



北京中醫藥大學

BEIJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

博士研究生学位论文

THESIS OF DOCTOR'S DEGREE

题目: *****

专 业: *****

研究方向: *****

学位类型: 学术型或专业型

博 士 生: ***

导 师: *** 职称

二〇二*年*月

批注 [Office1]: 严格按照学校规定的论文封皮格式印制, 不允许再加别的内容。

批注 [Office2]: 内容必须正确无误, 学科、专业名称规范, 避免使用不常见的缩略词、缩写字。(“题目”二字之间是否需要空格、与“专业”是否需要对齐等, 有待后续完善, 暂不做规定)。

批注 [Office3]: 论文题目不得超过 30 个字。如果标题要断行, 务必断行不能直接用回车键, 用 shift+回车, 换行不换段, 不然行间距会变成段间距。

批注 [Office4]: 题目、专业、研究方向等项目与“题目”二字左对齐排列。

批注 [Office5]: 使用规范名称。

批注 [Office6]: 使用规范名称。

批注 [Office7]: 论文装订时页边距: 上 3 cm, 下 2 cm, 奇数页: 左 3 cm, 右 2 cm, 偶数页: 左 2 cm, 右 3 cm, 1.5 倍行距, 页眉边距: 2 cm, 页脚边距: 1 cm。左侧装订。(盲审版本建议左右页边距设定为一致, 并删除空白页, 方便专家审阅)。

独 创 性 声 明

批注 [Office8]: 需研究生和导师本人签字。被确定为涉密的论文需在独创性声明及版权授权书中注明。

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得北京中医药大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示了谢意。如有违反学术道德和学术诚信的行为,一切后果及法律责任均由本人承担。

本人保证,在毕业离开北京中医药大学后,发表或使用本学位论文及其相关工作成果时,将以北京中医药大学为第一署名单位,否则愿意按有关法律规定接受处理并承担法律责任。

学位论文作者签名: _____ 签字日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

学位论文版权使用授权书

本人完全了解北京中医药大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人授权北京中医药大学将本人学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,并允许提交杂志社出版。

☐ 公开

☐ 延期网上公开(至_____年_____月_____日)

☐ 保密(至_____年_____月_____日)(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

学位论文作者签名: _____ 导师签名: _____

签字日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日 签字日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

目 录

摘 要 1

ABSTRACT 2

符号说明 3

文献综述 4

前 言 6

第一章 山沉香化学成分的分离与鉴定 8

 第一节 概 述 8

 第二节 新化合物提取分离 10

 第三节 新化合物结构解析 12

 第四节 结构鉴定 14

 第五节 小结与讨论 16

第二章 山沉香体外活性的筛选 17

 第一节 概 述 17

 第二节 实验部分 18

 第三节 研究结果 20

 第四节 小结与讨论 24

结 语 25

参考文献 27

致 谢 28

附 录 29

在学期间主要研究成果 30

批注 [Office9]: 小二宋体加粗；目录内容为小四号宋体字；行间距固定值 20 磅。

批注 [Office10]: 目录各级标题左端对齐，同级缩进。

批注 [Office11]: 目录下为章节标题及其开始页码，一般列至三级标题。

摘 要

木犀科 Oleaceae 丁香属植物羽叶丁香 *Syringa pinnatifolia* Hemsl., 又名贺兰山丁香 *S. pinnatifolia* var. *alashanensis* Y.C. Ma & S.Q. Zhou, 有限集中分布于内蒙古阿拉善与宁夏的贺兰山地区, 其去皮的根、茎及粗枝为一味特色蒙古族药山沉香, 蒙药名“阿拉善·阿嘎如”, 具有抑赫依、清热、止痛、镇静等功效, 主治赫依性心刺痛、赫依性心激荡、血性刺痛、失眠等, 临床上常替代名贵中药沉香单用或配伍入方使用, 治疗心肌缺血、胸闷气短等心肺疾病。

山沉香虽然临床疗效显著, 其药效物质却一直未阐明。课题组此前对山沉香抗心肌缺血作用及活性部位进行了一系列探索, 发现其药效部位主要成分是中小极性的木脂素类与萜类成分。同时依据传统经验, 普遍认为山沉香中紫红色分泌物越多, 其药材质量越好, 但关于紫红色分泌物是何类成分一直没有报道。带着上述问题, 本课题对山沉香进行了化学成分研究, 具体包括以下几部分内容:

.....

(中文摘要需要将研究内容要点简短明了地表达出来, 应包含论文中的基本信息, 体现科研或临床工作的核心思想。论文摘要应包括研究的目的和意义、研究方法、研究成果、结论及意义。注意突出学位论文中具有创新性的成果和新见解的部分)

关键词: 化学成分; 抗心肌缺血; 醌式喹啉生物碱; 醌式木脂素

批注 [Office12]: 中文摘要只写“摘要”二字, 用小二宋体加粗居中打印, 字间隔一个全角空格。

批注 [Office13]: 页眉、页码由摘要起编。

批注 [Office14]: 博士论文摘要 1500-3000 字。

批注 [Office15]: 摘要内容中文采用小四号宋体, 数字和英文采用 Times New Roman 字体, 开头空两格, 标点符号占一格。

批注 [Office16]: 宋体小四号加粗。

批注 [Office17]: 宋体小四号, 3~7 个, 以重要程度或汉语拼音为序, 分号分开, 最后一个关键词后不打标点符号。

ABSTRACT

Syringa pinnatifolia Hemsl. (SP), an endemic Chinese species, is a species in the Oleaceae family and is widely distributed in the Helan Mountains, which are located between Ningxia and Inner Mongolia. Its peeled stems and twigs, known as 'Shan-chen-xiang' in Chinese, are traditionally used as a Mongolian folk medicine to treat cardiovascular symptoms, asthma, pain, and fever.

Although the clinical efficacy of SP is significant, its medicinal substances have not been clarified. Previous pharmacological researches revealed that the EtOH extract of SP, which mainly contain lignans and sesquiterpenoids with moderate to low polarities, showed a cardioprotective effect against acute myocardium ischemia (AMI) in rats and mice. And SP is traditionally used as a powder, while its purple resins in the wood are believed to contribute to its therapeutic effects. Therefore, aiming to determine the constituents of SP with anti-AMI efficacy, a phytochemical investigation using LC-MS, ¹H NMR and colour-guided fractionation of SP stems and evaluation of pharmacological effects against AMI was conducted herein.

.....

KEYWORDS: chemical constituents, anti-myocardium ischemia, quinone-alkaloids, quinone-lignans

批注 [Office18]: Times New Roman 小二加粗。

批注 [Office19]: 内容与中文摘要一致, 语句通顺, 语法正确, 能正确概括文字的内容。

批注 [Office20]: 小四号 Times New Roman 加粗。

批注 [Office21]: 1. Keywords 是一个固有词, 中间没有空格; 2. 关键词小写, 每一关键词之间用半角逗号分开, 最后一个关键词后不打标点符号。

符号说明

缩略词	英文全称	中文全称
¹³ C NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance	核磁共振碳谱
CDCl ₃	Chloroform with one deuterium atom	氘代氯仿
CD	Circular dichroism	圆二色光谱
COSY	Correlation spectroscopy	化学位移相关谱
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethyl sulfoxide with six deuterium atoms	氘代二甲基亚砷
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	异核多量子相关谱
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation	异核单量子相关谱
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
HR-ESI-MS	High resolution electron spray ionization mass spectrometry	高分辨电喷雾电离质谱
IR	Infrared spectrum	红外光谱
MS	Mass spectrometry	质谱
CD ₃ OD	Methanol with four deuterium atoms	氘代甲醇
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy	核增益效应谱
ODS	Octadecane silica	十八烷基硅胶
1D NMR	One dimensional nuclear magnetic resonance	一维核磁共振谱
OD	Optical density	光密度
¹ H NMR	Proton nuclear magnetic resonance	核磁共振氢谱
SOR	Specific optical rotatory	比旋光度
2D NMR	Two dimensional nuclear magnetic resonance	二维核磁共振谱
UV	Ultraviolet spectrum	紫外光谱

批注 [Office22]: 论文中所有符号所表示的意义及单位（或量纲）。

批注 [Office23]: 按照符号英文字母顺序排列。

文献综述

丁香属植物的化学成分和药理活性研究新进展

1 概述

木犀科植物约有 28 个属和 400 余种, 其中的桤属 *Fraxinus*、连翘属 *Forsythia*、素馨属 *Jasminum*、木犀属 *Osmanthus*、丁香属 *Syringa*、木犀榄属 *Olea* 等具有重要的药用、香料、油料及经济价值^[1]。丁香属植物起源于我国西南部, 然后以此为中心主要沿中国西南-西北-华北-东北-朝鲜半岛-日本和中国西南-中亚-欧洲的路径散布^[2]。本属植物多为落叶灌木或小乔木, 自然分布于东亚、中亚和欧洲地区, 亚洲地区种类尤其丰富。不包括杂交种该属植物在世界范围约 20 种, 我国至少有 16 种, 其中特有种 10 种, 主要分布于西南及黄河流域以北各省区^[3]。作为丁香属植物的起源中心和现代分布中心, 我国素有“丁香之国”之称^[4]。

丁香属植物除作为园林观赏植物外, 本属植物在香精、医药原料领域也具有重要价值^[5], 如羽叶丁香 *S. pinnatifolia* 去皮的根、茎及粗枝是蒙古族药山沉香, 蒙医常用其治疗胸闷气短、心肌缺血等心肺疾病^[6]。目前, 丁香属的化学成分主要有木脂素类、环烯醚萜类、倍半萜类、三萜类、苯丙素类、苯乙醇类、黄酮类等化学成分^[7], 其中倍半萜类是该属特征成分, 对植物亲缘关系、系统发育及地理分布等具有参考意义, 如羽叶丁香中含有该属特异的蛇麻烷型倍半萜, 从化学角度提示该物种的独特性^[8]。药理活性涉及心肌保护、神经保护、降血糖、抗菌、抗病毒等方面^[9-11]。

2015 年, 苏国柱等^[12]总结了过去 20 年本属的化学成分与药理活性研究进展, 整理了 142 个包括环烯醚萜类、木脂素类为主的化学成分, 和抗肿瘤、降血压、抗炎、抗氧化和抗真菌活性。随着研究兴趣的增大, 近五年 (2015 年~2019 年) 又报道了新发现的化学成分和药理活性, 因此本文对此归纳总结, 重点介绍化学分类、结构特征与药理活性, 为进一步研究丁香属铺路。

2 化学成分

近五年从本属报道的 181 种化学成分中, 包含 51 个木脂素类 (1-51)、38 个倍半萜类 (52-89)、40 个环烯醚萜类 (90-129)、4 个单萜类似物 (130-133)、11 个三萜类 (134-144) 和 37 个其它类 (145-181)。

批注 [Office24]: 在查阅国内外文献和了解国内外有关科技情况的基础上, 围绕课题涉及的问题, 综述前人工作情况。

批注 [Office25]: 按论文中参考文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编号, 将序号置于方括号角标, 或作为论文的组成部分; 如: “……李××^[1]对此作了研究”。

批注 [Office26]: 正文中文采用小四号宋体, 数字和英文采用 Times New Roman 字体。

2.1 木脂素

此前在西蜀丁香 *S. komarowii*、日本丁香 *S. reticulata*、暴马丁香 *S. reticulata* var. *mandshurica*、羽叶丁香 *S. pinnatifolia*、紫丁香 *S. oblata*、欧丁香 *S. vulgaris*、关东丁香 *S. velutina*、毛丁香 *S. patula*, *S. pubescens* 中报道了 34 个木脂素^[12], 而近五年新增报道的木脂素皆来自于羽叶丁香, 涉及开环木脂素(1–6)、环木脂素(7–20)、木脂内酯(21)、环氧木脂素(22–48)及其他(49–51)类型, 其中 24 和 36 此前于西蜀丁香和暴马丁香中报道, 而新近首次在羽叶丁香中被发现^[13]。化合物 1–51 的结构如图 1 和图 2 所示, 其相关信息如表 1 所示。

上述 51 个化合物中有 18 个新发现的化合物, 其中化合物 1 (*R, E*) 的立体构型由 Shao 等^[14]通过计算旋光值与实测旋光值比较确定, 5–7, 29, 51 的立体构型由 Feng 等^[15], Su 等^[16], Zhang 等^[17]通过比较计算和实测 ECD 分别确定。此外, 化合物 38 和 27 的立体构型由 Su 等^[16, 18]等分别采用计算碳谱结合计算 ECD 和 X-射线单晶衍射法确定。

化合物 2, 5, 6, 7, 10, 11, 29, 38, 50 对脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 RAW 264.7 和神经小胶质细胞 BV-2 NO 的产生具有不同程度的抑制作用, 5, 6 还显示出保护心肌细胞的作用, 51 对 HepG2 肝癌细胞具有一定的细胞毒性, 1, 23–25, 34, 35, 37, 42 等显示较强的抗氧化活性^[14–22]。

.....

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物委员会. 中国植物志(英文版). 第15卷. [M]. 北京: 科学出版社, 1996: 272–319.
- [2] 崔洪霞, 蒋高明, 臧淑英. 丁香属植物的地理分布及其起源演化 [J]. 植物研究, 2004, (2): 141–145.
- [3] 苏国柱, 陈洁, 曹愿, 等. 蒙药山沉香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(22): 4333 – 4338.
- [4] Li J., Zhang R., Wuken S., et al. Phytochemical and chemotaxonomic study of *Syringa pinnatifolia* Hemsl. (Oleaceae) [J]. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2018, 81: 58–61.

批注 [Office27]: 参考文献中每条项目应齐全; 文献中的作者不超过三位时全部列出; 超过三位时一般只列前三位, 后面加“等”字或“et al”; 作者姓名之间用逗号分开; 参考文献中的标点符号全部用半角。

批注 [Office28]: [1]后空一格。

批注 [Office29]: 参考文献应按文中引用顺序列出, 应用原文献语种。

前言

蒙医理论是以阴阳、五元学说为哲学基础,以寒热理论、三根、七素、脏腑理论和六因学说为主要内容的对疾病的诊断、治疗、解释等具有自身特色的一套医学理论体系,其中三根学说是整个理论体系的精髓及特点^[1]。三根学说是指“赫依、协日、巴达干”,是构成人体的主要物质基础,也是人体生命活动的重要能量和动力。三者之间相互依存、相互制约、处于相对平衡状态,但当三根中的任何一方出现偏盛或偏衰的状态,致使平衡失调,引起反常变化,导致各种疾病的发生^[2]。而赫依是三根之首,是生命活动的动力源泉^[1-2]。赫依汉译为“气”,与中医学的气和风有些相似,但其内涵有所不同,它具有轻、糙、动、凉、微、坚六种特性,是人体呼吸运动、血液循环、新陈代谢、机能和心理活动与肢体活动等一切生命运动的一种内在动力^[2-3]。赫依偏盛是心衰竭和神志异常最为核心和最为基本的病理机制,一般会导致心刺痛、腰胯骨节痛、痛无定处、感官迟钝、少眠等症状^[4]。

课题组此前对山沉香总提物(T)进行了抗心肌缺血作用研究,揭示了调控环氧合酶(COX)表达从而改变前列环素(PGI₂)与血栓素A₂(TXA₂)比值的作用机制^[6]。根据蒙医药理论可知,山沉香除了作用于心刺痛外,还具有镇痛、镇静的功效。因此,本课题通过醋酸扭体、福尔马林、热板这三种经典镇痛模型以及自主活动、戊巴比妥协同实验评价T的镇痛与镇静作用,并展开机制探讨,以期如山沉香的临床应用提供充分的科学依据。

在此基础上,为进一步阐释山沉香的药效物质,本课题研究还对山沉香中一个特征性的倍半萜类成分花姜酮进行镇静评价与作用机制研究。花姜酮为首次在非姜科植物中分离得到^[7],已有文献报道其镇痛作用^[8],结合本研究的结果,表明花姜酮为山沉香发挥镇痛、镇静作用的主要药效物质。

本课题的研究思路如图 I 所示。

批注 [Office30]: 小二宋体加粗; 段后“自动”模式(行距设置)。

批注 [Office31]: 用以简要说明研究目的、范围、相关领域前人的工作或研究空白、本研究理论基础、研究方法、预期结果和意义。注意不要与摘要雷同。

批注 [Office32]: 正文中文采用小四号宋体, 数字和英文采用 Times New Roman 字体

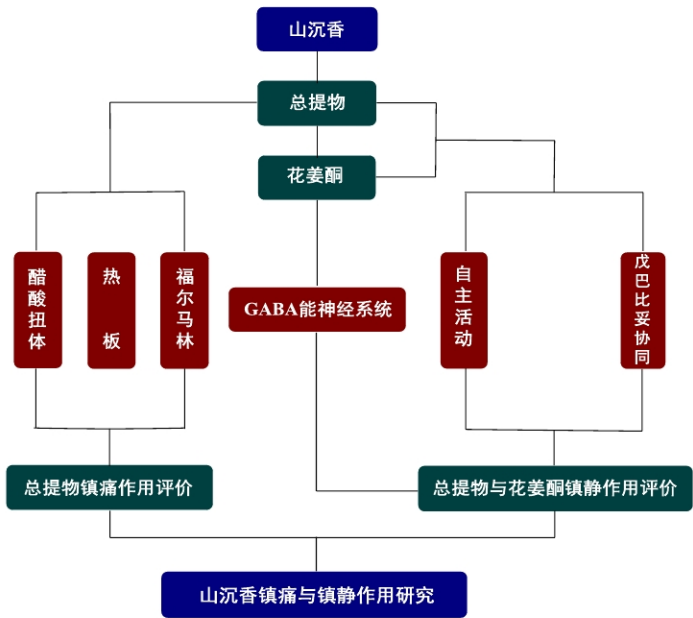


图1 山沉香镇痛与镇静作用研究思路图

批注 [Office33]: 1. 有图必须有图序和图注, 图与图注之间不得跨页; 2. 制图清晰、美观、简洁 (本图需要再优化)。

批注 [Office34]: 示意图应能清楚反映图示内容。

第一章 山沉香化学成分分离与鉴定

第一节 概 述

山沉香为蒙古族特色药材,是木犀科丁香属植物羽叶丁香 *Syringa pinnatifolia* Hemsl. 去皮的根、茎及粗枝,如图 1.1 所示,蒙药名“阿拉善·阿嘎如”,有限集中分布于内蒙古与宁夏的贺兰山地区,临床上多用于治疗冠心病心绞痛等心肺疾病。现代研究表明,山沉香主要含木脂素、倍半萜和挥发油类成分,显示出抗心肌缺血、抗氧化、抗菌等作用^[9]。



图 1.1 羽叶丁香 *S. pinnatifolia* 及药材图

为系统研究山沉香的药效物质,课题组前期研究中将山沉香总提物(T)连续灌胃给药7天后,结扎小鼠左冠状动脉前降支,48 h后对T的药效进行评价,超声结果显示,T能剂量依赖性升高心脏射血分数(EF)和短轴缩短率(FS),降低左室舒张末内径(LVEDd)和左室收缩末内径(LVEDs),降低血清中升高的肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)的水平,减少梗死边缘区炎症细胞的浸润和胶原生成,从而改善心肌缺血小鼠的心功能。作用机制与抑制环氧酶(COX)活性、调节循环和心肌中前列环素(PGL₂)和血栓素A₂(TXA₂)的平衡有关^[6]。为进一步追踪药效物质,课题组在此基础上对总提物进行化学分段,得到占T质量比80%的主部位M和约占20%次要部位N。对M与T药效评价比较结果显示,M具有与T同等的抗心肌缺血作用,并发现M通过作用于心肌组织和H9c2心肌细胞中p53介导的线粒体凋亡通路,包括降低p53蛋白含量,下调Bax/Bcl-2,cleaved Caspase-9/Caspase-9和cleaved Caspase-3/Caspase-3比值,发挥抗心肌缺血作用^[10]。

在化学研究方面,前期已分离得到了木脂素类、倍半萜类、苯乙醇类和苯丙素类成分,其中木脂素和倍半萜既是山沉香的主要化学成分,也是活性贡献所在,为山沉香药

批注 [Office35]: 每章标题(称为一级标题)以小二宋体加粗居中;段后“自动”行距。

批注 [Office36]: “节”(称为二级标题)以四号宋体加粗;段后“自动”行距。

批注 [Office37]: 正文中文采用小四号宋体,数字和英文采用 Times New Roman 字体。

批注 [Office38]: 图居中(注意消除段缩进),图注用五号宋体字置于图下方;采用阿拉伯数字连续编号,如图 1 或图 1.1。

效物质的探索奠定了基础^[11-21]。

然而目前还没有对山沉香抑“赫依”的另外一项主要相关的内容——镇静及止痛方面的系统研究,为此本课题采用醋酸扭体、福尔马林、热板实验^[22-25]作为镇痛药效评价模型,戊巴比妥协同、自主活动实验^[26]作为镇静药效评价模型,评价山沉香的镇痛与镇静作用,并探讨了相关作用机制。

第二节 新化合物提取分离

1 材料

1.1 仪器与设备

UV-2401 PC 紫外-可见分光光度计 (Shimadzu, 日本); Thermo Nicolet Nexus 470 FT-IR 红外光谱仪 (Thermo, 美国); Varian-500 型核磁共振仪 (Varian, 美国); 岛津 LCMS-IT-TOF (Shimadzu, 日本); Rudolph Autopol V 旋光仪 (Rudolph, 美国); Jasco J-810 或 J-815 圆二色光谱仪 (Jasco, 日本); 岛津半制备液相 (LC-20AT 二元泵, SPD-M20A 检测器, Shimadzu, 日本); Waters 制备液相 (Waters 2535 四元泵, Waters 2998 PDA 检测器, Waters, 美国); Waters 制备液相 (Waters 2545 二元泵, Waters 2489 PDA 检测器 Waters, 美国); YMC-PACK Ph ($5\text{ }\mu\text{m}$, $10\times 250\text{ mm}$, YMC, 日本); Shim-Pack PREP-ODS (H) ($5\text{ }\mu\text{m}$, $20\times 250\text{ mm}$, Shimadzu, 日本); Hypersil GOLD C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$, $21.2\times 250\text{ mm}$, Thermo Fisher Scientific, 美国); Daicel 手性色谱柱 (IC 和 OJ, $5\text{ }\mu\text{m}$, $150\times 4.6\text{ mm}$, Daicel, 日本); Agilent Gemini E X-射线单晶衍射仪 (Agilent, 美国); BÜCHI R-210 旋转蒸发仪 (BÜCHI, 瑞士); DZF-6090 真空干燥箱 (上海申贤恒温设备厂); DHG-9070B 电热恒温鼓风干燥箱 (上海申贤恒温设备厂); Alpha 2-4 LDplus 实验室冷冻干燥机 (Christ, 德国); ME204 万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; XS105 十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]。

1.2 试剂与药材

Sephadex LH-20 为瑞典 GE healthcare 产品; Lichroprep RP-18 ($40\text{--}63\text{ }\mu\text{m}$) 及 RP-18 F₂₅₄ 反相硅胶板为德国 Merck 公司产品; 柱色谱硅胶 ($100\text{--}200$ 目和 $200\text{--}300$ 目), 薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ 以及制备薄层色谱硅胶板 GF₂₅₄ ($20\times 20\times 0.04\text{ cm}$) 均为青岛海洋化工厂产品; 香兰素、次硝酸铋为天津市福辰化学试剂厂产品; 提取和分离过程中所用化学试剂均为分析纯, 购于北京化工厂; 制备液相所用的甲醇, 乙腈, 乙醇, 正己烷均为分析纯, 购于西陇科学股份有限公司。

山沉香药材于 2013 年 7 月采自内蒙古自治区阿拉善盟贺兰山地区, 由阿拉善蒙医医院陈苏依勒院长鉴定为木犀科丁香属植物羽叶丁香 *S. pinnatifolia* Hemsl. (又名贺兰山丁香 *S. pinnatifolia* var. *alashanensis* Y.C. Ma & S.Q. Zhou) 去皮的茎木, 阴凉干燥, 药材标本为 SP201307S, 存放于***。

批注 [Office39]: 章、节之间另起一页。

批注 [Office40]: “小节” (称为三级标题), 以小四宋体加粗。

批注 [Office41]: 论文中标题可采用阿拉伯数字连续编号, 如: 1 1.1 1.1.1 1.1.1.1; 也可采用一、 (一) 1. (1) ①。

2 提取分离

山沉香（羽叶丁香干燥的去皮茎木）35.0 kg，粉碎，95%和 80%乙醇依次回流提取（25 L × 1.5 h 每次），合并提取液，减压浓缩，干燥称重约 6.0 kg。取其中的 3230.0 g（SP），反复采用正相硅胶色谱柱，使用石油醚:乙酸乙酯:甲醇系统（10:1:0–5:1:0–1:1:0–1:1:0.2–1:1:1–0:0:1），二氯甲烷:乙酸乙酯:甲醇系统（20:1:0–10:1:0–1:1:0–1:1:0.2–1:1:1–0:0:1），二氯甲烷:甲醇系统（20:1–10:1–5:1–1:1–0:1）洗脱，结合正相薄层色谱，同时使用石油醚:乙酸乙酯系统，二氯甲烷:乙酸乙酯系统，石油醚:丙酮系统分别展开，平行合并各个子流分，减少各子流分之间的交叉，最终得到 26 个流分（SPA–SPZ），流程图如图 1.2 所示。

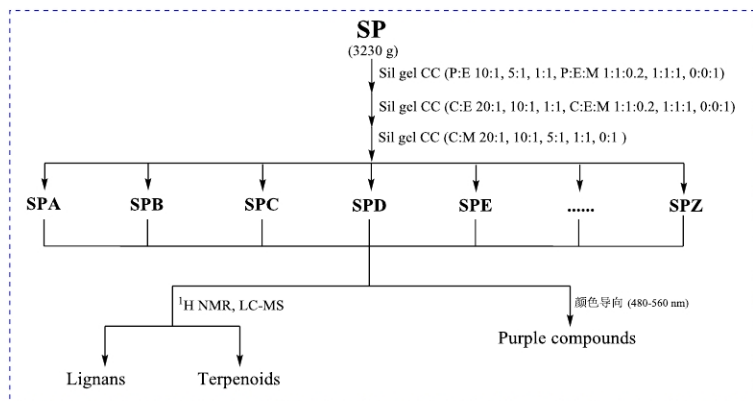


图 1.2 山沉香乙醇提取物的分离流程图

以 ^1H NMR 结合 LC-MS 提供的分子量信息追踪木脂素类和萜类成分，木脂素类在 δ_{H} 6.0–8.0 ppm 有芳氢特征峰信号，在 δ_{H} 3.5–4.2 ppm 有甲氧基信号，如图 1.9 所示；萜类的多个甲基信号 δ_{H} 0.5–2.0 ppm 为判断依据之一，如图 1.10 所示，同时结合木脂素类 m/z 在 330–410 之间，倍半萜类 m/z 在 230–290 之间，选定富含木脂素类与萜类的流分，然后采用多种色谱技术对其进行分离鉴定。

o o o o o

批注 [Office42]: 绘图必须工整、清晰、规范。

批注 [Office43]: 图表为形式审查要点。

第三节 新化合物结构解析

1 木脂素类成分

化合物 **1** 淡黄色油状物; HR-ESI-MS 给出准分子离子峰 $[M - H]^-$ 339.1224 (计算值 339.1238), 结合 ^{13}C NMR 数据确定其分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$, 不饱和度为 11。 ^1H NMR 显示分子中有两组 1,3,4,6-四取代苯环 $[\delta_{\text{H}}$ 6.59 (1H, s, H-2), 6.55 (1H, s, H-5)]和 $[\delta_{\text{H}}$ 6.56 (1H, s, H-2'), 6.76 (1H, s, H-5')], 一个亚甲基 $[\delta_{\text{H}}$ 2.91 (1H, q, $J = 10, 17.5$ Hz, H-7'a), 2.34 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-7'b)], 一个连氧亚甲基 $[\delta_{\text{H}}$ 4.06 (1H, q, $J = 6.0, 8.5$ Hz, H-9a), 3.70 (1H, overlapped, H-9b)], 三个次甲基 $[\delta_{\text{H}}$ 3.68 (1H, overlapped, H-7), 2.38 (1H, m, H-8), 2.60 (1H, m, H-8')], 一个连氧次甲基 $[\delta_{\text{H}}$ 4.58 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-9')], 两个甲氧基 $[\delta_{\text{H}}$ 3.68 (3H, s, OMe-3), 3.72 (3H, s, OMe-3')]。

^{13}C NMR 结合 HSQC 图谱显示分子中含有 20 个碳原子, 包括 12 个芳香碳 $[\delta_{\text{C}}$ 129.3 (C-1), 113.6 (C-2), 149.3 (C-3), 145.9 (C-4), 116.2 (C-5), 128.8 (C-6), 128.0 (C-1'), 113.3 (C-2'), 147.6 (C-3'), 145.4 (C-4'), 113.9 (C-5'), 136.9 (C-6')], 1 个亚甲基 $[\delta_{\text{C}}$ 26.3 (C-7')], 1 个连氧亚甲基 $[\delta_{\text{C}}$ 71.3 (C-9)], 3 个次甲基 $[\delta_{\text{C}}$ 47.9 (C-7), 41.2 (C-8), 38.6 (C-8')], 1 个连氧次甲基 $[\delta_{\text{C}}$ 81.9 (C-9')], 2 个甲氧基 $[\delta_{\text{C}}$ 56.3 (3-OMe), 56.6 (3'-OMe)]。以上信息推测 **1** 为一个木脂素类成分。

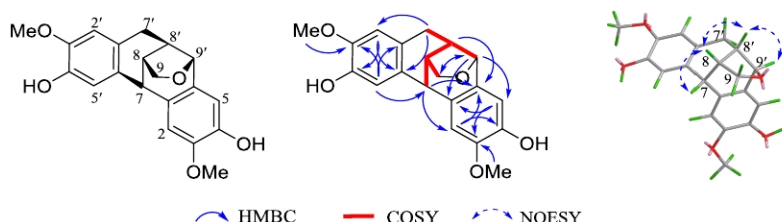


图 1.3 化合物 **1** 的结构和关键 HMBC、COSY 及 NOESY 相关

COSY 图谱显示, H-8 与 H-7 和 H-9a/9b 耦合, H-8' 与 H-7'a/7'b 和 H-9' 耦合, 此外 H-8 与 H-8' 也是一组耦合系统, 进而确定了 **1** 的 C_3 片段通过 C-8, C-8' 相连。HMBC 图谱显示, H-7 与 C-2, C-6 和 C-6' 相关, H-5' 与 C-7 相关, 提示 C-7 与 C-1, C-6' 连接; H-7' 与 C-2', C-6' 相关, H-8' 与 C-6, H-9' 与 C-1, C-5 相关, 说明 C-7' 与 C-1' 连接, C-9' 与 C-6 连接; H-9 与 C-9' 相关, H-9' 与 C-9 相关结合不饱和度分析, 结构中存在一个五元氧环。此外, HMBC 图谱中还观察到两个甲氧基分别于 C-3 和 C-3' 相关。综合以上分析确

定了 1 的平面结构。

按照公式 (1) 计算.....

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \tag{1}$$

批注 [Office44]: 公式书写应在文中另起一行；公式后应注明序号。

.....

第四节 结构鉴定

1 木脂素类成分

化合物 **1** 淡黄色油状; $[\alpha]_D^{25} +20$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS m/z : 339.1224 ($[M-H]^-$, 计算值 339.1238, $C_{20}H_{20}O_5$)。 1H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 6.59 (1H, s, H-2), 6.55 (1H, s, H-5), 3.68 (1H, overlapped, H-7), 2.38 (1H, m, H-8), 4.06 (1H, q, $J = 6.0, 8.5$ Hz, H-9a), 3.70 (1H, overlapped, H-9b), 6.56 (1H, br s, H-2'), 6.76 (1H, br s, H-5'), 2.91 (1H, q, $J = 10.0, 17.5$ Hz, H-7'a), 2.34 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-7'b), 2.60 (1H, m, H-8'), 4.58 (1H, d, $J = 5$ Hz, H-9'), 3.68 (3H, s, OMe-3), 3.72 (3H, s, OMe-3')。 ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ_C 129.3 (C-1), 113.6 (C-2), 149.3 (C-3), 145.9 (C-4), 116.2 (C-5), 128.8 (C-6), 47.9 (C-7), 41.2 (C-8), 71.3 (C-9), 128.0 (C-1'), 113.3 (C-2'), 147.6 (C-3'), 145.4 (C-4'), 113.9 (C-5'), 136.9 (C-6'), 26.3 (C-7'), 38.6 (C-8'), 81.9 (C-9'), 56.3 (3-OMe), 56.6 (3'-OMe); 命名为阿拉善醇 K (alashinol K)。

表 1.1 化合物 **8-15** 的 ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)数据 δ (ppm)

No.	8^a	8	9	10	11	12	13	14	15
C-1	131.7	133.0	132.9	132.0	131.7	133.2	133.1	132.0	131.7
C-2	112.7	111.5	111.5	111.4	111.3	111.5	111.5	111.4	111.3
C-3	147.4	146.5	146.6	146.7	146.6	146.5	146.6	146.6	146.6
C-4	144.5	143.9	143.8	144.1	144.0	143.9	143.8	144.0	144.0
C-5	115.3	114.4	114.4	114.5	114.2	114.4	114.4	114.4	114.2
C-6	120.6	121.5	121.4	121.6	121.6	121.6	121.5	121.5	121.7
C-7	30.0	30.8	33.5	31.8	38.8	30.9	33.6	31.8	38.6
C-8	48.1	48.9	52.2	49.3	52.4	48.9	52.2	49.2	52.2
C-9	105.1	105.7	105.6	108.7	110.1	104.1	104.3	107.4	108.8
C-1'	132.2	133.5	132.1	132.5	132.5	133.6	132.3	132.5	132.6
C-2'	112.5	111.5	111.2	111.2	111.3	111.6	111.2	111.2	111.1
C-3'	147.5	146.6	146.4	146.7	146.5	146.5	146.4	146.6	146.5
C-4'	144.5	143.9	144.0	144.1	143.9	143.9	144.0	144.0	143.8
C-5'	115.3	114.4	114.3	114.5	114.2	114.4	114.3	114.4	114.1

^a测试溶剂为 $DMSO-d_6$ 。

批注 [Office45]: 表头用五号宋体置于表的上方; 图表可采用阿拉伯数字连续编号, 如: 1 1.1 1.1.1 1.1.1.1; 表 1; 也可采用一、 (一) 1. (1) ①。

批注 [Office46]: 文中所用表格一律采用三线格式, 其中上 线和底线宽度为 1 磅, 中间线宽度为 0.5 磅。

批注 [Office47]: 表内必须按规定的符号标注单位。

批注 [Office48]: 表格不要跨页。

批注 [Office49]: 表中内容及表后注一般用 5 号宋体

批注 [Office50]: 表内不能用“同上”、“同左”、“ ” 等代替, 应一律填入具体数字或文字

批注 [Office51]: 对齐表格线前沿。

化合物 **13** 淡黄色油状; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +30$ (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS m/z : 387.1801 ($[M - H]^-$, 计算值 387.1813, $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 6.69 (1H, br s, H-2), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.66 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 2.76 (1H, m, overlapped, H-7a), 2.56 (1H, dd, $J = 4.5, 14.0$ Hz, H-7b), 2.02 (1H, m, H-8), 4.79 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-9), 6.63 (1H, br s, H-2'), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 2.76 (1H, m, overlapped, H-7'a), 2.47 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-7'b), 2.43 (1H, m, H-8'), 4.02 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-9'a), 3.61 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-9'b), 3.87 (3H, s, OMe-3), 3.86 (3H, s, OMe-3'), 3.73 (1H, m, H-1''a), 3.37 (1H, m, H-1''b), 1.22 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2''). ^{13}C NMR 数据见表 1.5, 鉴定为 $(8\alpha, 9\alpha, 8'\beta)$ -4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-9-ethoxy-9,9'-epoxylignan, 命名为阿拉善醇 U (alashinol U)。

第五节 小结与讨论

在课题组已有的基础上, 本研究通过 LC-MS 结合 ^1H NMR 导向法和颜色导向法对山沉香乙醇提取物中的木脂素类成分、紫红色成分和萜类成分进行了系统的研究, 采用硅胶、Sephadex LH-20、ODS 柱色谱以及制备液相系统进行分离, 通过 UV、IR、NMR、HR-ESI-MS、CD、单晶衍射等波谱技术, 结合文献理化常数比较等方法进行结构鉴定, 从山沉香中分离鉴定了 72 个化合物, 包括 34 个木脂素类成分, 5 个紫红色成分, 30 个萜类成分和 3 个其他类成分。其中 50 个为新化合物, 10 个为在本属首次发现, 4 种结构新颖的骨架类型首次从羽叶丁香中报道。

木脂素作为山沉香的主要成分, 是山沉香药效物质重要的组成部分, 因此为阐明山沉香抗心肌缺血的药效物质基础, 有必要对其中的木脂素类成分进行系统的研究。本研究采用 LC-MS 结合 ^1H NMR 导向法从山沉香中分离鉴定了 34 个木脂素类化合物 (1–34), 其中新化合物 19 个 (1–8, 10, 12–14, 16–21, 32), 依次命名为阿拉善醇 K–ZC (alashinol K–ZC), 5 个首次从丁香属中发现 (15, 23, 25, 28, 30), 新化合物结构中多含有 9-*O*-9'型五元氧环结构。木脂素一般由两个 C6-C3 片段组合而成, 但因不同的连接位点和不同的氧化程度造成了其结构类型的差异。木脂素通常含有多个手性碳原子, 然而由于其柔性骨架不容易结晶并且质子信号重叠严重, 因此确定其立体构型具有一定的挑战。山沉香中的木脂素常借助于 NOESY、X-ray 单晶衍射、计算 ECD 或与文献比较等方法确定其立体构型。部分单环氧木脂素 (如化合物 8–20) 具有类似的平面结构, 但由于相对构型不同, 其 C-7/7', C-8/8', C-9/9'位的化学位移各不相同, 这提示部分单环氧木脂素的立体构型或许可以通过计算 NMR 的方法来确定。

第二章 山沉香体外活性的筛选

第一节 概 述

本课题同期开展的研究显示,山沉香乙醇总提物(T),主要部位(M),中小极性流分(I)的体内外药效评价发现其均有显著的抗心肌缺血作用,详见同课题组***同学的硕士毕业论文《***》,此外山沉香乙醇总提物(T)、主要的倍半萜类成分花姜酮的体内外药效评价显示其具有明确的镇痛镇静作用,详见同课题组***同学的硕士毕业论文《***》。

根据山沉香传统的抗心肌缺血与镇痛镇静药理作用,结合本实验室条件,选用 H9c2 心肌细胞缺氧损伤模型对山沉香的粗流分及分离得到的单体化合物进行体外活性筛选,同时选用 RAW264.7 细胞和 BV-2 细胞炎症模型进行体外抗炎活性筛选。此外,由于山沉香中部分流分和化合物的细胞毒性较大,因此对山沉香中的化学成分进行了抑制 HepG2 肝癌细胞、MCF-7 乳腺癌细胞、PC-3M-IE8 高转移前列腺癌细胞增殖活性的筛选,以期能够为阐明山沉香的药效物质提供依据,或筛选得到一些活性化合物。

第二节 实验部分

1 材料

1.1 实验细胞

H9c2 大鼠心肌细胞、RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞、HepG2 肝癌细胞、PC-3M-IE8 高转移前列腺癌细胞均购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院细胞资源中心, 人乳腺癌细胞 MCF-7 购自南京凯基生物技术有限公司, BV-2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 仪器

SX-500 高压蒸汽灭菌器, 日本 TOMY 公司; MCO-18AIC 二氧化碳培养箱, 日本 SANYO 公司; OptiMair 超净工作台, 新加坡 ESCO 公司; AE 2000 显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; 多功能酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司; 血球计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司; ME204 万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 试剂

MTT、CCK8, 北京拜尔迪生物技术有限公司; DMSO, 美国 Sigma 公司; DMEM、胎牛血清、0.25%胰酶、PBS, 美国 Corning 公司; 脂多糖, 美国 Sigma 公司; NO 试剂盒, 北京普利莱基因技术有限公司; Mouse TNF- α ELISA Kit (EK0527)、Mouse IL-6 ELISA Kit (EK0411)、Mouse IL-1 β ELISA Kit (EK0394), 武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 H9c2 心肌细胞缺氧损伤模型

H9c2 心肌细胞生长到 90% 时, 用 0.25% 胰酶消化之后, 用培养液稀释并计数, 以 1×10^4 个/100 μ L/孔接种到 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h, 弃去培养基, 每孔加入 200 μ L PBS 并弃去。然后给药组加入含药的无血清培养基 100 μ L; 模型组空白对照孔, 每孔加入无血清培养基 100 μ L; 正常组加入完全培养基(90% DMEM + 10% FBS) 100 μ L。模型组与给药组置入含 95% N₂, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 的恒温三气培养箱中培养 20 h, 正常组置入含 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养 20 h, 然后三组弃去培养基, 每孔加入 200 μ L PBS 并弃去, 每孔加入含有 10% CCK8 的无血清培养基 100 μ L, 置入含 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中孵育, 2 h 后于 450 nm 处测定 OD 值。

2.2 LPS 刺激 RAW264.7 细胞炎症模型

批注 [Office52]: 注意是 μ , 不是 u

批注 [Office53]: 数字和单位之间空一格

RAW264.7 细胞生长到 90% 时, 用 0.25% 胰酶消化之后, 用培养液稀释并计数, 以 1×10^5 个/100 μL /孔接种到 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的恒温培养箱中培养 24 h, 给药组每孔加入含药的完全培养基 50 μL , 设置空白组和模型组, 每孔加入空白培养基 50 μL , 每组 3 个复孔。1 h 后, 给药组和模型组加入 50 μL 4 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 LPS, 空白组加入等体积的空白培养基, 24 h 后取上清并按照 Griess 法测定细胞上清的 NO 浓度: 取 50 μL 的上清加入 96 孔板中, 每孔加 50 μL 的 Griess R1, 室温避光放置 5 min, 然后再加 50 μL 的 Griess R2, 室温避光放置 5 min, 酶标仪测定 540 nm 处的 OD 值, 空白组 OD 值校正。根据标准曲线计算给药组 NO 浓度, 计算抑制率 (抑制率 (%) = (模型组 NO 浓度 - 给药组 NO 浓度) / 模型组 NO 浓度 $\times$ 100%)。

批注 [Office54]: () 为全角格式

2.2 抗肿瘤药物活性筛选

HepG2 肝癌细胞、MCF-7 乳腺癌细胞、PC-3M-IE8 高转移前列腺癌细胞生长到 90% 时, 用 0.25% 胰酶消化之后, 用培养液稀释并计数, 以 5×10^4 个/100 μL /孔接种到 96 孔板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的恒温培养箱中培养 24 h, 弃去培养液, 加 100 μL 药液 (给药组每孔加入 100 μL 药液, 每个浓度 4-5 个平行孔; 对照孔加 100 μL 完全培养基, 置培养箱中和细胞共同孵育)。48 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μL , 置培养箱中孵育 4 h 后, 甩板, 将 96 孔板倒扣于滤纸上充分吸干残留液体, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 于振荡器上振荡 10 min 以溶解蓝紫色结晶物。96 孔板最外圈只加 100 μL 的 PBS。使用全波长扫描酶标仪在 570 nm 处测定各孔的 OD 值, 计算抑制率 (抑制率 (%) = $1 - \text{加药孔的吸光度值} / \text{对照孔的吸光度值}$)。

2.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均值比较采用 ANOVA 方差分析, 组间两两比较采用双侧 Student T-test, 以 $P < 0.05$ 表示统计学意义。

批注 [Office55]: “±” 前后空一格

批注 [Office56]: 统计学中的 P 值为斜体

第三节 研究结果

1 药物对缺氧损伤的心肌细胞保护作用

山沉香中各流分（SPA–SPZ）进行对缺氧损伤的心肌细胞保护作用活性筛选，结果显示，流分 **SPR** 和 **SPS** 在 2.5 μg/mL 浓度下，流分 **SPG** 和 **SPK** 在 5.0 μg/mL 浓度下，流分 **SPI**，**SPJ**，**SPN** 和 **SPQ** 在 10.0 μg/mL 浓度下对缺氧损伤的 H9c2 心肌细胞具有保护作用，如图 2.1–2.3 和表 2.1 所示。

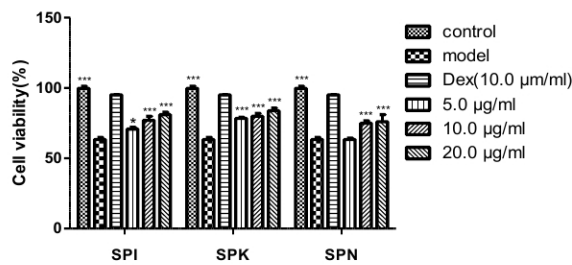


图 2.1 流分 **SPI**，**SPK**，**SPN** 对氧化损伤的心肌细胞的保护作用
(与模型组对比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

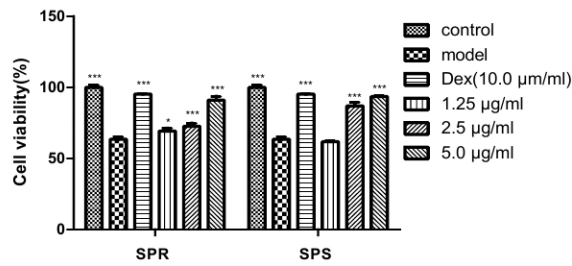


图 2.2 流分 **SPR**，**SPS** 对氧化损伤的心肌细胞的保护作用
(与模型组对比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

表 2.1 对氧化损伤的心肌细胞的保护作用

流分	1.25 μg/mL	2.5 μg/mL	5.0 μg/mL	10.0 μg/mL	20.0 μg/mL
SPR	69.22	72...54	90.94	-	-
SPS	61.63	86.77	93.44	-	-

批注 [Office57]: 图表为形式审查重点。

批注 [Office58]: “<” 前后空一格。

批注 [Office59]: 统计学中的 P 值为斜体。

(续)

批注 [Office60]: 建议若是必须跨页的表格，可以续表的方式，保证表格的完整性，否则**强烈不建议表格跨页**。

2 GABA_A受体拮抗剂荷包牡丹碱对花姜酮镇静作用的影响

花姜酮与荷包牡丹碱联合应用实验中,与空白组比较,花姜酮可显著缩短小鼠睡眠潜伏期 ($P<0.05$),延长睡眠维持时间 ($P<0.001$);荷包牡丹碱组对小鼠的睡眠潜伏期和睡眠维持时间没有影响;在荷包牡丹碱和花姜酮联合应用后,与花姜酮组比较,该组逆转了小鼠的睡眠维持时间 ($P<0.05$),表现出拮抗作用。结果如表 2.2,图 2.3。

表 2.2 GABA_A受体拮抗剂荷包牡丹碱对花姜酮镇静作用的影响 ($n=6$)

分组	剂量 (mg/kg)	睡眠潜伏期	睡眠维持时间
Model	-	3.97 ± 0.60	38.89 ± 9.40
ZER	20	2.92 ± 0.58*	65.56 ± 7.94***
Bic	2.5	4.45 ± 0.79	50.00 ± 6.06
Bic + ZER	20 + 2.5	3.71 ± 0.62	55.33 ± 6.56***. #

与模型组 (Model) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与花姜酮组 (ZER) 比较, # $P<0.05$,
*** $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

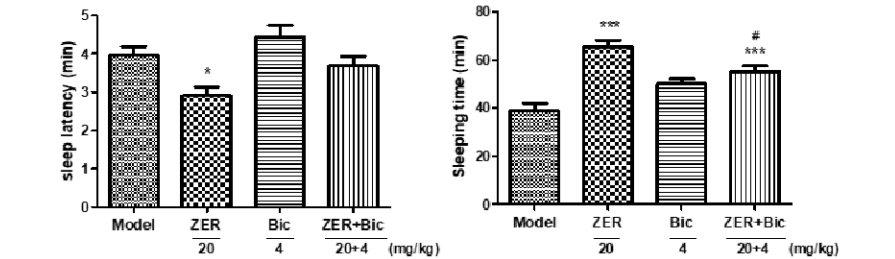


图 2.3 GABA_A受体拮抗剂氟马西尼对花姜酮镇静作用的影响

与模型组 (Model) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与花姜酮组 (ZER) 比较, # $P<0.05$,
*** $P<0.01$, ### $P<0.001$ 。

3 心肌组织病理检测

于 400 倍光学显微镜下观察心肌组织 HE 染色切片,可观察到假手术组心肌细胞完整,心肌细胞横纹清晰,少有炎细胞浸润;而模型组心肌细胞明显可见排列紊乱,心肌间质出现大量的炎细胞浸润,部分心肌细胞变性;与模型组相比,流分 I 给药组、M 部位组及福辛普利组心肌细胞排列紊乱程度减轻,丧失正常结构细胞减少,仍可见部分心肌细胞变性,而流分 M₃无明显改善作用,如图 2.4 所示。

批注 [Office61]: n 作为统计量名称时应为小写斜体。
表注左对齐,图注居中 (见图 2.3)。

批注 [Office62]: 实验结果曲线图、柱状图等应制成方框图,坐标及单位清晰

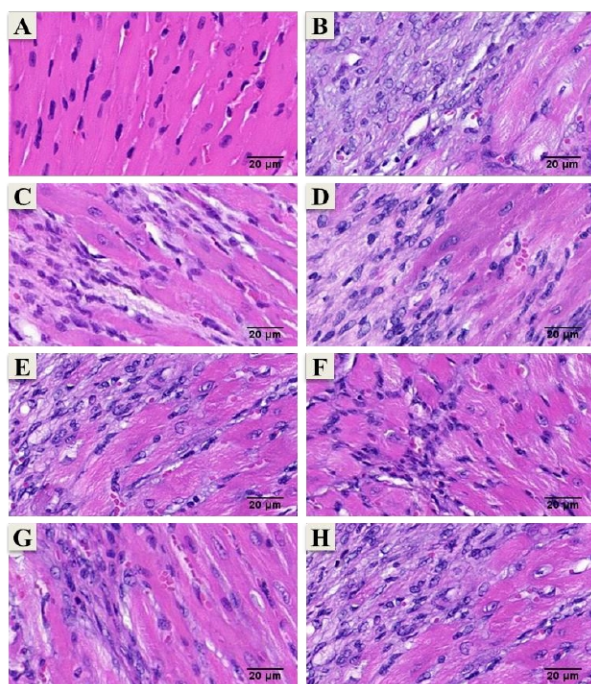


图 2.4 山沉香各流分对小鼠心肌组织 HE 染色的影响 (× 400)

A: 假手术组; B: 模型组; C: 福辛普利组; D: **I** 低剂量组 (12 mg/kg); E: **I** 中剂量组 (24 mg/kg); F: **I** 高剂量组 (47 mg/kg); G: **M** 部位组 (65 mg/kg); H: **M₃** 流分组 (18 mg/kg)

批注 [Office63]: 照片应在右下角给出放大标尺

第四节 小结与讨论

根据山沉香的传统药效应用, 结合课题组对于山沉香进行的抗心肌缺血药效评价, 选用 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型对山沉香各流分及单体化合物进行活性筛选; 由于山沉香抗心肌缺血的作用机制与抑制炎症反应相关, 采用 RAW264.7 细胞炎症模型对山沉香各流分及单体化合物进行活性筛选; 此外, 结合实验室的条件, 对部分化合物进行了肿瘤细胞模型的筛选。

体外活性筛选结果显示, 山沉香中流分 **SPR** 和 **SPS** 在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 流分 **SPG** 和 **SPK** 在 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 流分 **SPI**, **SPJ**, **SPN** 和 **SPQ** 在 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对缺氧损伤的 H9c2 心肌细胞有保护作用; 流分 **SPG**, **SPI**, **SPJ**, **SPK**, **SPL**, **SPN** 和 **SPO** 在 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 流分 **SPU** 和 **SPW** 在 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 的产生具有一定的抑制作用。由于山沉香互不交叉的流分较多, 粗流分的活性筛选结果为流分分离的优先性提供了一定的导向, 即分离有活性的流分更有助于追踪到活性较好的化合物, 为阐明山沉香的药效物质提供可靠的依据。但是由于受各种因素的影响, 目前分离得到的单体化合物未来及进一步筛选其活性。

此外抑制肿瘤细胞增殖活性显示, 化合物 **39** 对 MCF-7 乳腺癌细胞、HepG2 肝癌细胞、PC-3M-IE8 高转移前列腺癌细胞的 IC_{50} 值分别为 10.32, 12.11 和 18.17 μM , 说明山沉香中具有新骨架的酞式喹啉生物碱类化合物具有明显的抗肿瘤细胞增殖的活性。

总的来说, 山沉香乙醇提取物具有确切的抗心肌缺血作用, 且抗心肌缺血作用与其中的木脂素类与萜类成分相关。山沉香的药效物质有待借助于单体化合物的药效来阐明, 根据各切割流分与单体化合物现有的活性数据来看, 不排除山沉香中木脂素类与萜类成分协同联合发挥药效的可能性。

结 语

批注 [Office64]: 系论文最终和总体的结论, 重点阐述本研究在本领域中的地位、作用或创新性, 如果不可能得出预期结论, 则进行必要讨论。

本论文作为系统研究山沉香抗心肌缺血药效物质的一部分, 对山沉香中木脂素类与萜类成分进行了分离及结构鉴定, 同时建立了紫红色成分的追踪分离方法, 并对各段流分及部分单体化合物进行了心肌保护作用、抗炎活性及抑制肿瘤细胞增殖活性等体外活性筛选。本研究内容总结如下:

一、归纳总结了近五年丁香属植物中新报道的化学成分、来源植物及其药理活性。在 2015 年丁香属综述的基础上, 近五年又从该属中新增报道了 180 余个化合物, 其中以木脂素类、倍半萜类和环烯醚萜类化合物报道较多, 新增报道的化合物大都来源于羽叶丁香, 而丁香属内其他植物研究报道相对较少。药理活性研究主要集中在抗心肌缺血、抗肿瘤、抗炎、抗菌、镇痛等方面。山沉香为丁香属内羽叶丁香去皮的根、茎及粗枝, 近五年关于其倍半萜类成分和抗心肌缺血方面的研究尤其深入。倍半萜类成分由于在丁香属其他植物中没有发现, 因此可作为羽叶丁香的特征性成分, 为羽叶丁香在丁香属中的植物学分类提供了重要依据。山沉香抗心肌缺血作用的药效物质由山沉香乙醇总提物 (**T**) 缩小到 HP-20 大孔树脂 30–95%乙醇洗脱得到的主要部位 (**M**), 又通过硅胶柱色谱进一步锁定为中小极性流分 (**I**), 同时采用 LC-MS 结合 ^1H NMR 技术对总提物 **T**、主部位 **M** 和中小极性流分 **I** 进行化学表征, 提示山沉香的药效物质与中小极性的木脂素类与萜类成分相关。本文为山沉香的药用植物和同属其他药用植物的相关研究和应用提供了有益的参考。

二、通过 LC-MS 结合 ^1H NMR 导向法和颜色导向法, 以多种色谱技术和波谱学鉴定技术, 从山沉香中分离鉴定了 72 个化合物, 其中 50 个为新化合物, 4 种结构新颖的骨架, 10 个为属首分。其中包括 34 个木脂素类成分 (**1–34**), 5 个紫红色成分 (**35–39**), 25 个倍半萜类成分 (**40–60**), 包含 4 对对映异构体 (**40a/b**, **41a/b**, **42a/b**, **46a/b**), 5 个艾里莫芬烷二聚体 (**61–65**) 和 3 个其他类成分 (**66–68**)。

木脂素类成分作为山沉香的首要成分, 其报道数量较多, 质量占比较大, 因此木脂素类成分对于阐明山沉香的药效物质必不可少。木脂素由两个 C6-C3 片段组合而成, 因其不同的连接位点和不同的氧化程度造成了其结构类型的差异, 本论文新分离得到的木脂素类成分多为 9-O-9'单环氧木脂素, 部分木脂素结构类型较为特殊, 如相比较常见的木脂素类型, 阿拉善醇 K (alashinol K, **1**) 结构中出现少见的 C-7'与 C-1 相连, 阿拉善醇 M (alashinol M, **3**) 的结构中缺少一个 C-9 位的碳, 阿拉善醇 O (alashinol O, **5**) 的

C-5 位上多一个羰基取代, 阿拉善醇 W 和 X (alashinols W and X, **16–17**) 的结构中其中一个苯环上含有两个甲氧基等。木脂素通常含有多个手性碳原子, 然而由于其柔性骨架不容易结晶且部分关键质子信号重叠严重, 使确定立体构型的难度进一步加大。此外, 部分木脂素如单环异落叶松脂素 (**24**) 在山沉香中含量极大, 除本次析出白色结晶 30 g 外, 还有大量的白色块状结晶在流分 SPS 中析出, 且有文献报道其具有心肌细胞保护作用, 这为山沉香抗心肌缺血药效物质的阐明提供了一定的依据。

紫红色分泌物作为山沉香的特色成分, 传统经验认为其含量越多, 山沉香药材质量和临床疗效越好。但是长期以来, 关于紫红色分泌物的研究少之又少, 即不了解紫红色分泌物的结构, 更不了解其药理作用。本研究首次从山沉香中分离鉴定出 5 个紫红色化合物, 其结构类型有高度氧化共轭的木脂素类 (**35**), 高度共轭的醌式木脂素类 (**36, 37**) 及醌式喹啉生物碱类 (**38, 39**)。紫红色化合物的结构中都有类对苯醌样结构, 因其与结构中其他片段高度共轭, 使吸收波长红移到可见光区, 吸收了紫红光的互补光, 即黄绿光, 因而使化合物呈现紫红色。依据此原理, 本研究采用化合物在黄绿光 (480–560 nm) 波段有吸收, 结合 HPLC 技术建立了追踪山沉香紫红色分泌物的方法, 该方法的建立有希望能追踪到山沉香中所有紫红色化合物, 为传统经验判断山沉香质量的优劣提供充足的依据。醌式木脂素类和醌式喹啉生物碱类为新发现的两类结构骨架, 其生物合成途径还有待进一步研究。其中醌式木脂素的骨架形成可能是由 4-苯基木脂素类与对苯醌类化合物耦合而成, 从山沉香中分离鉴定出的大量木脂素类成分及 2,5-二甲氧基对苯醌 (**68**) 在一定程度上证实了该推测。而关于醌式喹啉生物碱的生源途径目前还无法推测。

.....

参考文献

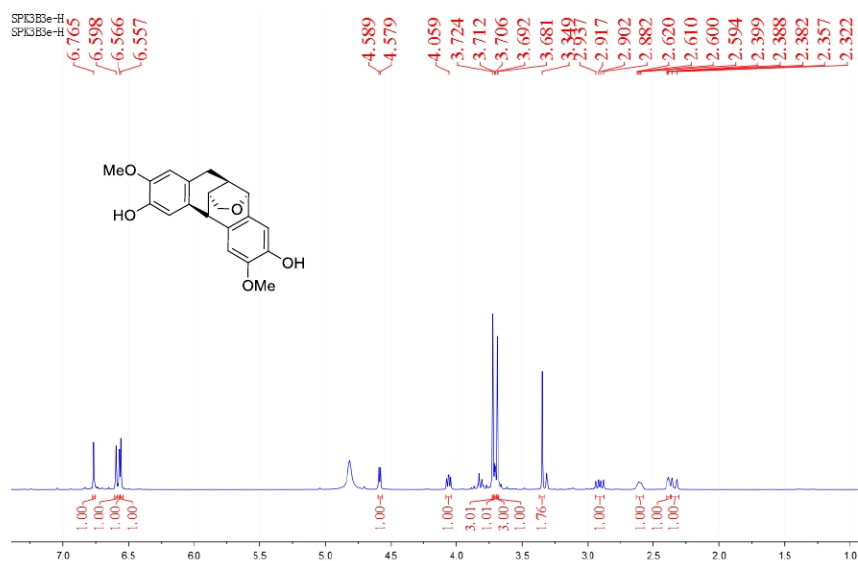
- [1] 苏国柱, 陈洁, 曹愿, 等. 蒙药山沉香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(22): 4333–4338.
- [2] 阿拉嘎, 图门·乌力吉, 陈苏依勒. 贺兰山丁香(山沉香)的资源调查报告 [J]. 中国民族医药杂志, 2007, 6: 41.
- [3] Cao Y., Wang J., Su G., et al. Anti-myocardial ischemia effect of *Syringa pinnatifolia* Hemsl. by inhibiting expression of cyclooxygenase-1 and -2 in myocardial tissues of mice [J]. *J. Ethnopharmacol.*, 2016, 187: 259–268.
- [4] Feng X., Zhang R., Li J., et al. *Syringa pinnatifolia* Hemsl. fraction protects against myocardial ischemic injury by targeting the p53-mediated apoptosis pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 52: 136–146.

.....

致 谢

附录

1 化合物 1 的图谱



S1 化合物 1 的 ^1H NMR 图谱(CD_3OD , 500 MHz)

批注 [Office65]: 论文的附录依次为附录 1, 附录 2……编号; 附录中的图表公式另编排序号, 与正文分开。

批注 [Office66]: 包括论文过分冗长的公式推导、重复性数据图表、实验性图片、图版、论文使用的重要符号说明、计算单位、缩写、程序全文及说明。

在学期间主要研究成果

在学期间发表的学术论文(格式同参考文献)与其它研究成果应分类按发表时间顺序列出。