



# 愈肾汤总黄酮的成分组成和活性研究

谢雪<sup>1,2,3</sup>, 张宏达<sup>1,2,3</sup>, 陈昱竹<sup>1</sup>, 曹跃<sup>1</sup>, 王丽<sup>1</sup>, 许枬<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600;

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001)

**[摘要]** 目的:对愈肾汤总黄酮的化学成分和活性进行研究,为处方的活性成分揭示和作用机制阐明奠定基础。方法:采用体外 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)损伤实验评价愈肾汤总黄酮的活性。并采用硅胶柱、大孔吸附树脂、葡聚糖凝胶色谱和高效液相制备等方法分离纯化愈肾汤总黄酮的化学成分,根据理化性质和波谱数据鉴定其结构。结果:愈肾汤总黄酮具有明显的抗过氧化氢诱导的 HUVEC 损伤和下调 PAI-1 表达( $P < 0.05$ )的作用。从愈肾汤总黄酮部位分离得到 9 个黄酮类化合物分别为毛蕊异黄酮(1)、蒙花苷(2)、3',4'-二羟基-7-O-β-D-葡萄糖苷(3)、3'-羟基-4'-甲氧基-7-O-β-D-葡萄糖苷(4)、槲皮素(5)、山柰酚(6)、芦丁(7)、红车轴草异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(8)、4'-羟基二氢黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷(9)。结论:愈肾汤总黄酮具有抗 HUVEC 氧化损伤作用,所分离的 9 个黄酮化合物均为首次从该方中分离得到,化合物 1,3,4,8,9 可能来自于黄芪,化合物 2,5~7 可能来自于小蓟和仙鹤草,其中 3,4 和 9 为首次从组方的单味药中分离得到。

**[关键词]** 愈肾汤;总黄酮;人脐静脉内皮细胞;结构鉴定

紫癜性肾炎属于免疫系统疾病,主要累及肾小球、肾小管、肾间质,可以引发各种肾脏病变和血管性病变,儿童发病率较高<sup>[1]</sup>。虽然病因还不十分清楚,治疗上也缺乏有效药物,但近年来的临床统计显示,中医药在治疗该病具有显著的优势,尤其是在病程发展和愈后干预方面<sup>[2]</sup>。愈肾汤由黄芪、丹参、白花蛇舌草等 8 味中药组成,方中黄芪补气生津,丹参活血祛瘀,为君药,配伍白花蛇舌草等臣药和佐使药,共奏补气、活血化瘀、解毒的功效。该方是辽宁中医药大学张君教授在多年临床经验的基础上,依据中医学理论对儿童紫癜性肾炎辩证分析,以其自创的该病“补气、活血化瘀、解毒”治疗原则为指导,组建的复方制剂,已获得医院临床制剂批号<sup>[3]</sup>。愈肾汤临床使用 30 余年,治疗儿童紫癜性肾炎的愈显率达 82.5%<sup>[4]</sup>。为深入揭示该方的活性成分及其药效作用,研究该方治疗儿童紫癜性肾炎的新药开发成药性。本文在愈肾汤的总黄酮<sup>[5]</sup>纯化工艺研

究的基础上,对其化学成分进行了系统的分离和体外抗内皮细胞氧化损伤作用研究。总计从愈肾汤总黄酮中分离得到了 9 个黄酮类化合物,这些化合物均为首次从该方中分离得到,其中化合物 3,4 和 9 为首次从组方的单味药中分离得到。细胞药理学研究表明,愈肾汤总黄酮具有显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对内皮细胞氧化损伤和下调 PAI-1 水平的作用。

## 1 材料

**1.1 仪器** Burk-ARX-600 型核磁共振光谱仪; Agilent 1100 高效液相色谱仪;Pharmacia 公司 SphadexLH-20;KH-300B 型超声波清洗器; NUAIRETM US AUTOFLOW 型 CO<sub>2</sub> 培养箱;武汉理想科学仪器有限公司低温冰箱(-80℃,Innova U570);苏州佳宝净化工程设备有限公司超净工作台;AE31 型倒置相差显微镜;SUNRISE 酶标仪;上海求精生化仪器厂血球计数板。

**1.2 试剂与动物** 柱色谱与薄层色谱用硅胶均为青岛海洋化工厂产品。石油醚、环己烷、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司生产;过氧化氢为分析醇,药集团化学试剂有限公司生产;四甲基偶氮唑盐(MTT)、胰蛋白酶、DMEM 培养基均购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;血管紧张素 II(Ang II)

**[稿件编号]** 20120703009

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-394)

**[通信作者]** \* 许枬,副教授,从事中药化学成分及活性研究, E-mail: xudanbs@163.com

**[作者简介]** 谢雪,助理研究员,从事中药化学成分及活性研究, E-mail: 0115jenny@163.com



购自美国 Sigma 公司; PAI-1 ELISA 试剂盒购自厦门慧嘉生物科技有限公司; Wistar 雄性大鼠 18 只, 体重 170 ~ 200 g, 购自大连医科大学, 许可证号 SCXK (辽) 2008-0002; 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 由辽宁中医药大学检验科提供; 愈肾汤由辽宁中医药大学附属医院药剂科提供。愈肾汤总黄酮, 采用前期筛选的大孔吸附树脂工艺富集<sup>[5]</sup>。

## 2 愈肾汤总黄酮抗内皮细胞氧化损伤实验

### 2.1 MTT 法测总黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 损伤的保护作用

将 Wistar 雄性大鼠 18 只随机分成 3 组, 分别为愈肾汤组、总黄酮组、空白组。各给药组以 10 g · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> (折合生药量) 剂量灌胃给予大鼠, 空白组灌胃给予等体积蒸馏水。第

8 天灌胃给药 0.5 h 后, 腹主动脉取血, 制备血清, 置于 -80 °C 冰箱备用。取对数生长期内皮细胞, 消化以后制成 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μL, 将静止期的细胞按组别更换相应的含药血清, 继续培养相应时间后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 g · L<sup>-1</sup>), 37 °C 培养箱孵育 4 h。弃上清, 加 150 μL DMSO, 振荡混合。用酶联免疫检测仪在波长 492 nm 处读取各孔吸光值 (A), 结果见表 1。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造模组与空白组对照, 有明显差异 (P < 0.01), 表明造模成功; 愈肾汤组和总黄酮组与造模组比较, 均有显著性差异 (P < 0.01), 且总黄酮作用趋势更为明显, 表明总黄酮是愈肾汤抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 损伤的有效部位。

表 1 总黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of total flavonoids on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by protected HUVEC free from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	给药及培养时间	A
总黄酮	10% 大鼠含药血清 DMEM 液孵育 24 h 后加入终浓度 1 × 10 <sup>-4</sup> mol · L <sup>-1</sup> 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 孵育 4 h	0.536 1 ± 0.025 7 <sup>1)</sup>
愈肾汤	10% 大鼠含药血清 DMEM 液孵育 24 h 后加入终浓度 1 × 10 <sup>-4</sup> mol · L <sup>-1</sup> 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 孵育 4 h	0.453 9 ± 0.040 5 <sup>1)</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型	10% 大鼠正常血清 DMEM 液孵育 24 h 后加入终浓度 1 × 10 <sup>-4</sup> mol · L <sup>-1</sup> 的 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 孵育 4 h	0.402 8 ± 0.029 3 <sup>2)</sup>
空白	10% 大鼠正常血清 DMEM 液孵育 28 h	0.949 8 ± 0.080 9

注: <sup>1)</sup> 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造模组比较 P < 0.01; <sup>2)</sup> 与空白组比较 P < 0.01。

### 2.2 ELISA 法检测总黄酮对 PAI-1 释放的影响

分别取 2.1 中各组细胞培养上清液 10 μL, 加入酶标板孔内按 ELISA 检测试剂盒说明书依次加入各种试剂, 酶标仪 450 nm 处测定 A。以 A 对 PAI-1 作标准曲线, 依据各实验组的 A 求出 PAI-1 含量, 结果见表 2。造模组与空白组比较, 有显著性差异 (P < 0.05), 表示造模成功; 总黄酮组与愈肾汤组与造模组比较, 均有显著差异 (P < 0.05), 表明愈肾汤及其总黄酮均具有明显的下调内皮细胞的 PAI-1 表达水平的作用。上述结果提示, 下调 PAI-1 表达, 可能是其愈肾汤总黄酮抑制内皮细胞氧化损伤的作用机制之一。

### 3 愈肾汤总黄酮化学成分的分离

取愈肾汤总黄酮<sup>[5]</sup> 膏 700 g 加水混悬, 用正丁醇萃取 (2.4 L × 3), 合并正丁醇提取液, 回收溶剂, 得正丁醇提取物 95 g。取正丁醇提取物 90 g, 经硅胶柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (50:1 ~ 20:1), 得到 4 个流分, Fr. A1 ~ Fr. A4, 其中 Fr. A1 (0.1 g) 经凝胶

表 2 总黄酮对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤人脐静脉内皮细胞分泌 PAI-1 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of total flavonoids on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by protected HUVEC free from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured expression of PAI-1 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	PAI-1/mg · L <sup>-1</sup>
总黄酮	47.71 ± 3.06 <sup>1)</sup>
愈肾汤	53.37 ± 0.82 <sup>1)</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型	60.03 ± 3.37 <sup>2)</sup>
空白	48.77 ± 3.76

注: 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较, <sup>1)</sup> P < 0.05; 与空白组比较, <sup>2)</sup> P < 0.05。

柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇 (1:1) 为洗脱剂, 得到化合物 1 (50 mg)。正丁醇萃取后剩余水层 584 g, 经硅胶柱色谱, 以三氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (20:1 ~ 0:100), 得到 6 个流分, Fr. B1 ~ Fr. B6。其中 Fr. B5 为淡黄色粉末, 经甲醇水重结晶得到化合物 2 (500 mg)。Fr. B4 (0.1 g) 经 Sephadex LH-20 反复柱色谱, 以甲醇为洗脱剂, 再经液相制备, 以 25% 甲醇为



洗脱剂,得化合物**3**(24 mg),**4**(23 mg)。Fr. B2(0.7 g)经Sephadex LH-20柱色谱,以三氯甲烷-甲醇(1:1)为洗脱剂纯化后,得化合物**5**(65 mg),**6**(73 mg)。Fr. B6(0.2 g)经三氯甲烷-甲醇(3:1)反复柱色谱,Sephadex LH-20反复柱色谱,以甲醇为洗脱剂,得化合物**7**(38 mg)。Fr. B3(0.5 g)经三氯甲烷-丙酮(10:1~3:1),三氯甲烷-甲醇(5:1)反复柱色谱,再经液相制备,以30%甲醇为洗脱剂,得化合物**8**(32 mg),**9**(18 mg)。

#### 4 结构鉴定

化合物**1** 白色针晶(三氯甲烷),mp 258~260℃,盐酸镁粉反应和三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性,Molish反应阴性。ESI-MS  $m/z$  284  $[M - H]^-$ 。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 8.30(1H, s, H-2), 7.97(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5), 6.93(1H, dd,  $J=8.4$ , 2.4 Hz, H-6), 6.87(1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-8), 7.05(1H,  $J=2.4$  Hz, H-2'), 6.93(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 6.94(1H, dd,  $J=8.4$ , 2.4 Hz, H-6'), 3.79(3H, s, -OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 153.5(C-2), 123.8(C-3), 175.0(C-4), 127.7(C-5), 115.6(C-6), 163.0(C-7), 102.4(C-8), 157.8(C-9), 116.9(C-10), 125.2(C-1'), 116.8(C-2'), 146.5(C-3'), 147.9(C-4'), 112.6(C-5'), 112.2(C-6'), 56.1(4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[6]报道的毛蕊异黄酮数据一致。

化合物**2** 淡黄色粉末,盐酸镁粉反应、Molish反应、三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性。ESI-MS  $m/z$  591  $[M - H]^-$ 。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 12.82(1H, s, 5-OH), 6.93(1H, s, 3-H), 6.44(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 6.77(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 8.03(2H, d,  $J=9$  Hz, H-2', 6'), 7.13(2H, d,  $J=9$  Hz, H-3', 5'), 3.85(3H, s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 5.05(1H,  $J=7.2$  Hz, H-1''), 4.54(1H, br s, H-1'''), 1.07(3H, d,  $J=6.6$  Hz, 6'''-CH<sub>3</sub>), 3.30~3.80(10H, H-2''~6'', 2'''~5'''); <sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 164.4(C-2), 104.2(C-3), 182.5(C-4), 161.6(C-5), 100.1(C-6), 163.4(C-7), 95.3(C-8), 157.4(C-9), 105.9(C-10), 123.1(C-1'), 128.9(C-2', 6'), 115.1(C-3', 5'), 162.9(C-4'), 56.0(4'-OCH<sub>3</sub>), 100.9(C-1''), 73.5(C-2''), 76.7(C-3''), 71.2(C-4''), 76.1(C-5''), 66.6(C-6''), 100.4(C-1'''), 70.8(C-2'''), 70.1(C-3'''), 72.5(C-4'''), 68.8(C-5'''), 18.3(C-6''')。以

上数据与文献[7]报道的蒙花苷数据一致。

化合物**3** 淡黄色粉末,盐酸镁粉反应、Molish反应、三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性。FAB-MS  $m/z$  433  $[M + H]^+$ 。<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 6.18(1H, s, H-3), 8.04(1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5), 6.88(1H, dd,  $J=9.0$ , 1.8 Hz, H-6), 6.17(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 6.39(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 6.88(1H, d,  $J=8.9$  Hz, H-5'), 8.04(1H, dd,  $J=8.9$ , 1.8 Hz, H-6'), 5.25(1H, d,  $J=6.0$  Hz, H-1''), 3.30~3.80(6H, m, H-2''~6'')。以上数据与文献[8]报道的3',4'-二羟基-黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷数据一致。

化合物**4** 淡黄色粉末,盐酸镁粉反应、Molish反应、三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性。FAB-MS  $m/z$  447  $[M + H]^+$ 。<sup>1</sup>H-NMR(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 600 MHz)  $\delta$ : 7.57(1H, s, H-3), 8.34(1H, d,  $J=9.0$  Hz, H-5), 7.29(1H, dd,  $J=9.0$ , 1.8 Hz, H-6), 7.42(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 7.77(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 7.03(1H, d,  $J=7.8$  Hz, H-5'), 7.28(1H, dd,  $J=7.8$ , 1.8 Hz, H-6'), 3.76(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.81(1H, d,  $J=6.0$  Hz, H-1''), 4.20~4.70(6H, m, H-2''~6''); <sup>13</sup>C-NMR(C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 150 MHz)  $\delta$ : 162.1(C-2), 115.7(C-3), 175.3(C-4), 125.7(C-5), 112.1(C-6), 157.6(C-7), 101.5(C-8), 152.9(C-9), 117.5(C-10), 127.6(C-1'), 119.5(C-2'), 147.8(C-3'), 148.5(C-4'), 120.2(C-5'), 124.8(C-6'), 101.6(C-1''), 74.6(C-2''), 78.2(C-3''), 71.0(C-4''), 79.0(C-5''), 62.1(C-6''), 55.7(4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[8]报道的3'-羟基-4'-甲氧基-黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷数据一致。

化合物**5** 黄色粉末,盐酸镁粉反应和三氯化铁-铁氰化钾反应呈阳性,Molish反应阴性。ESI-MS  $m/z$  301  $[M - H]^-$ 。<sup>1</sup>H-NMR(DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.19(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6), 6.41(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-8), 7.68(1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2'), 6.89(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5'), 7.55(1H, dd,  $J=8.4$ , 1.8 Hz, H-6'); <sup>13</sup>C-NMR(DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 146.8(C-2), 135.8(C-3), 175.9(C-4), 160.8(C-5), 98.3(C-6), 164.0(C-7), 93.2(C-8), 156.2(C-9), 103.0(C-10), 122.0(C-1'), 115.1(C-2'), 145.1(C-3'), 147.8(C-4'), 115.7(C-5'), 120.0(C-6')。以上数据与文献[9]报道的槲皮素数据一致。

化合物**6** 黄色粉末,盐酸镁粉反应和三氯化



铁-铁氰化钾反应呈阳性, Molish 反应阴性。ESI-MS  $m/z$  285  $[M - H]^-$ 。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.18 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-6), 6.43 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-8), 8.03 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 146.9 (C-2), 135.7 (C-3), 175.9 (C-4), 160.8 (C-5), 98.3 (C-6), 164.0 (C-7), 93.6 (C-8), 156.3 (C-9), 103.1 (C-10), 121.8 (C-1'), 129.6 (C-2', C-6'), 115.5 (C-3', 5'), 159.3 (C-4')。以上数据与文献[10]报道的山柰酚数据一致。

化合物7 黄色粉末, 盐酸镁粉反应、Molish 反应和三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性。ESI-MS  $m/z$  633  $[M + H]^+$ 。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.18 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 6.37 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 7.56 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2'), 6.84 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5'), 7.54 (1H, dd,  $J = 7.8, 2.4$  Hz, H-6'), 5.34 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 4.39 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-1'''), 3.22 ~ 3.72 (10H, m, H-2'' ~ 6'', 2''' ~ 5'''); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO- $d_6$ , 150 MHz)  $\delta$ : 157.0 (C-2), 133.7 (C-3), 177.7 (C-4), 161.6 (C-5), 99.3 (C-6), 164.4 (C-7), 94.1 (C-8), 157.0 (C-9), 104.2 (C-10), 121.5 (C-1'), 115.7 (C-2'), 148.9 (C-3'), 145.2 (C-4'), 116.7 (C-5'), 122.0 (C-6'), 101.7 (C-1''), 74.5 (C-2''), 76.4 (C-3''), 71.0 (C-4''), 76.9 (C-5''), 67.4 (C-6''), 101.2 (C-1'''), 70.8 (C-2'''), 70.4 (C-3'''), 72.3 (C-4'''), 68.7 (C-5'''), 18.2 (C-6''')。以上数据与文献[11]报道的芦丁数据一致。

化合物8 白色针晶(甲醇), mp 146 ~ 148 °C, FAB-MS  $m/z$  433  $[M + H]^+$ 。盐酸镁粉反应、Molish 反应和三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 8.19 (1H, s, H-2), 8.13 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.23 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-2'), 7.20 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.4$  Hz, H-6'), 6.97 (2H, br s, H-6, 8), 3.87 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 5.10 (1H,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 3.38 ~ 3.72 (6H, m, H-2'' ~ 6''); <sup>13</sup>C-NMR (MeOD- $d_4$ , 150 MHz)  $\delta$ : 155.2 (C-2), 121.6 (C-3), 177.9 (C-4), 163.5 (C-5), 103.8 (C-6), 165.4 (C-7), 101.8 (C-8), 159.2 (C-9), 105.0 (C-10), 112.6 (C-1'), 117.1 (C-2'), 147.5 (C-3'), 149.2 (C-4'), 115.0 (C-5'), 120.2 (C-6'), 101.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.1 (C-

5''), 62.5 (C-6''), 56.4 (4'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献[12]报道的红车轴草异黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷数据一致。

化合物9 白色粉末, 盐酸镁粉反应和三氯化铁-铁氰化钾反应均呈阳性, Molish 反应阴性。FAB-MS  $m/z$  419  $[M + H]^+$ 。<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)  $\delta$ : 5.44 (1H, dd,  $J = 12.6, 2.9$  Hz, H-2), 2.72 (1H, dd,  $J = 16.9, 2.9$  Hz, H-3), 3.03 (1H, dd,  $J = 12.6, 16.9$  Hz, H-3), 7.72 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.49 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.4$  Hz, H-6), 6.36 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-8), 7.43 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-2', 6'), 7.13 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3', 5'), 5.10 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1''), 3.38 ~ 3.71 (6H, m, H-2'' ~ 6''); <sup>13</sup>C-NMR (MeOD- $d_4$ , 150 MHz)  $\delta$ : 80.7 (C-2), 44.9 (C-3), 193.2 (C-4), 134.5 (C-5), 112.6 (C-6), 166.8 (C-7), 102.2 (C-8), 165.4 (C-9), 117.4 (C-10), 129.8 (C-1'), 128.8 (C-2', C-6'), 117.8 (C-3', 5'), 159.2 (C-4'), 103.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6'')。以上数据与文献[10]报道的4'-羟基-二氢黄酮-7-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷数据一致。

## 5 讨论

预实验研究显示, 愈肾汤总黄酮类成分含量较高, 约占25%以上。这可能与方中小蓟含有黄酮和黄酮醇类化合物, 仙鹤草含有槲皮素、芦丁等黄酮醇类成分, 黄芪含有大量的二氢黄酮和异黄酮类化合物有关。因此, 在处方的活性成分研究工作中, 将具有明显抗炎、抗氧化的黄酮类化合物作为研究对象。经大孔吸附树脂富集得到了含量高达76%的总黄酮, 为愈肾汤活性部位及其药效作用研究提供了质量稳定的研究对象和受试药物。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>是反应性氧代谢产生的原发性化学物质, 可以进一步产生其他更多的反应性氧化剂, 可促进自由基生成, 各种可溶性微粒(免疫复合物、补体成分和ANCA)刺激均可增加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生。生物体内H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>如不及时消除可透过细胞膜, 膜外与Fe<sup>2+</sup>或Cu<sup>2+</sup>在生成羟自由基, 从而加速氧化物质的生成。氧化损伤在肾脏疾病发展过程中具有多方面的作用, 如损伤肾小球基底膜、引起炎症反应和血小板聚集等。大量研究表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可导致肾小球毛细血管内血小板聚集、内皮细胞肿胀, 血栓形成, 从而造成肾小球结构损伤<sup>[1]</sup>。



PAI-1 是局部血管损伤的敏感指标,肾脏损伤时,其在血液和尿中浓度都有明显的变化,能反应肾脏局部内皮细胞和纤溶损伤<sup>[13]</sup>。很多研究表明,其含量变化与肾脏损伤有关<sup>[14]</sup>。

为探索愈肾汤总黄酮的药效作用和作用机制,本文在原方的药效研究基础之上<sup>[15-21]</sup>,参考黄酮类化合物的现代活性研究成果<sup>[22]</sup>,以血管内皮细胞 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型,重点讨论了愈肾汤总黄酮对内皮细胞氧化损伤和 PAI-1 表达水平的影响。实验结果显示,愈肾汤总黄酮具有血管内皮细胞保护作用,并可下调 PAI-1 表达水平。与愈肾汤组相比,总黄酮作用趋势更为明显,表明总黄酮是愈肾汤抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 HUVEC 损伤的有效部位。上述结果提示,下调 PAI-1 表达水平,可能是愈肾汤总黄酮抑制内皮细胞氧化损伤的作用机制之一。这一实验结果丰富了处方的药效作用和作用机制,也从活血化瘀的角度表征了处方组方原则的合理性。

本实验首次从愈肾汤中分离得到 9 个黄酮类化合物,经与处方单味药化学成分文献对照<sup>[23-24]</sup>,推测这些化合物 1,3,4,8,9 可能来自于黄芪,化合物 2,5~7 可能来自于小蓟和仙鹤草。化合物 3,4,9 未见从组方各单味药中分离得到的报道,为首次从组方单味药中首次分离得到。这一结果从成分的角度一定程度上揭示了黄芪和丹参对复方组分中的重要贡献,与黄芪和丹参在处方配伍中的君药地位相吻合。

本次愈肾汤总黄酮的化学成分和活性研究,结合前期愈肾汤的抑制 TGF- $\beta_1$  基因表达,促进 MMP-3 基因表达、抑制 TIMP-2 基因表达作用,并抑制肾小球系膜细胞基质中 FN、IV 型胶原的合成和分泌,促进 ECM 降解等活性的研究结果<sup>[1,4,16-20]</sup>,为对明确愈肾汤的物质基础,探究作用机制,优化处方提供了可靠的实验数据支撑。

#### [参考文献]

[1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.  
[2] 黎磊石,刘志红. 中国肾脏病学[M]. 北京:人民军医出版社,2008.  
[3] 马立明. 张君教授以“毒、瘀、气”论治小儿过敏性紫癜[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2006.  
[4] 丁晓欢,张君,杨冠琦,等. 愈肾颗粒小复方对大鼠肾小球系膜细胞 MMP-3/TIMP-1 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2010,11(5): 394.

[5] 谢雪,张宏达,许枏,等. 大孔吸附树脂纯化愈肾颗粒中总黄酮工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20): 9.  
[6] 海力茜,张庆英,梁鸿,等. 多序岩黄芪化学成分研究[J]. 药学报,2003,38(8): 592.  
[7] 韩百翠,李宁,李铄. 小蓟化学成分分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(10): 793.  
[8] E Wong, C M Francis. Flavonoids in genotypes of *Trifolium subterraneum*-1; the normal flavonoid pattern of the Geraldton variety [J]. *Phytochemistry*, 1968, 7: 2123.  
[9] 张云峰,魏东,郭祀远,等. 大花罗布麻的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18: 954.  
[10] 丁林芬,郭亚东,吴兴德,等. 珍珠菜黄酮类化学成分研究[J]. 中成药,2010,32(5): 827.  
[11] 杨念云,段金殿,李萍,等. 金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国药学杂志,2006,41(21): 1621.  
[12] 涂天智,沈剑刚,蒋建勤. 内蒙黄芪的化学成分研究[J]. 华西药学杂志,2009,24(5): 466.  
[13] 韦秀英,宁夏,王乃荣,等. T-PA 和 PAI-1 和测试在早期糖尿病肾病中的意义[J]. 中国老年病学杂志,2005,25(8): 877.  
[14] Ronald F, Feinberg K, Chuan L K, et al. Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts [J]. *Endocr Metab Disord*, 2002, 3(2): 133.  
[15] 张君,郭振武,董娜,等. 消斑愈肾剂治疗小儿紫癜性肾炎的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,1994,14(5): 298.  
[16] 张君,于英华,罗立欣,等. 愈肾颗粒对血管紧张素 II 刺激大鼠肾小球系膜细胞 TGF- $\beta$  表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2005,6(6): 354.  
[17] 董娜,于英华,张君. 消斑愈肾剂对大鼠肾小球系膜细胞细胞外基质影响的研究[J]. 实用中医内科杂志,2003,17(4): 450.  
[18] 杨冠琦. 益气活血药对肾小球系膜细胞基质金属蛋白酶-2 及其抑制剂-2 的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2009.  
[19] 张君,姜欣,王莉,等. 消斑愈肾颗粒剂对大鼠 IgA 肾病免疫调节的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(4): 37.  
[20] 张雅娟,张君. 过敏性紫癜动物模型制作与加味紫草汤对 arthus 反应作用的实验研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2010.  
[21] 张少卿. 过敏性紫癜病例分析及紫草汤的实验研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2008.  
[22] 朱华,梁东艳,廖月葵. 总黄酮化合物药理作用研究进展[J]. 广西中医药,2003,26(3): 3.  
[23] 孟永梅. 小蓟的化学成分研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2007.  
[24] 温燕梅. 黄芪的化学成分研究进展[J]. 中成药,2006,28(6): 879.

## Chemical constituents and activities of total flavonoids from Yushen Tang

XIE Xue<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-da<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-zhu<sup>1</sup>, CAO Yue<sup>1</sup>, WANG Li<sup>1</sup>, XU Zhan<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Jiangsu Konion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

[ **Abstract** ] **Objective:** To study the chemical constituents and activity of total flavonoids contained in Yushen Tang, in order to lay a foundation for defining active constituents of the prescription and their mechanism. **Method:** The activity of total flavonoids contained in Yushen Tang were evaluated by *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced human umbilical vein endothelial cell injury experiment. The chemical constituents were separated and purified by such methods as silica column chromatography, macroporous resin chromatography, sephadex and HPLC preparation, and their structures were identified on the basis of their spectral data and physicochemical properties. **Result:** Total flavonoids contained in Yushen Tang showed the effects in inhibiting hydrogen peroxide-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) injury and down-regulating PAI-1 expression ( $P < 0.05$ ). Nine flavonoids were separated from total flavonoids contained in Yushen Tang and identified as calycosin (**1**), linarin (**2**), 3',4',7-trihydroxyflavone-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**3**), 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-glucoside (**4**), quercetin (**5**), kaempferol (**6**), rutin (**7**), pratensein-7-*O*- $\beta$ -D-glucoside (**8**) and 7-*O*-glucosyl liquiritigenin (**9**). **Conclusion:** Total flavonoids contained in Yushen Tang showed the effect in inhibiting HUVEC injury. All of the nine flavonoids were separated from Yushen Tang for the first time, and compounds **1,3,4,8,9** may be derived from astragalus mongholicus, while compounds **4,5-7** may be derived from herba cephalanoplosis segeti and hairyvein agrimony. Among them, compounds **3,4** and **9** were separated from single ingredient of the prescription for the first time.

[ **Key words** ] Yushen Tang; flavonoids; human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); structure identification

doi:10.4268/cjcmm20122317

[ 责任编辑 孔晶晶 ]