.4(C-8),37.0(C-9),28.2(C-18),19.2(C-17)。以上数据与文献报道的苯甲酰戈米辛Q(Benzoylgomisin Q)[22]基本一致。

化合物7:黄棕色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈黄色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:439.51[M+Na]$^+$,分子式为$C_{23}H_{28}O_7$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.62(1H,s,H-4),6.48(1H,s,H-11),5.99-5.94(2H,m,-OCH_2O-),3.90(6H,s,1/14-OCH_3),3.84(3H,s,3-OCH_3),3.52(3H,s,2-OCH_3),2.67(1H,d,J=2.0 Hz H-6α),2.63(1H,d,J=2.0 Hz H-6β),2.39(1H,d,J=7.7 Hz H-9α),2.35(1H,d,J=7.7 Hz,9β),1.87(1H,m,-OH),1.86(1H,m,H-8),1.25(3H,s,H-18),0.82(3H,d,J=7.3 Hz,H-17)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 152.5(C-3),152.3(C-1),149.0(C-12),141.3(C-14),140.9(C-2),135.1(C-13),132.6(C-10),132.2(C-5),124.3(C-16),122.0(C-15),110.4(C-4),106.1(C-11),100.98(-OCH_2O-),71.8(C-7),61.2(2-OCH_3),60.8(1-OCH_3),59.8(14-OCH_3)56.1(3-OCH_3),42.2(C-8),40.6(C-6),33.8(C-9),30.3(C-18),16.0(C-17)。以上数据与文献报道的五味子醇乙(Gomisin A)[23]基本一致。

化合物8:棕黄色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈橙色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:289.43[M+Na]$^+$,分子式为$C_{18}H_{18}O_2$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(400 MHz,$CDCl_3$)δ7.22-6.91(6H,m,Ar-H),6.01(2H,m,H-8/8′),5.20(2H,m,H-9/9′α),5.05(2H,m,H-9/9′β),

3.46(2H,d,J = 6.7 Hz,H-7/7′α),3.35(2H,d,J = 6.7 Hz,H-7/7′β)。^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ_C 154.2(C-4),151.0(C-2′),137.9(C-8′),136.2(C-8),132.3(C-4′),131.2(C-6′),130.4(C-4′),129.6(C-1),128.9(C-2),128.7(C-6),127.9(C-5),126.6(C-1′),117.0(C-9),117.0(C-3),116.7(C-9′),115.7(C-3′),39.6(C-7′),35.3(C-7)。以上数据与文献报道的和厚朴酚(Honokiol)[24]基本一致。

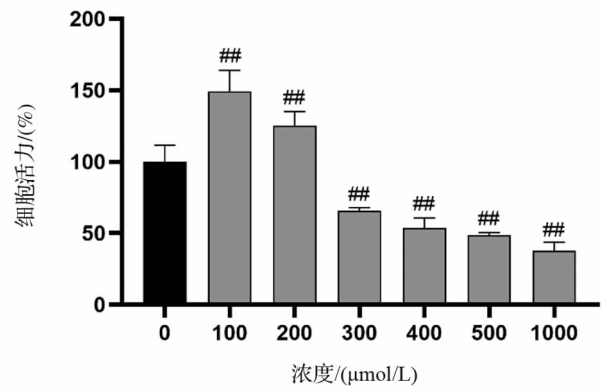
化合物9:棕黄色油状物,10%香草醛-浓硫酸显色呈橙色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:265.11[M-H]$^-$,分子式为$C_{18}H_{18}O_2$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 7.13(2H,dd,J=8.3,2.2 Hz,H-6/6′),7.08(2H,d,J=2.2 Hz,H-4/4′),6.96(2H,d,J=8.3 Hz,H-3/3′),5.96(2H ddt,J=16.8,10.1,6.7 Hz,H-8/8′),5.12-5.04(2H,m,H-9/9′),3.37(2H,d,J=6.8 Hz,H-7/7′)。^{13}C-NMR(100 MHz,$CDCl_3$)δ_C 151.4(C-2/2′),137.7(C-8/8′),133.2(C-5/5′),131.4(C-6/6′),130.0(C-4/4′),124.1(C-1/1′),116.8(C-3/3′),115.9(C-9/9′),39.5(C-7/7′)。以上数据与文献报道的厚朴酚(Magnolol)[24]基本一致。

化合物10:白色晶体,10%香草醛浓硫酸显色呈橙色,易溶于乙酸乙酯等溶剂。ESI-MS m/z:407.08[M+Na]$^+$,分子式为$C_{22}H_{24}O_6$。具体数据归属如下:^{1}H-NMR(600 MHz,$CDCl_3$)δ_H 6.63(1H,s,H-6),6.21(1H,s,H-6′),4.32(1H,d,J=5.4 Hz,H-9),3.96(3H,s,3′-OCH_3),3.95(3H,s,3-OCH_3),3.81(3H,s,5-OCH_3),3.77(3H,s,5′-OCH_3),3.34(2H,m,H-7),3.16(1H,qt,J=6.3,1.3 Hz,H-8),2.95(2H,t,J=4.2 Hz,H-7′),2.15(1H,m,H-8′α),1.87(1H,m,H-8′β),1.80(1H,m,H-9′α),1.55(1H,m,H-9′β)。^{13}C-NMR(150 MHz,$CDCl_3$)δ_C 146.3(C-5′),146.2(C-5),143.5(C-3′),141.2(C-3),136.6(C-4),136.4(C-4′),135.6(C-1),133.3(C-2),130.7(C-2′),126.1(C-1′),107.0(C-6′),104.2(C-6),61.1(3′-OCH_3),60.8(3-OCH_3),56.5(5-OCH_3),56.2(5′-OCH_3),53.4(C-7),52.9(C-8),45.0(C-7′),43.8(C-9),40.7(C-8′),22.7(C-9′)。以上数据与文献报道的Codonopiloneolignanin A[25]基本一致。

3.2 缺氧模型的建立 用含不同浓度$CoCl_2$的RPMI1640培养基处理细胞12 h,细胞活力结果如图2所示。与对照组(0 μmol/L)相比,PC12细胞的细胞活力随着$CoCl_2$的浓度增大出现先增后降的趋势,在大于300 μmol/L浓度的$CoCl_2$处理会使得细胞活力显著下降($P<0.01$),且当浓度为400 μmol/L浓度时,细胞活力约为对照组的50%,即为半数抑制浓度(IC_{50})。因此确定造模条件为400 μmol/L $CoCl_2$处理12 h。

3.3 木脂素化合物对PC12细胞活力的影响 用CCK-8法检测木脂素对PC12细胞活力的影响,药物处理24 h后细胞活力如图3所示。化合物1、2、3、4、5、6、7、10在50 μmol/L内对细胞没有显著性变化。化合物8、9在大于10 μmol/L浓度时会显著降低PC12细胞活力($P<0.01$)。

3.4 木脂素化合物对缺氧细胞的保护作用 通过计算细胞保护率探究不同浓度化合物对缺氧细胞的影响,结果如插页XXXIX图4所示。化合物1、3~7、10对缺氧细胞的保护作用良好,且具有浓度依赖性。化合物2的3个浓度预处理条件下,均加强了缺氧细胞的损伤。其中化合物1、3、4和6在10 μmol/L浓度条件下保护率达到20%,有较好的保护作用,综合化合物结构和分离所得量,选取化合物3进行后续实验。



注:数值以 mean ± SD 表示。##与0 μmol/L组比较,$P<0.01$。

图2 不同浓度$CoCl_2$对PC12细胞的影响

3.5 不同浓度化合物3对缺氧细胞上清液中LDH含量的影响 用试剂盒检测细胞上清液中的LDH含量。结果如图5所示,模型组LDH含量显著增高(与对照组相比,$P<0.01$),化合物3的3个浓度均能降低LDH的泄漏量(与模型组相比,$P<0.01$),且随着化合物3浓度越高,LDH的释放量越少。

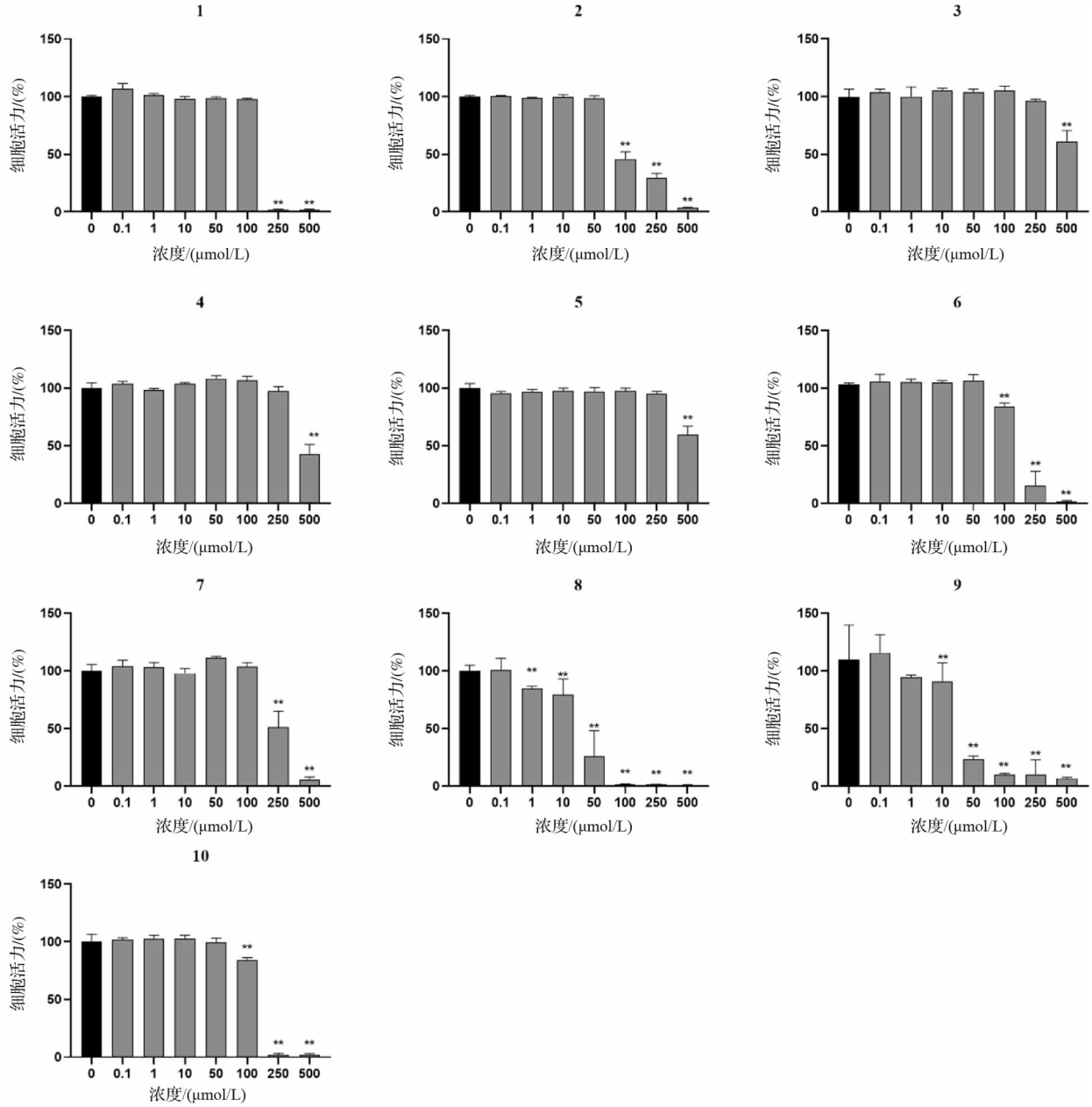
3.6 不同浓度化合物3对缺氧细胞ROS含量的影响 用Image J分析平均荧光强度,结果如插页XLI图6所示。模型组绿色荧光强度增强,说明模型组细胞内的ROS释放量显著增加(与对照组相比,$P<0.01$)。化合物33个浓度均能降低缺氧细胞ROS的释放(与模型组相比,$P<0.01$),且随给药浓度的增加,抑制作用变强,以上结果表明化合物3对缺氧神经细胞的保护作用可能与抑制ROS的释放有关。

3.7 不同浓度化合物3对缺氧细胞线粒体膜电位的影响 用Image J分析红绿荧光强度,结果如插页XLII图7所示。模型组的线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential,MMP)显著降低(与对照组相比,$P<0.01$),化合物33个浓度均能抑制缺氧导致的MMP下降(与模型组相比,$P<0.01$),且随给药浓度的增加,抑制作用变强。以上结果表明,化合物3可能通过维持MMP的稳定来保护缺氧细胞。

4 讨论

党参是中国传统补益类中药,目前已从党参属植物中分离鉴定得到230多种化合物,包括糖类、生物碱类、苯丙素类、聚炔类、萜类、黄酮类等[26-27]。本实验通过硅胶、D-101大孔树脂及ODS柱色谱、制备型HPLC分离得到10个木脂素类化合物。1~7为联苯环辛烯型木脂素,8~9为联苯类木脂素,10是具有独特桥环碳环骨架的新木脂素类。化合物1~9为首次从党参属中分离获得。

在联苯环辛烯结构的7个木脂素中,化合物1、3、4、6在低浓度条件下对缺氧细胞的保护作用优于其他化合物,其结构中存在一个共同点,即C-1,2,3,12,13,14上均为甲氧基,因而推测当联苯环辛烯型木脂素的C-1,2,3,12,13,14上均为甲氧基取代时,对缺氧细胞保护作用更强;且C-7上有羟基取代的化合物对缺氧细胞的保护作用优于C-7上没有羟基取代基的化合物,如化合物3比1的活性更好;C-6位有当归酰基取代时,可能会减弱化合物的保护作用,如化合物4的保



注:数值以 mean ± SD 表示。 * * 与 0 μmol/L 组比较,$P<0.01$。

图3 不同浓度木脂素类化合物对 PC12 细胞活力的影响

护作用弱于3和6;C-6位取代基为苯甲酰基时,对缺氧细胞的保护作用影响不大,如化合物3和6不同浓度下的保护作用相似[28-31]。

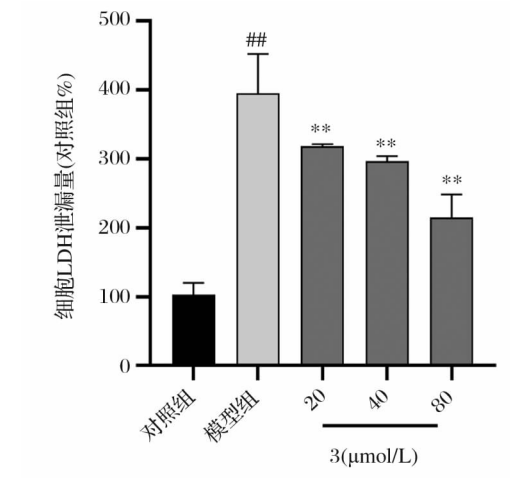
LDH为细胞内酶,细胞受到损伤后细胞膜破裂、LDH外漏,因此测量细胞上清液中LDH的含量能间接反映细胞受损伤的情况[32]。ROS是生物体内含氧自由基或易形成自由基的过氧化物的总称,缺氧时,ROS生成增加,机体氧化平衡受到影响,因此消除体内自由基,减轻氧化应激能减缓缺氧引起的损伤[33]。近年来,线粒体代替细胞核成为细胞凋亡相关机制的研究重点[34],缺氧时,线粒体膜通透性转换孔过度开放,使得线粒体膜电位下降,膜内的细胞色素C、凋亡诱导因子、Caspase前体蛋白等信号物质外泄,继而激活下游的凋亡通路[35-36],因此,MMP作为细胞早期凋亡的标志,维持MMP的稳定,对于保持线粒体的正常功能对预防和治疗缺氧相关疾病的发生具有重要意义。为此,本研究选择用ROS与MMP作为指标初步探索抗缺氧机制。研究结果表明化学缺氧能诱导PC12细胞中LDH、ROS的显著升高,导致细胞损伤和线粒体膜电位下降,化合物3预处理能显著减少缺氧细胞中LDH和ROS,提高MMP,提示五味子酯甲(3)可能通过抑制ROS的生成、减缓MMP去极化保护缺氧PC12细胞。

以上研究表明木脂素类成分可能是党参中重要的抗缺氧活性的物质基础,党参中分离得到的联苯环辛烯类木脂素的抗缺氧活性的构效关系及其机制还需要进一步的研究探索。

参考文献

[1] 王维刚,阳志强,李晓琳,等.抗缺氧中药研究进展[J].天然产物研究与开发,2022,34(2):344-357.

[2] COBB A B,LEVETT D Z H,MITCHELL K,et al. Physiological responses during ascent to high altitude and the incidence of acute



注:数值以 mean ± SD 表示。##与对照组比较,$P<0.01$;**与模型组比较,$P<0.01$。

图5 不同浓度化合物3对细胞LDH的影响

mountain sickness[J]. Physiol Rep,2021,9(7):e14809.

[3] LIU J C,GE Z,JIANG X,et al. A comprehensive review of natural products with anti-hypoxic activity[J]. Chin J Nat Med,2023,21(7):499-515.

[4] HE J Y,MA N,ZHU S,et al. The genus Codonopsis(Campanulaceae):a review of phytochemistry,bioactivity and quality control[J]. J Nat Med,2015,69(1):1-21.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:281.

[6] GAO S M,LIU J S,WANG M,et al. Traditional uses,phytochemistry,pharmacology and toxicology of Codonopsis:a review[J]. J Ethnopharmacol,2018,219:50-70.

[7] ZHOU J T,WANG J J,LI D Y,et al. An inulin-type fructan CP-A from Codonopsis pilosula alleviates TNBS-induced ulcerative colitis based on serum-untargeted metabolomics[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2024,326(3):216-227.

[8] LI J K,WANG T,ZHU Z C,et al. Structure features and anti-gastric ulcer effects of inulin-type fructan CP-A from the roots of Codonopsis pilosula(franch.)nannf[J]. Molecules,2017,22(12):2258.

[9] 王妍. 党参多糖CPC的结构解析及其免疫活性研究[D]. 晋中:山西医科大学,2022.

[10] 张俊卿. 潞党参脂溶性化学成分及其抗炎活性研究[D]. 晋中:山西医科大学,2020.

[11] 谭文波,肖本见. 富硒板党耐缺氧作用的实验研究[J]. 山东医药,2012,52(39):58-59.

[12] 刘燎原. 党参保健酒对小鼠抗疲劳及耐缺氧的作用研究[D]. 西安:陕西中医药大学,2015.

[13] 粟群芳,周紫婧. 党参超微饮片对小鼠抗疲劳和耐缺氧作用的研究[J]. 中医药导报,2010,16(8):95-96.

[14] 张东祥,张延坤,谢印芝. 复方党参胶囊防治急性高原病的效果观察[J]. 解放军预防医学杂志,2005,23(4):271-272.

[15] 王伟光,肖忠海,虞立霞,等. 复方党参对低氧暴露小鼠认知功能的改善作用[J]. 解放军预防医学杂志,2016,34(3):317-319,322.

[16] 刘飞,邹赢锌,焦勇,等. 党参多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠血清S100-β及NSE水平的影响[J]. 实验动物科学,2023,40(5):53-59.

[17] 张壮,韦颖,刘楠,等. 党参皂苷L1对抗缺氧缺糖再给氧诱导大鼠星形胶质细胞损伤的作用[J]. 中国临床康复,2006,10(27):28-31.

[18] KHAKSHOUR E,BAHREYNI-TOOSSI M T,ANVARI K,et al. Evaluation of the effects of simulated hypoxia by $CoCl_2$ on radioresistance and change of hypoxia-inducible factors in human glioblastoma U87 tumor cell line[J]. Mutat Res,2024,828:111848.

[19] PIAO L Z,LEE Y G,SHIN J C. Dibenzocyclooctene lignan compounds isolated from the fruits of Schisandra chinensis Baill[J]. Nat prod sci,2005,(11):248-252.

[20] TAN R,LI L N,FANG Q C. The stereostructure of wuweizisu B[J]. Planta Med,1986,52(1):49-51.

[21] CHOI S K,LEE Y G,WANG R B,et al. Dibenzocyclooctadiene lignans from the fruits of Schisandra chinensis and their cytotoxicity on human cancer cell lines[J]. Appl Biol Chem,2020,63(1):39.

[22] 邸同莲,刘小清,吴楠,等. 五味子中1个新的联苯环辛烯类木脂素[J]. 中草药,2023,54(12):3759-3770.

[23] IKEYA Y,MITSUHASHI H,SASAKI H,et al. Studies on the metabolism of gomisin A(TJN-101). Ⅱ. Structure determination of biliary and urinary metabolites in rat[J]. Chem Pharm Bull(Tokyo),1990,38(1):136-141.

[24] 邓世明,程永现,周俊,等. 长缘厚朴中的新苯醌及新木脂素类化合物[J]. 云南植物研究,2001(1):121-125.

[25] JIANG Y P,GUO Q L,LIU Y F,et al. Codonopiloneolignanin A,a polycyclic neolignan with a new carbon skeleton from the roots of Codonopsis pilosula[J]. Chin Chem Lett,2016,27(1):55-58.

[26] 谢琦,程雪梅,胡芳弟,等. 党参化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 上海中医药杂志,2020,54(8):94-104.

[27] 孙政华,邵晶,郭玫. 党参化学成分及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学,2015,43(33):174-176.

[28] 苏维,王欣悦,付港,等. 南五味子属植物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中药杂志,2024,49(1):26-38.

[29] 刘媛媛,黄仕其,李玉泽,等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2022,53(6):1903-1918.

[30] 余凌虹,刘耕陶. 五味子联苯环辛烯类木脂素成分的结构与药理活性关系和药物创新[J]. 化学进展,2009,21(1):66-76.

[31] PRASHER P,FATIMA R,SHARMA M,et al. Honokiol and its analogues as anticancer compounds:current mechanistic insights and structure-activity relationship[J]. Chem Biol Interact,2023,386:110747.

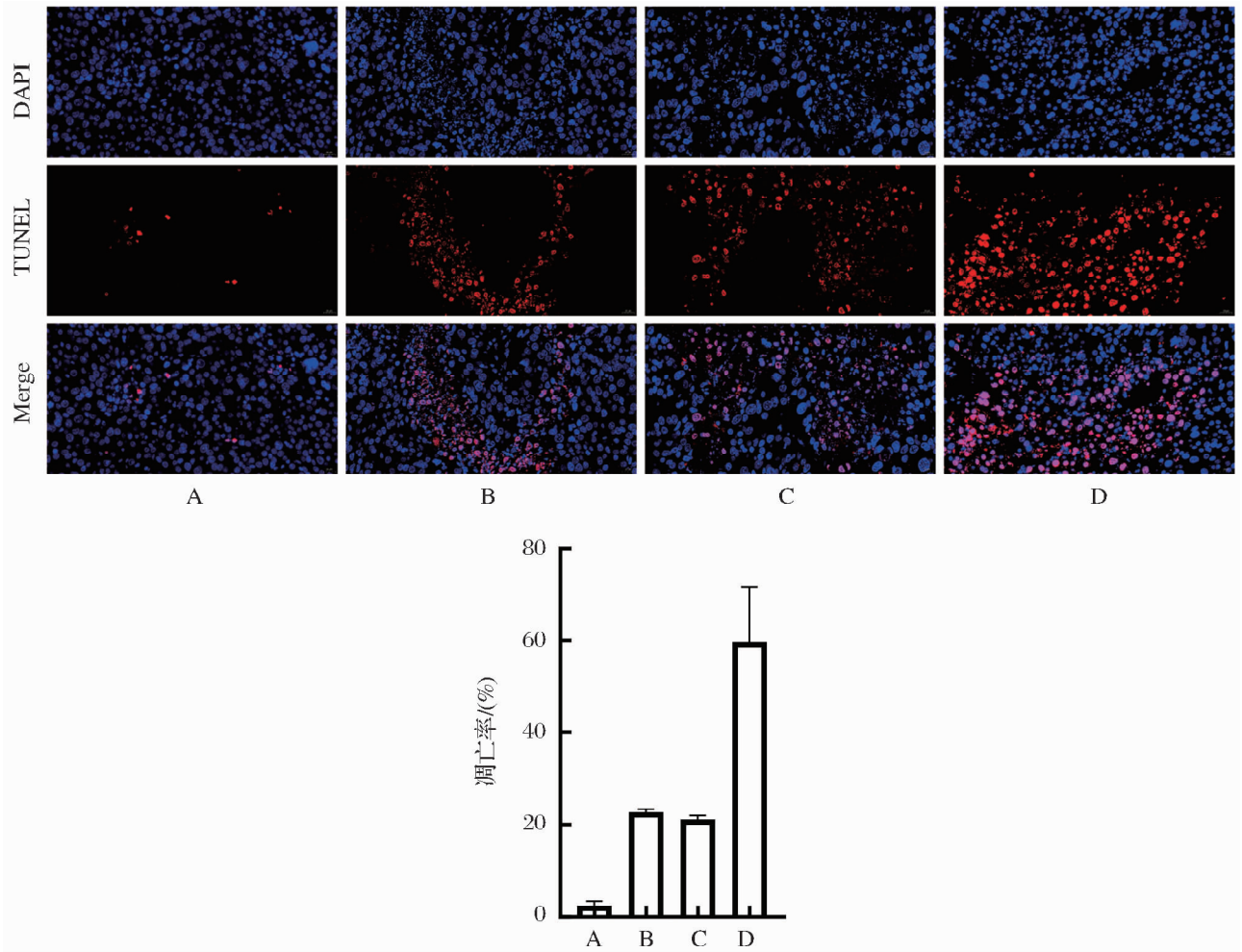
[32] LI X F,ZHANG J H,LIU G A,et al. High altitude hypoxia and oxidative stress:The new hope brought by free radical scavengers[J]. Life Sci,2024,336:122319.

[33] TAZE C,DRAKOULI S,SAMIOTAKI M,et al. Short-term hypoxia triggers ROS and SAFB mediated nuclear matrix and mRNA splicing remodeling[J]. Redox Biol,2022,58:102545.

[34] 蔡循,陈国强,陈竺,等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展,2001,28(1):4.

[35] LIU Y,LIU X B,WANG H,et al. Agrimonolide inhibits cancer progression and induces ferroptosis and apoptosis by targeting SCD1 in ovarian cancer cells[J]. Phytomedicine,2022,101:154102.

[36] 刘晓婷,王延让,张明. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J]. 环境与健康杂志,2013,30(2):182-185.



注：A. Model 组；B. Hedyotis diffusa Willd 组；C. 5－FU 组；D. LY2157299 组。染色后肿瘤组织细胞核在紫外的激发下为蓝色，试剂盒为 TMR 荧光素标记，红色代表凋亡细胞。

图 5 TUNEL 染色检测肾癌细胞凋亡率

党参中木脂素类化学成分及其抗缺氧活性研究

（正文见 248－254 页）

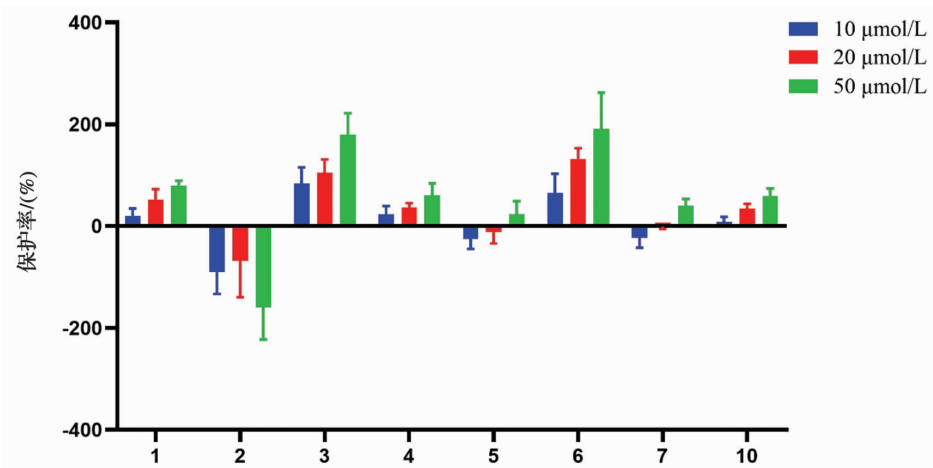
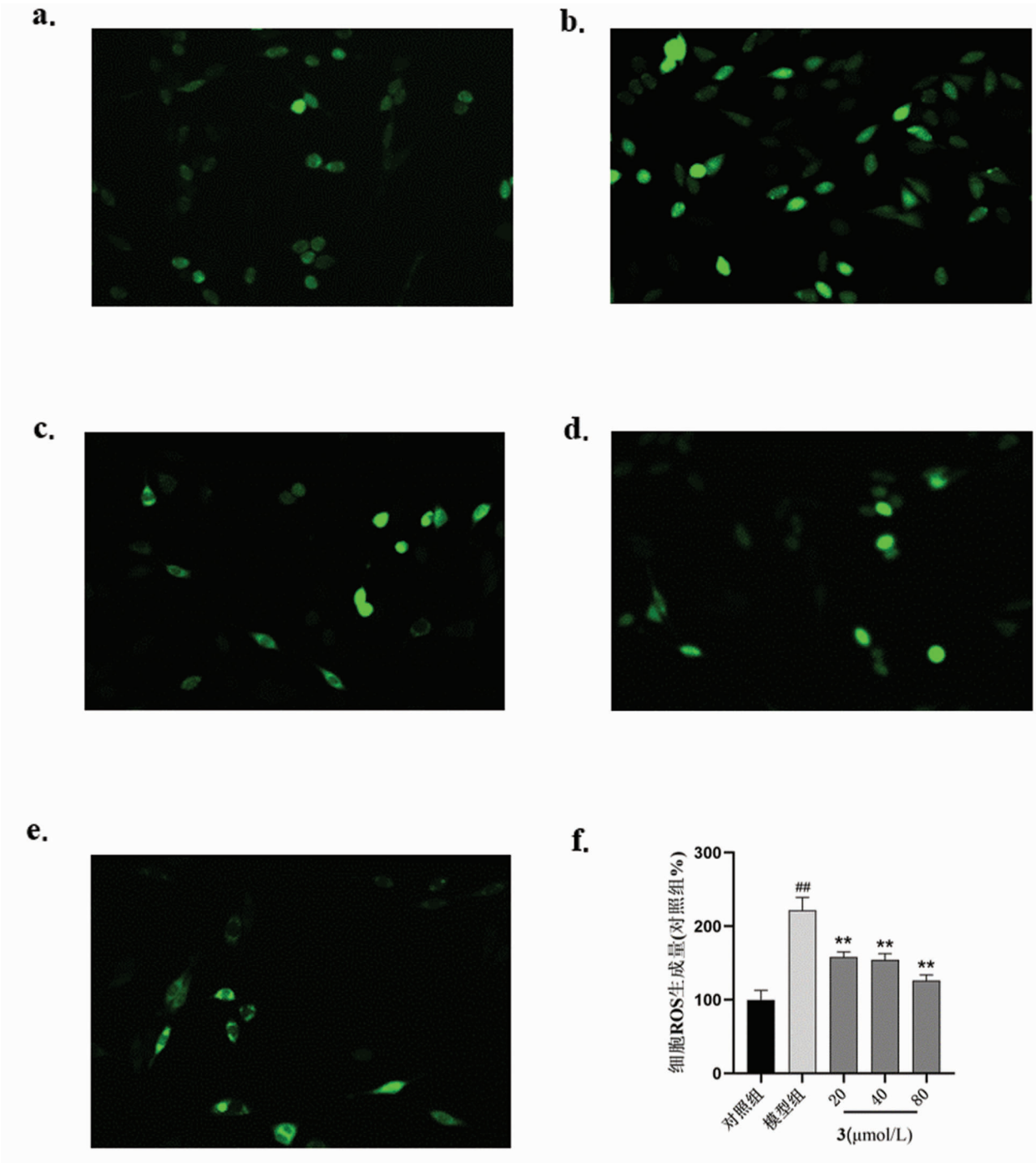
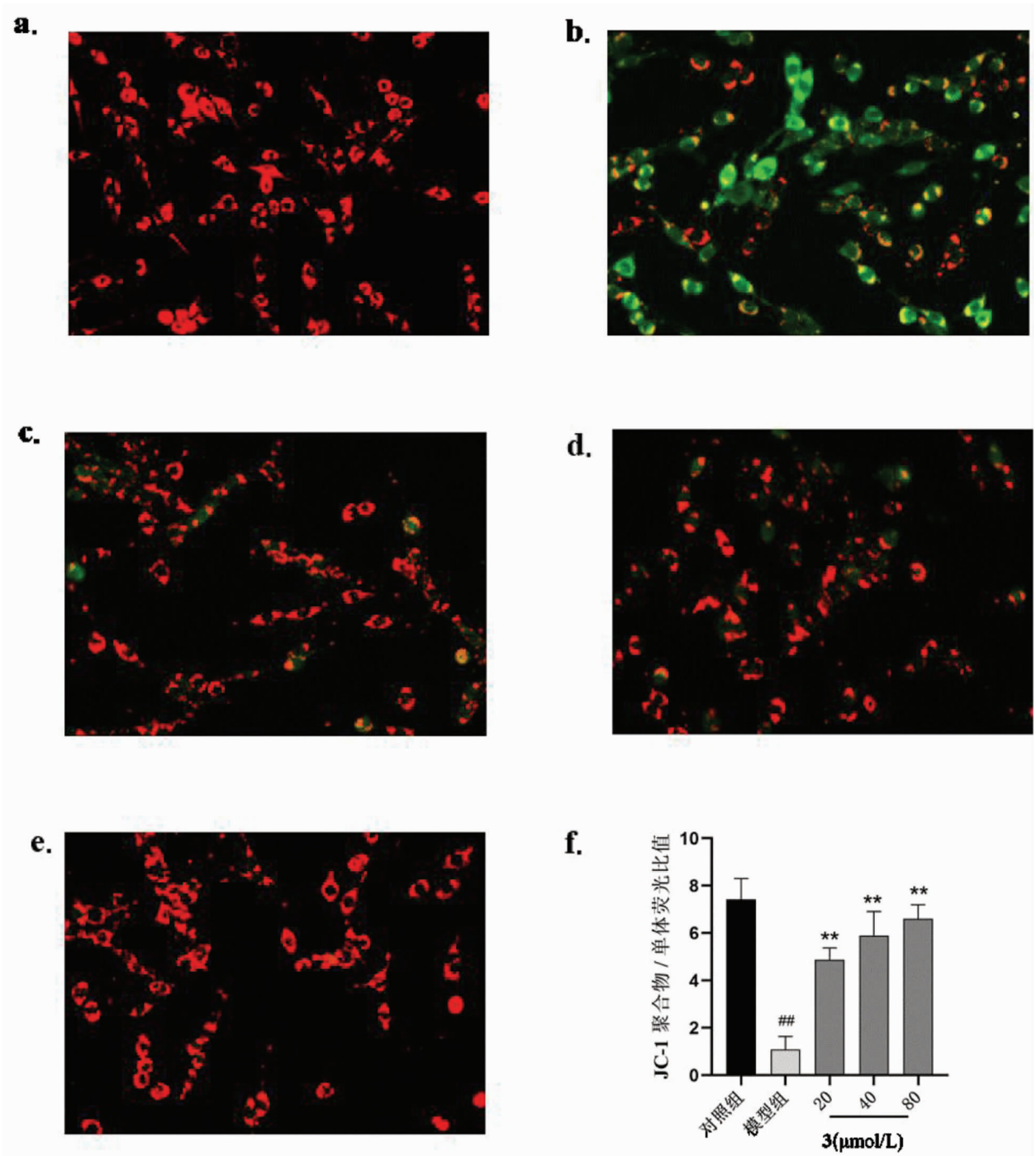


图 4 不同浓度木脂素对缺氧 PC12 细胞的保护率



注：图 a～e 分别为对照组，模型组，20、40、80 μmol/L 的化合物 3 处理缺氧细胞后在荧光显微镜下的情况；图 f 为用 Image J 计算平均荧光强度结果。数值以 mean ± SD 表示。##与对照组比较，$P<0.01$；＊＊与模型组比较，$P<0.01$。

图 6　不同浓度化合物 3 对缺氧细胞 ROS 的影响



注：图 a ~ e 分别为对照组，模型组，20、40、80 μmol/L 的化合物 3 处理后缺氧细胞红绿荧光通道 Merge 结果；图 f 为用 Image J 分别计算红绿荧光强度后比值。数值均以 mean ± SD 表示。##与对照组比较，$P < 0.01$；＊＊与模型组比较，$P < 0.01$。

图 7 不同浓度化合物 3 对细胞 MMP 的影响