

莲子心中具有心肌细胞保护活性的化学成分研究

李佳东[†], 高 晗[†], 李英哲, 张贵兰, 吴 骏^{*}

上海中医药大学中药研究所, 上海 201203

摘要:为了寻找莲子心(Nelumbinis Plumula)具有心肌细胞保护活性的化学成分,本研究采用多种柱色谱技术分离和纯化莲子心的80%乙醇提取物,运用¹H NMR、¹³C NMR等波谱技术和文献数据比对鉴定化合物结构,并对化合物进行心肌细胞保护活性筛选。从莲子心80%乙醇提取物分离纯化得到14个化合物,分别鉴定为柚皮苷(1)、山柰酚-3-O-β-D-芸香糖苷(2)、芹菜素-6-C-β-L-阿拉伯糖-8-C-β-D-葡萄糖苷(3)、木犀草素-7-O-β-D-新橙皮苷(4)、木犀草素-3'-O-β-D-葡萄糖苷(5)、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷(6)、橙皮苷(7)、异夏佛塔苷(8)、松脂素-4-O-β-D-葡萄糖苷(9)、对香豆酸-4-O-β-D-葡萄糖苷(10)、对香豆酸(11)、苯乙基-6-O-α-L-呋喃阿拉伯糖基-β-D-葡萄糖苷(12)、淫羊藿次苷D1(13)、淫羊藿次苷F2(14)。化合物1~6、9、11~14均为首次从莲子心中分离得到。黄酮类化合物1~8对缺氧/复氧损伤下的小鼠HL-1心肌细胞具有明显的保护作用,对小鼠HL-1-STAT3-Luc细胞中STAT3的表达也具有促进作用,且均具有剂量依赖性。

关键词:莲子心;黄酮苷;心肌细胞保护作用;缺氧/复氧损伤

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)7-1158-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.7.007

Chemical constituents from Nelumbinis Plumula and their protective effects on cardiac muscle cell

LI Jia-dong[†], GAO Han[†], LI Ying-zhe, ZHANG Gui-lan, WU Tao^{*}

Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: This study aims to investigate the chemical constituents from Nelumbinis Plumula and their protective effects on cardiac muscle cell. Fourteen compounds were isolated and purified from 80% ethanol extract by various column chromatography techniques, and identified by ¹H NMR, ¹³C NMR and other spectroscopic techniques. The compounds were screened for cardiomyocyte protective activity. Fourteen compounds were identified as naringin (1), kaempferol-3-O-β-D-rutinoside (2), apigenin-6-C-β-L-arabinopyranosyl-8-C-β-D-glucopyranoside (3), luteolin-7-O-β-D-neohesperidoside (4), luteolin-3'-O-β-D-glucopyranoside (5), apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside (6), hesperidin (7), isoschaftoside (8), pinoselinol-4-O-β-D-glucopyranoside (9), *p*-coumaric acid-4-O-β-D-glucopyranoside (10), *p*-coumaric acid (11), phenethyl-6-O-α-L-arabinofuranosyl-β-D-glucopyranoside (12), icaraside D1 (13), icaraside F2 (14). Compounds 1-6, 9, and 11-14 were firstly isolated from Nelumbinis Plumula. Flavonoids compounds 1-8 showed significant protective effects against hypoxia/reoxygenation injury in HL-1 cardiomyocytes, as well as promoting effects on STAT3 expression in HL-1-STAT3-Luc cells in dose-dependent manner.

Key words: Nelumbinis Plumula; flavonoid glycosides; cardiomyocyte protective effect; hypoxia/reoxygenation injury

莲子心(Nelumbinis Plumula)是莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)成熟种子中的干燥幼叶及绿色胚根,于秋季采收莲子时,从中剥取晒干即得,广泛分布于我国南北各地。莲子心作为药食两用的中药,其资

源丰富,应用历史悠久,《本草害利》中记载“莲子中青心,苦寒,清心去热”,《本草在新》中言其“清心火,平肝火,泻脾火,降肺火。消暑除烦,生津止渴,治目红肿”,《中国药典》也记载其具有清心热、安神、涩精的功效,其味苦、性寒、入心经,故常与元参、麦冬等配合使用治疗温热病的高热神昏、心火亢盛等症,近年来临床上常用莲子心治疗心血管类疾病^[1]。目前,从莲子心中分离、纯化和鉴定的化合

收稿日期:2024-01-19 接受日期:2024-04-12

基金项目:国家自然科学基金(81973475)

[†] 共同第一作者

^{*} 通信作者 Tel:86-532-88963253; E-mail:laurawu2000@163.com

物主要为生物碱、黄酮、甾醇、萜类和多糖等^[2]。现代药理研究表明,其具有降血压、抗心律失常、抗氧化、抗抑郁等多种药理活性^[2]。有研究表明,从莲子心中分离得到的生物碱类成分对于心肌细胞具有较好的保护作用,如甲基莲心碱可以通过抑制细胞凋亡、氧化应激和线粒体功能障碍来减轻缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation)诱导的心脏损伤,并且能够抑制心肌成纤维细胞的增殖和胶原合成,改善糖尿病小鼠的心脏功能^[3,4],莲心碱可以减少心肌梗死面积,减轻心肌细胞的损伤,对缺血再灌注损伤心肌起到保护作用^[5],异莲心碱也可以通过调控 Nrf2/HO-1 通路以减少细胞凋亡从而保护缺氧/复氧损伤的心肌细胞^[6],这些研究为治疗心血管类疾病提供了潜在的药物治疗策略。因此,为了从莲子心中寻找更多具有心肌保护作用的化学成分,本实验对莲子心 80% 乙醇提取物进行了化学成分的分离,并对其心肌细胞保护活性进行了研究,以期丰富莲心心的物质基础研究,并为其临床应用及资源的合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

LTQ 离子阱质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LC-3000 型半制备液相色谱仪(北京创新通恒有限公司);Bruker Avance III 400 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);MG II 色谱柱(10 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司);M200PRO 多功能荧光酶标仪(瑞士 Tecan 公司);CO₂ 恒温细胞培养箱(BB150, 美国 Thermo 公司);细胞摇床(Orbital Shaker TS-2, 中国 Kylin-Bell 公司);缺氧小室(MIC-101)、双流量计(DFM-3002)(美国 billups-rothenberg 公司);氧电极(美国 Nuvair 公司)。

柱色谱硅胶、薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂);ODS 柱色谱材料(德国 Merck 公司);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(GE Pharmacia 公司);分析纯二氯甲烷、乙酸乙酯等有机溶剂(国药集团化学试剂有限公司);色谱纯甲醇、乙腈等有机试剂(美国 Thermo Fisher 公司);HL-1 小鼠心肌细胞(上海子实生物有限公司);小鼠 HL-1-STAT3-Luc 稳转细胞株(由上海中医药大学医学院许言午老师采用 STAT3-Luc 报告基因慢病毒颗粒构建并赠送);CCK-8 试剂盒(大连美仑生物技术有限公司);二硫苏糖醇(纯度 ≥ 98%, 批号: D7127100, 上海诩圣生物科技有限公司);D-荧光素钾盐(纯度 ≥ 98%, 批

号:4090EES03, 上海诩圣生物科技有限公司);二甲基亚砷(纯度 ≥ 99%, 批号: D4540, 美国 Sigma-Aldrich 公司);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(纯度 ≥ 98%, 批号: T8980, 美国 Sigma-Aldrich 公司);辅酶 A(纯度 ≥ 98%, 批号: SLCG1581, 美国 Sigma-Aldrich 公司);三磷酸腺苷(纯度 ≥ 98%, 批号: A6410, 美国 Sigma-Aldrich 公司);乙二胺四乙酸(纯度 ≥ 98%, 批号: PB180320, 武汉普诺赛生命科技有限公司);硫酸镁(纯度 ≥ 98%, 批号: 09803, 国药集团化学试剂有限公司)。

莲子心药材购于江西省抚州市广昌县,经上海市中医药国际标准化研究院吴立宏博士鉴定,保存于上海中医药大学中药研究所标本室,凭证标本为 lzx160915。

1.2 方法

1.2.1 提取与分离

莲子心干燥药材 19 kg 采用 80% 乙醇, 80 °C 回流提取 3 次(料液比为 1:10, 每次 2 h)。提取液经过减压浓缩后,得浸膏 5 kg,将浸膏混悬于适量水中,再用二氯甲烷萃取,得到水部位 4.25 kg,以及二氯甲烷部位 0.75 kg。取水部位 2 kg 浸膏过大孔树脂柱,依次用水/乙醇(V/V = 100:0 → 20:80)进行梯度洗脱,根据乙醇洗脱液的浓度减压浓缩后得到 5 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 5)。

Fr. 2(20% 乙醇)385 g 经硅胶柱色谱[乙酸乙酯/甲醇/水(V/V/V = 100:2:1 → 5:2:1)]梯度洗脱得到组分 Fr. 2-1 ~ 2-5,组分 Fr. 2-1 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 22% 乙腈-水)得到化合物 **1**(5 mg, $t_R = 28$ min)和 **2**(6 mg, $t_R = 32$ min)。组分 Fr. 2-2 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 18% 乙腈-水)得到化合物 **3**(4 mg, $t_R = 25$ min)、**4**(10 mg, $t_R = 38$ min)。组分 Fr. 2-3 经 70% 甲醇凝胶柱分离得到 Fr. 2-3-1 和 Fr. 2-3-2。组分 Fr. 2-3-2 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 15% 乙腈-水)得到化合物 **9**(15 mg, $t_R = 25$ min)。

Fr. 3(40% 乙醇)348 g 经硅胶柱色谱[乙酸乙酯/甲醇/水(V/V/V = 100:2:1 → 5:2:1)]梯度洗脱得到组分 Fr. 3-1 ~ 3-10, Fr. 3-4 经 ODS 反相色谱柱色谱,用甲醇/水(V/V = 1:9 → 10:0)梯度洗脱得到 Fr. 3-4-1 ~ 3-4-5,析出化合物 **10**(16 mg)、**11**(8 mg)、**12**(12 mg)、**13**(7 mg)和 **14**(15 mg)。组分 Fr. 3-4-1 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 20% 乙腈-水)得到化合物 **5**(5 mg, $t_R = 25$ min)和 **6**(13

mg, $t_R = 35$ min)。组分 Fr. 3-4-5 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 20% 乙腈-水)得到化合物 **8** (10 mg, $t_R = 26$ min)。组分 Fr. 3-10 用半制备高效液相纯化(MG II 色谱柱, 15% 乙腈-水)得到化合物 **7** (9 mg, $t_R = 33$ min)。

1.2.2 心肌细胞保护活性研究

1.2.2.1 细胞活力实验

采用 CCK-8 法^[7]测定化合物对 HL-1 小鼠心肌细胞毒性。将培养 3 代以后的 HL-1 小鼠心肌细胞用 0.25% 的胰酶消化, 制成单细胞悬液并计数, 以每孔 4×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 h。设空白组、对照组和给药组, 空白组加入 DMEM 完全培养基 100 μ L, 对照组加入含 0.1% DMSO 的培养基 100 μ L, 给药组加入含不同浓度的化合物 **1** ~ **14** 的培养基 100 μ L。培养 24 h, 上清液弃去, 每孔加入 10% CCK-8 培养基溶液 100 μ L, 培养 1 h, 于 450 nm 波长下测定吸光度(A), 并计算其存活率(R_1)。

$$R_1 = (A_2 - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\%$$

式中, A_0 、 A_1 、 A_2 分别为空白组、对照组和给药组的吸光度。

1.2.2.2 缺氧/复氧损伤下 HL-1 小鼠心肌细胞保护实验

HL-1 小鼠心肌细胞分成对照组、模型组、给药组。对照组加入有血清 DMEM 培养基; 模型组和给药组分别加入含 0.1% DMSO 和不同浓度的化合物 **1** ~ **14** 的无血清 DMEM 培养基。模型组和给药组在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 2 h 后, 将两组同时放置在缺氧小室中, 小室内的空气用 N₂ 置换, 使氧气浓度低于 5.0%, 将缺氧小室置于培养箱中。细胞缺氧处理 4 h, 再复氧 2 h^[8]。采用 CCK-8 法测定各组 HL-1 小鼠心肌细胞活力。

1.2.2.3 缺氧/复氧损伤下 HL-1-STAT3-Luc 细胞 STAT3 表达活性实验

以 HL-1-STAT3-Luc 稳转株为受试对象, 按“1.2.2.2”中方法分组, 给药造模后, 先用 PBS 润洗, 加入细胞裂解液 50 μ L, 振荡 30 min 后, 取细胞裂解产物上清液 20 μ L 和荧光素酶反应底物 100 μ L 混合, 加入到全白板中, 在 200 nm 波长下测定发光值(L), 并计算给药组对 HL-1-STAT3-Luc 细胞 STAT3 表达的促进率(R_2)^[9]。

$$R_2 = (L_1 / L_0 - 1) \times 100\%$$

式中, L_1 为模型组或给药组的发光值; L_0 为对

照组的发光值。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 淡黄色无定型粉末; ESI-MS: m/z 581 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₇H₃₂O₁₄。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.33 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6'), 6.85 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.19 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.17 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.38 (1H, dt, $J = 12.8, 2.5$ Hz, H-2), 5.27 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 5.26 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 5.12 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 5.10 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.98 ~ 3.84 (3H, m, H-6'' β , 3''', 5'''), 3.73 ~ 3.58 (4H, m, H-2'', 3'', 6'' α , 2'''), 3.50 ~ 3.35 (3H, m, H-4'', 5'', 4'''), 3.18 (1H, m, H-3 β), 2.76 (1H, m, H-3 α), 1.31 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6'''); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 81.0/81.0 (C-2), 44.5/44.2 (C-3), 198.8/198.8 (C-4), 165.3/165.2 (C-5), 98.1/98.1 (C-6), 166.9/166.8 (C-7), 97.0/97.0 (C-8), 164.9/164.9 (C-9), 105.2/105.2 (C-10), 131.12/131.02 (C-1'), 129.5/129.4 (C-2', 6'), 116.6/116.6 (C-3', 5'), 159.4/159.4 (C-4'), 99.6/99.6 (C-1''), 79.4/79.3 (C-2''), 79.2/79.2 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.4 (C-5''), 62.5 (C-6''), 102.9/102.8 (C-1'''), 72.5 (C-2'''), 72.4 (C-3'''), 74.2 (C-4'''), 70.3 (C-5'''), 18.5 (C-6''')。以上核磁数据结合文献^[10]报道的柚皮苷核磁数据表明化合物 **1** 是(2R)-柚皮苷和(2S)-柚皮苷以大约 1:1 的比例形成的外消旋体。

化合物 2 淡黄色粉末; ESI-MS: m/z 595 [M + H]⁺, 分子式为 C₂₇H₃₀O₁₅。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.99 (2H, d, $J = 10.5$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 11.0$ Hz, H-3', 5'), 6.41 (1H, s, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.35 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 4.38 (1H, s, H-1'''), 3.23 ~ 3.82 (10H, overlapped, H-2'' ~ 6'', 2''' ~ 5'''), 0.98 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'''); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 157.0 (C-2), 133.4 (C-3), 177.5 (C-4), 161.5 (C-5), 101.5 (C-6), 164.5 (C-7), 94.0 (C-8), 156.7 (C-9), 105.6 (C-10), 121.1 (C-1'), 131.1 (C-2', 6'), 116.1 (C-3', 5'), 161.4 (C-4'), 104.1 (C-1''), 74.4 (C-2''), 76.5 (C-3''), 70.1 (C-4''), 75.9 (C-5''), 67.1 (C-6''), 102.5 (C-1'''), 70.8 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 72.0 (C-4'''), 68.4 (C-5'''), 17.9 (C-6''')。

以上数据与文献^[11]报道一致,故鉴定化合物**2**为山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷。

化合物 3 黄色无定型粉末;ESI-MS: m/z 565 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{26}H_{28}O_{14}$ 。¹H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.86(1H, s, 5-OH), 10.21(1H, s, 7-OH), 8.04(2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.90(2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3', 5'), 6.80(1H, s, H-3), 5.29(1H, brs, H-1''), 4.73(1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-1'''), 3.95 ~ 3.26(11H, m, H-2'' ~ 5'', 2''' ~ 6''');¹³C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.1(C-2), 102.5(C-3), 182.3(C-4), 157.6(C-5), 107.3(C-6), 163.1(C-7), 105.2(C-8), 155.2(C-9), 103.2(C-10), 121.8(C-1'), 129.2(C-2', 6'), 116.0(C-3', 5'), 161.4(C-4'), 70.8(C-1''), 63.4(C-2''), 72.2(C-3''), 70.2(C-4''), 66.8(C-5''), 73.6(C-1'''), 71.0(C-2'''), 78.9(C-3'''), 70.9(C-4'''), 82.0(C-5'''), 61.6(C-6''')。以上数据与文献^[12]报道一致,故鉴定化合物**3**为芹菜素-6-*C*- β -*L*-阿拉伯糖-8-*C*- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 4 淡黄色无定型粉末;ESI-MS: m/z 595 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$ 。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 7.43(2H, m, H-2', 6'), 6.92(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.77(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.62(1H, s, H-3), 6.45(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.31(1H, s, H-1''), 5.22(1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'''), 3.98 ~ 3.90(3H, m, H-2''', 5''', 6'''), 3.74 ~ 3.71(1H, m, H-6'' β), 3.71 ~ 3.68(1H, m, H-2''), 3.67 ~ 3.61(2H, m, H-3'', 4''), 3.54(1H, m, H-5''), 3.41(2H, t, $J = 9.5$ Hz, H-3''', 4'''), 1.34(3H, m, H-6''');¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 167.1(C-2), 104.4(C-3), 184.2(C-4), 163.2(C-5), 100.0(C-6), 164.6(C-7), 96.2(C-8), 159.2(C-9), 107.3(C-10), 123.7(C-1'), 114.5(C-2'), 147.3(C-3'), 151.4(C-4'), 117.0(C-5'), 120.8(C-6'), 101.2(C-1''), 79.3(C-2''), 79.4(C-3''), 71.6(C-4''), 78.5(C-5''), 62.7(C-6''), 102.8(C-1'''), 72.5(C-2'''), 72.2(C-3'''), 74.2(C-4'''), 70.3(C-5'''), 18.5(C-6''')。以上数据与文献^[13]报道一致,故鉴定化合物**4**为木犀草素-7-*O*- β -*D*-新橙皮苷。

化合物 5 黄色粉末;ESI-MS: m/z 449 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 12.96(1H, s, 5-OH), 7.79(1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.65(1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, H-

6'), 7.01(1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.81(1H, s, H-3), 6.53(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 4.90(1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 3.81 ~ 3.20(6H, m, H-2'' ~ 6'');¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 164.5(C-2), 103.4(C-3), 181.9(C-4), 161.6(C-5), 99.1(C-6), 163.6(C-7), 94.4(C-8), 157.5(C-9), 103.8(C-10), 122.1(C-1'), 114.6(C-2'), 145.9(C-3'), 151.0(C-4'), 116.6(C-5'), 121.8(C-6'), 102.1(C-1''), 73.5(C-2''), 76.2(C-3''), 70.2(C-4''), 77.5(C-5''), 61.1(C-6'')。以上数据与文献^[14]报道一致,故鉴定化合物**5**为木犀草素-3'-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 6 黄色粉末;ESI-MS: m/z 433 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{21}H_{20}O_{10}$ 。¹H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.98(1H, s, 5-OH), 10.43(1H, s, 4'-OH), 7.97(2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.95(2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.89(1H, s, H-3), 6.84(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.45(1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 5.42(1H, d, $J = 4.7$ Hz, 4''-OH), 5.16(1H, d, $J = 4.6$ Hz, 2''-OH), 5.09(1H, d, $J = 4.4$ Hz, 3''-OH), 5.08(1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.63(1H, t, $J = 4.6$ Hz, 6''-OH), 3.80 ~ 3.15(6H, m, H-2'' ~ 6'');¹³C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.4(C-2), 102.9(C-3), 182.2(C-4), 161.6(C-5), 102.3(C-6), 163.1(C-7), 95.0(C-8), 157.1(C-9), 108.4(C-10), 121.2(C-1'), 128.8(C-2', 6'), 116.2(C-3', 5'), 161.3(C-4'), 99.5(C-1''), 73.1(C-2''), 76.4(C-3''), 69.6(C-4''), 77.2(C-5''), 60.6(C-6'')。以上数据与文献^[15]报道一致,故鉴定化合物**6**为芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

化合物 7 黄色粉末;ESI-MS: m/z 611 $[M + H]^+$,分子式为 $C_{28}H_{34}O_{15}$ 。¹H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.01(1H, s, 5-OH), 6.94(3H, m, H-2', 5', 6'), 6.14(2H, m, H-6, 8), 5.50(1H, m, H-2), 4.99(1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 4.52(1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-1'''), 3.78(3H, s, 4'-OCH₃), 3.64(2H, m, H-6''), 3.52 ~ 3.22(8H, m, H-2'' ~ 5'', 2''' ~ 5'''), 2.77(2H, m, H-3), 1.09(3H, dd, $J = 6.2, 2.4$ Hz, H-6''');¹³C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 78.4(C-2), 42.6(C-3), 197.2(C-4), 163.2(C-5), 99.6(C-6), 165.3(C-7), 96.5(C-8), 162.7(C-9), 103.5(C-10), 131.1(C-1'), 114.3(C-2'), 148.1(C-3'), 146.6(C-4'), 55.9(4'-OCH₃), 112.2(C-5'), 118.1

(C-6'), 100.8 (C-1''), 73.0 (C-2''), 76.4 (C-3''), 69.8 (C-4''), 75.8 (C-5''), 66.2 (C-6''), 95.7 (C-1'''), 70.7 (C-3'''), 70.3 (C-2'''), 72.1 (C-4'''), 68.5 (C-5'''), 18.0 (C-6'''). 以上数据与文献^[10]报道一致,故鉴定化合物**7**为橙皮苷。

化合物 8 黄色粉末;ESI-MS: m/z 565 [M + H]⁺,分子式为 C₂₆H₂₈O₁₄。¹H NMR (400 MHz, DM-SO-d₆) δ :13.73(1H, s, 5-OH), 10.45(1H, s, 7-OH), 9.32(1H, s, 4'-OH), 7.95(1H, d, J = 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.94(2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.84(1H, s, H-3), 4.98(1H, d, J = 9.9 Hz, H-1''), 4.78(1H, d, J = 9.3 Hz, H-1'''), 3.94 ~ 3.24(11H, m, H-2'' ~ 5'', 2''' ~ 6'''); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ : 164.3 (C-2), 102.8 (C-3), 182.5 (C-4), 158.4 (C-5), 108.3 (C-6), 161.4 (C-7), 105.3 (C-8), 155.3 (C-9), 103.9 (C-10), 121.7 (C-1'), 129.2 (C-2', 6'), 116.2 (C-3', 5'), 161.2 (C-4'), 74.4 (C-1''), 69.8 (C-2''), 74.0 (C-3''), 68.6 (C-4''), 70.3 (C-5''), 73.5 (C-1'''), 71.1 (C-2'''), 79.1 (C-3'''), 70.7 (C-4'''), 82.1 (C-5'''), 61.4 (C-6'''). 以上数据与文献^[16]报道一致,故鉴定化合物**8**为异夏佛塔苷。

化合物 9 白色粉末;ESI-MS: m/z 521 [M + H]⁺,分子式为 C₂₆H₃₂O₁₁。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.17 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5), 7.05 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 6.97 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.83(1H, dd, J = 8.2, 1.9 Hz, H-6), 6.79(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 4.90(1H, overlapped, H-1''), 4.78 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-7), 4.73 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-7'), 4.26(2H, m, H-9 β , 9' β), 3.89(3H, s, 3'-OCH₃), 3.87(3H, s, 3-OCH₃), 3.75 ~ 3.67(2H, m, H-9 α , 9' α), 3.55 ~ 3.35(6H, m, H-2'' ~ 6''), 3.18 ~ 3.10 (2H, m, H-8, 8'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ :137.7 (C-1), 111.9 (C-2), 147.6 (C-3), 57.0(3-OCH₃), 149.4(C-4), 118.3(C-5), 120.1(C-6), 87.4 (C-7), 55.8 (C-8), 73.0 (C-9), 134.0 (C-1'), 111.2 (C-2'), 147.8 (C-3'), 56.7 (3'-OCH₃), 151.3 (C-4'), 116.3 (C-5'), 120.3 (C-6'), 87.8 (C-7'), 55.7 (C-8'), 73.0 (C-9'), 103.1 (C-1''), 75.2 (C-2''), 78.1 (C-3''), 71.6 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.8 (C-6''). 以上数据与文献^[17]报道一致,故鉴定化合物**9**为松脂素-4-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 10 白色粉末;ESI-MS: m/z 327 [M + H]⁺,分子式为 C₁₅H₁₈O₈。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :7.65 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.57 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 7.14(2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5), 6.38 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 4.99 (1H, overlapped, H-1'), 3.92(1H, dd, J = 12.1, 2.0 Hz, H-6' α), 3.73 (1H, dd, J = 12.1, 5.4 Hz, H-6' β), 3.46(3H, m, H-2', 3', 5'), 3.43 (1H, m, H-4'); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 130.2 (C-1), 131.0 (C-2, 6), 118.2 (C-3, 5), 161.0 (C-4), 146.2 (C-7), 117.7 (C-8), 171.0 (C-9), 102.1 (C-1'), 78.2 (C-2'), 75.1 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.5 (C-5'), 62.7 (C-6')。以上数据与文献^[18]报道一致,故鉴定化合物**10**为对香豆酸-4-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 11 黄色粉末;ESI-MS: m/z 165 [M + H]⁺,分子式为 C₉H₈O₅。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :7.62 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 7.45 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.82(2H, d, J = 8.5 Hz, H-3, 5), 6.30 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ :127.5 (C-1), 131.4 (C-2, 6), 117.5 (C-3, 5), 161.3 (C-4), 146.9 (C-7), 115.8 (C-8), 171.4 (C-9)。以上数据与文献^[19]报道一致,故鉴定化合物**11**为对香豆酸。

化合物 12 白色粉末;ESI-MS: m/z 434 [M + NH₄]⁺,分子式为 C₁₉H₂₈O₁₀。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :7.35 ~ 7.25 (4H, m, H-2, 3, 5, 6), 7.20 (1H, m, H-4), 4.98(1H, d, J = 1.3 Hz, H-1''), 4.33 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-1'), 4.11 ~ 3.36(11H, m, H-2' ~ 6', 2'' ~ 5''), 3.30 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-8 β), 3.22 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-8 α), 2.96 (2H, m, H-7); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 140.3 (C-1), 130.3 (C-2, 6), 129.6 (C-3, 5), 127.5 (C-4), 37.6 (C-7), 72.1 (C-8), 104.8 (C-1'), 75.4 (C-2'), 78.3 (C-3'), 72.2 (C-4'), 77.0 (C-5'), 68.4 (C-6'), 110.2 (C-1''), 83.5 (C-2''), 79.2 (C-3''), 86.1 (C-4''), 63.4 (C-5'')。以上数据与文献^[20]报道一致,故鉴定化合物**12**为苯乙基-6-O- α -L-呋喃阿拉伯糖基- β -D-葡萄糖苷。

化合物 13 白色粉末;ESI-MS: m/z 434 [M + NH₄]⁺,分子式为 C₁₉H₂₈O₁₀。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :7.34 ~ 7.24 (4H, m, H-2, 3, 5, 6), 7.22 (1H, m, H-4), 5.03 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-1''), 4.32(1H, d, J = 7.9 Hz, H-1'), 4.11 ~ 3.96(3H,

m, H- δ 3, 6' β , 4'' β), 3.93 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2''), 3.85 ~ 3.74 (2H, m, H-8 α , 4'' α), 3.63 (1H, dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz, H-6' α), 3.59 (2H, s, H-5''), 3.43 ~ 3.27 (3H, m, H-3', 4', 5'), 3.21 (1H, dd, $J = 9.0, 7.8$ Hz, H-2'), 2.96 (2H, m, H-7); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 140.3 (C-1), 130.3 (C-2, 6), 129.7 (C-3, 5), 127.5 (C-4), 37.5 (C-7), 71.9 (C-8), 104.7 (C-1'), 75.2 (C-2'), 78.2 (C-3'), 72.2 (C-4'), 77.1 (C-5'), 69.0 (C-6'), 111.2 (C-1''), 78.3 (C-2''), 80.8 (C-3''), 75.3 (C-4''), 65.8 (C-5''). 以上数据与文献^[21]报道一致, 故鉴定化合物 **13** 为淫羊藿次苷 D1。

化合物 14 白色粉末; ESI-MS: m/z 420 [M + NH_4]⁺, 分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.48 ~ 7.38 (2H, m, H-2, 6), 7.36 ~ 7.25

(3H, m, H-3, 4, 5), 5.08 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-1''), 4.90 (1H, s, H-7 α), 4.68 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-7 β), 4.36 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.07 ~ 4.00 (2H, m, H-4'' β , 6' β), 3.98 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-2''), 3.82 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-4'' α), 3.67 (2H, dd, $J = 11.2, 6.0$ Hz, H-6' α), 3.62 (2H, s, H-5''), 3.40 (1H, m, H-3'), 3.46 ~ 3.25 (3H, m, H-2', 4', 5'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 137.5 (C-1), 128.0 (C-2, 6), 127.9 (C-3, 5), 127.4 (C-4), 70.5 (C-7), 101.8 (C-1'), 73.6 (C-2'), 76.6 (C-3'), 70.3 (C-4'), 75.5 (C-5'), 67.3 (C-6'), 109.5 (C-1''), 76.5 (C-2''), 79.2 (C-3''), 73.7 (C-4''), 64.1 (C-5''). 以上数据与文献^[20]报道一致, 故鉴定化合物 **14** 为淫羊藿次苷 F2。

化合物 **1** ~ **14** 的结构见图 1。

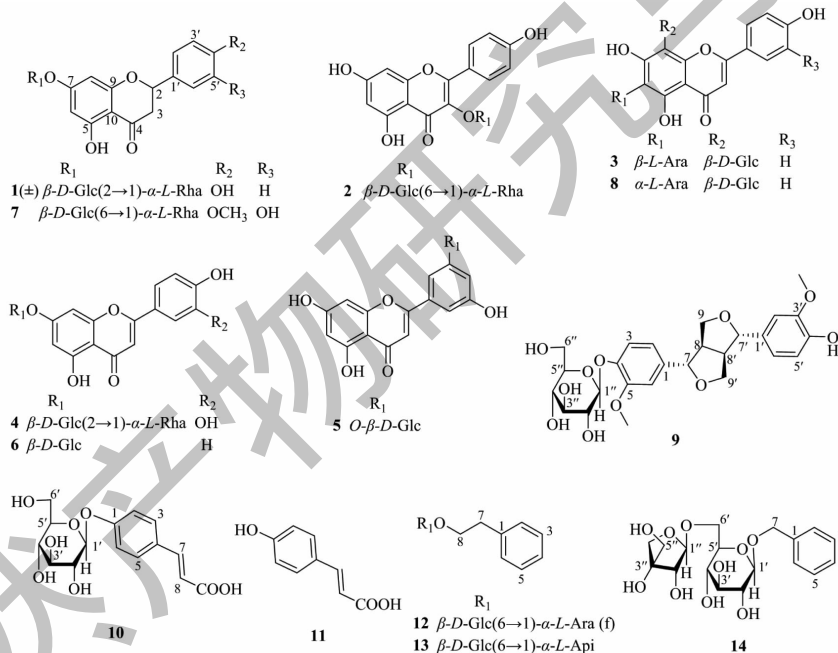


图 1 化合物 **1** ~ **14** 的结构

Fig. 1 The structures of compounds **1-14**

2.2 心肌细胞保护活性

2.2.1 细胞活力实验结果

采用 CCK-8 实验检测化合物对 HL-1 小鼠心肌细胞活力的影响, 结果见表 1。化合物 **1** ~ **8**、**9**、**10** ~ **14** 分别在浓度为 50、30 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其存活率大于 90%, 因此选取相应浓度进行后续活性研究。

2.2.2 化合物对缺氧/复氧损伤的 HL-1 小鼠心肌细胞的保护作用

采用 CCK-8 实验评价化合物对缺氧/复氧损伤

的 HL-1 小鼠心肌细胞的保护作用, 结果见图 2。在最大给药浓度时, 黄酮类化合物 **1** ~ **8** 的保护作用较为显著, 缺氧/复氧损伤的 HL-1 小鼠心肌细胞的存活率从 47.79% 提高至 56.26% ~ 73.56%, 而木脂素类、苯丙素类、苯乙醇苷类和苯甲醇苷类等化合物对缺氧/复氧损伤的 HL-1 小鼠心肌细胞未见明显的保护作用。为了考察上述 8 个黄酮类化合物对心肌保护作用是否存在量效关系, 分别选取 10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的给药浓度进行实验, 发现其保护作用随着

表1 化合物1~14对HL-1小鼠心肌细胞存活率的影响

Table 1 Effect of compounds 1-14 on cardiomyocyte survival in HL-1 mice (mean \pm standard deviation, $n = 3$)

组别 Group	最大给药浓度 Maximum concentration ($\mu\text{mol/L}$)	细胞存活率 Cell viability (%)	组别 Group	最大给药浓度 Maximum concentration ($\mu\text{mol/L}$)	细胞存活率 Cell viability (%)
对照组 Control	—	100.00 \pm 2.73	8	50	97.88 \pm 5.39
1	50	94.23 \pm 1.48	9	30	94.31 \pm 1.23
2	50	99.27 \pm 4.36	10	15	97.25 \pm 2.63
3	50	95.06 \pm 5.08	11	15	95.48 \pm 1.17
4	50	96.32 \pm 1.80	12	15	95.43 \pm 2.56
5	50	98.91 \pm 3.97	13	15	96.31 \pm 1.89
6	50	95.17 \pm 2.48	14	15	98.56 \pm 2.20
7	50	95.68 \pm 3.63			

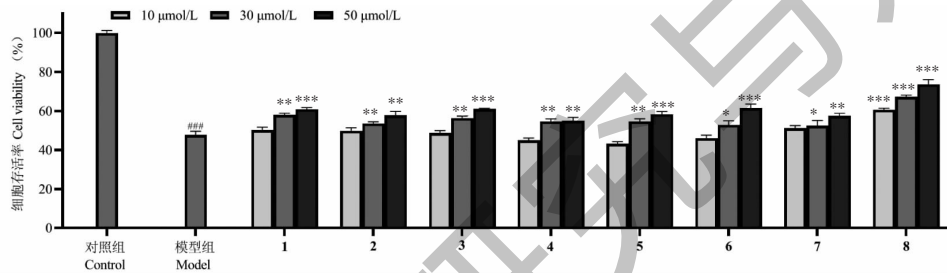


图2 化合物对缺氧/复氧损伤的HL-1小鼠心肌细胞的保护作用

Fig. 2 Protective effect of compounds on HL-1 cells under hypoxia/reoxygenation injury

注:与对照组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,下同。Note:### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group, the same/ below.

剂量的增加而提高。

2.2.3 化合物对缺氧/复氧损伤的HL-1-STAT3-Luc细胞STAT3表达的影响

采用荧光素酶报告基因实验评价化合物对缺氧/复氧损伤的HL-1-STAT3-Luc细胞STAT3表达的影响,结果见图3。在最大给药浓度时,上述8个黄酮类化合物可显著促进经缺氧/复氧损伤后的

HL-1-STAT3-Luc细胞中STAT3表达,其促进率为15.89%~36.56%。为了考察其对STAT3表达是否存在量效关系,分别选取10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的给药浓度进行实验,发现其对于缺氧/复氧损伤后的HL-1-STAT3-Luc细胞中STAT3表达随着剂量的增加而提高。

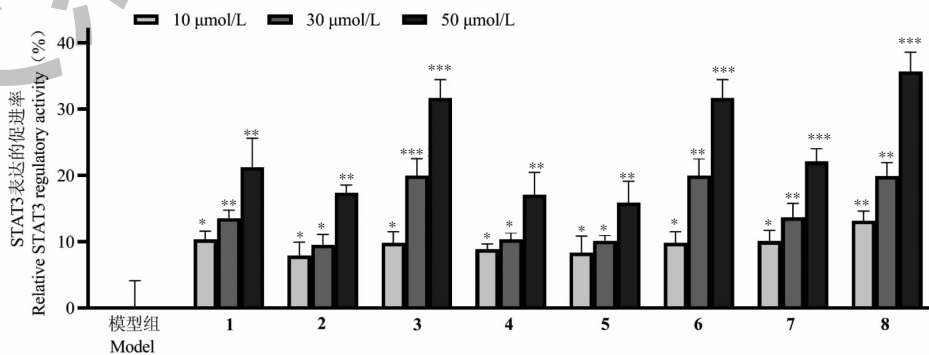


图3 莲心子化合物对缺氧/复氧损伤的HL-1-STAT3-Luc细胞STAT3表达的影响

Fig. 3 Effect of compounds on STAT3 expression in HL-1-STAT3-Luc cells under hypoxia/reoxygenation injury

3 讨论与结论

本研究从莲子心 80% 乙醇提取物中分离得到 14 个化合物,包括 8 个黄酮类(2 个黄酮碳苷,6 个黄酮氧苷),1 个木脂素类(9),2 个苯丙素类(10、11),2 个苯乙醇苷类(12、13)和 1 个苯甲醇苷类(14)化合物,其中 12 个化合物(1~6、9、11~14)为首次从莲子心中分离得到。本研究采用缺氧/复氧损伤细胞模型,对分离得到的化合物进行了心肌细胞保护活性的筛选,结果表明莲子心中的化合物 1、2、4~7(黄酮氧苷),3、8(黄酮碳苷)具有心肌细胞保护活性,且对于 STAT3 表达具有上调作用。STAT3 是介导细胞内信号转导的转录因子,研究较为广泛,并且是心脏发挥生物学功能的重要调节因子^[22]。在缺氧/复氧损伤下,心肌细胞会产生大量的活性氧(ROS),进而诱导氧化应激和细胞凋亡,导致心肌细胞的严重损伤^[23]。而 STAT3 对谷胱甘肽(GSH)的合成至关重要,促进 STAT3 的表达会大幅度升高 GSH 从而减少 ROS 的水平,减弱缺氧/复氧损伤下的心肌细胞死亡和凋亡的程度,抑制氧化应激,减少心肌细胞梗死面积^[24]。因此,我们推测莲子心中黄酮类化合物可能是通过调控 STAT3 的表达来发挥其对心肌细胞的保护作用。

参考文献

- 1 He JT, Yu S. Modern clinical applications of *Nelumbinis Plumula*[J]. *J Changchun Univ Tradit Chin Med*(长春中医药大学学报),2012,28:544-546.
- 2 Chen S, Li X, Wu J, et al. *Plumula Nelumbinis*: a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and safety[J]. *J Ethnopharmacol*,2021,266:113429.
- 3 Cheng Lu, Jie Xu, Xuan Zhang, et al. Neferine protected cardiomyocytes against hypoxia/oxygenation injury through SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling[J]. *J Biochem Mol Toxicol*,2023,37:e23398.
- 4 Liu X, Song X, Lu J, et al. Neferine inhibits proliferation and collagen synthesis induced by high glucose in cardiac fibroblasts and reduces cardiac fibrosis in diabetic mice[J]. *Oncotarget*,2016,7:61703-61715.
- 5 Wang H, Zou Y, He W, et al. The protective effect of liensinine on the myocardium injured by ischemia and reperfusion in rats[J]. *Herald Med*(医药导报),2003,22:522-523.
- 6 Zhang X, Zhang BF. Mechanism of isoliensinine in reducing myocardial cell apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation by promoting Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Hebei Med*

- J(河北医药),2023,45:1611-1615.
- 7 Du A, Li S, Zhou Y, et al. M6A-mediated upregulation of circMDK promotes tumorigenesis and acts as a nanotherapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*,2022,21:109.
- 8 Xiong W, Qian JQ. Construction and application of hypoxia/reoxygenation model of cardiomyocytes[J]. *Med Recapitulate*,2019,25:3578-3583.
- 9 Azad T, Tashakor A, Hosseinkhani S. Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives[J]. *Anal Bioanal Chem*,2014,406:5541-5560.
- 10 Liu Q, Zuo YM, Yan H, et al. Chemical Constituents of Flavonoids from *Citrus aurantium* var. *amara*[J]. *J Chin Med Mater*(中药材),2019,42:2565-2569.
- 11 Du K, Xue GM, Zhi YL, et al. Chemical constituents of *Lespedeza forrestii*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2023,35:981-985.
- 12 Liang D, Liu YF, Hao ZY, et al. Flavones and megastigmanes from *Lysimachia clethroides*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2015,27:1171-1175.
- 13 Zhan LL, Huang WM, Bian YT, et al. A new labdane-type diterpenoids from *Callicarpa nudiflora*[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2021,46:4139-4144.
- 14 Zhang Y, Ge DD, Xue J, et al. Isolation and structural identification of flavonoid components from *Leontopodium leontopodioides*[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报),2011,28:186-189.
- 15 Yin SW, Hu WJ, Ye FF, et al. Study on the constituents and acetylcholinesterase inhibitory activity of *Pteris vittata*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2018,30:1367-1370.
- 16 Liu CP, Sun WY, Wang RQ, et al. Isolation and identification of the chemical constituents of *Scoparia dulcis*[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报),2022,39:780-785.
- 17 Sun CZ, Ma N, Wang YJ, et al. Isolation and identification of chemical constituents of *Forsythia suspensa* Thunb. Vahl[J]. *Chin J Med Chem*(中国药物化学杂志),2021,31:286-291.
- 18 Xiao XH, Liu QR, Liu MH, et al. Chemical constituents from the *n*-butanol fraction of *Nelumbinis Plumula* aqueous extracts[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志),2022,37:395-400.
- 19 Zhang N, Chu XQ, Jiang JQ, et al. Chemical constituents in ethyl acetate extract from *Physalis alkekengi* var. *franchetii*[J]. *Chin Tradit Herb Drug*(中草药),2015,46:1120-1124.