

573–582.

- [11] 魏刚,林双峰,方永奇. 气相色谱-质谱联用法分析石菖蒲水煎液主要化学成分[J]. 广州中医药大学学报, 2005,22(2):147–149.
- [12] LOPATNIKOVA J A, GOLIKOVA E A, SHKARUBA N S,

et al. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2013, 42(6):429–432.

## 杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物抑制血清素合成及促骨形成作用

吉璐宏,赵庭波

(湖北省仙桃市第一人民医院骨外二科,仙桃 433000)

**摘要** 目的 探讨杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对血清素合成的抑制活性以及促骨形成活性。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和荧光实时定量聚合酶链反应(PCR)测试杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对RBL-2H3细胞中血清素合成的关键酶色氨酸羟化酶-1(TPH-1)的抑制率、TPH-1蛋白含量及mRNA的表达。构建去势大鼠骨质疏松症模型(OVX),并将骨质疏松大鼠随机分为给药组、甲状旁腺激素组、模型对照组和假手术组,给药35 d后采用HPLC法测定血清和小肠中血清素水平。采用噻唑蓝(MTT)法测定杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对成骨细胞促进活性。结果 在RBL-2H3细胞中,杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对TPH-1的抑制呈剂量依赖性,抑制率为20.4%~92.5%,缀合物7在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度有最高抑制率(92.5%),TPH-1蛋白含量为 $51\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,较对照组( $216\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )显著降低,TPH-1mRNA表达也降低。与假手术组比较,模型对照组血清和小肠中血清素水平明显增高( $P<0.05$ ),给予缀合物后大鼠血清和小肠中血清素水平却明显降低,缀合物7给药后血清和小肠血清素分别为 $232,155\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,较模型对照组1 050和 $783\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 明显降低。缀合物能够促进乳小鼠成骨细胞增殖。结论 该研究为开发新型、高效、低毒的具有抗骨质疏松症的齐墩果酸衍生物提供信息和依据。

**关键词** 杂环齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物;齐墩果酸;阿司匹林;血清素;骨质疏松

中图分类号 R336;R285

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)06-0630-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.010

## Effects of Heterocyclic Oleanolic Acid Derivatives-Aspirin Conjugates on Inhibition of Serotonin Biosynthesis and Increase of Bone Formation

Ji Luhong, ZHAO Tingbo (Department of Orthopaedics, the First People's Hospital of Xiantao City, Hubei Province, Xiantao 433000, China)

**ABSTRACT Objective** To explore the effects of the heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates on inhibition of serotonin biosynthesis and increase of bone formation. **Methods** The inhibition rate, content and mRNA expression of heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates on tryptophan hydroxylase 1 (TPH-1), which was the principal enzyme in the biosynthesis of serotonin, were tested by HPLC, ELISA kit and real-time PCR, respectively. Osteoporosis model was established by ovariectomy (OVX). The rats were randomly divided into conjugate groups, parathyroid hormone group, model control group and sham operation group. Serum and gut serotonin levels were tested by HPLC after 35 days of administration, and the antiosteoporosis activity of the heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates was evaluated by using osteoblast-like cells isolated from murine calvaria by MTT assay. **Results** The preliminary biological results showed that heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates displayed a dose-dependent suppression on TPH-1 in RBL-2H3, and the inhibition rate was 20.4%–92.5%. Specifically, conjugate 7 at  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration showed the greatest inhibition rate on TPH-1 (92.5%). Content of TPH-1 was  $51\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , significantly lower than that in the control group ( $216\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), as well as the TPH-1 mRNA. Compared with the sham operation group, levels of serum and gut serotonin were increased in OVX group, while they were significantly decreased in conjugate groups, and reduced significantly in conjugate 7 group ( $232$  and  $155\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) as compared with OVX group ( $1\ 050$  and  $783\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); Moreover, heterocyclic oleanolic acid derivatives-aspirin conjugates could increase the bone formation. **Conclusion** This study provides information and basis for development of novel, efficient and harmfullness oleanolic acid derivatives with anti-osteoporosis.

**KEY WORDS** Heterocyclic oleanolic acid-aspirin conjugates; Oleanolic acid; Aspirin; Serotonin; Osteoporosis

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 又名庆四素, 是一种齐墩果烷型五环三萜类化合物, 以游离或与糖结合成苷的形式广泛存在于中草药, 如夏枯草、女贞子、连翘、白花蛇舌草、丁香等<sup>[1-2]</sup>。齐墩果酸具有抗炎<sup>[3]</sup>、抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、抗人获得性免疫缺陷病毒<sup>[6]</sup>、降糖<sup>[7]</sup>等多种药理活性, 且副作用小, 毒性低, 是一种具有开发潜力的先导化合物。通过初步研究, 笔者发现齐墩果酸还能抑制肠源血清素 5-羟色胺 (5-HT) 生物合成, 而血清素进入血液循环后通过抑制骨细胞分化和增殖进而减少骨形成, 并导致骨质疏松症<sup>[8-10]</sup>。因此, 齐墩果酸是一类能够通过促骨细胞形成治疗骨质疏松症的新型药物, 而目前临床上具有促进骨形成作用的药物只有甲状旁腺激素, 但使用该药物却增加骨肉瘤发病率的风险<sup>[11]</sup>。然而, 齐墩果酸对血清素合成的抑制作用仍然较弱, 有必要对其进行结构修饰。因此, 笔者将具有抗炎<sup>[12]</sup>、抗癌<sup>[13]</sup>、促骨形成<sup>[14-15]</sup>等多种药理活性的阿司匹林拼接到齐墩果酸上构建成一个单一的分子 (缀合物 **1**, 图 1)。同时, 参考五环三萜化合物的结构修饰经验发现, 在五环三萜化合物的 A 环引入杂环能够提高其药理活性, 如抗肿瘤<sup>[16-18]</sup>、降糖<sup>[19]</sup>。因此, 笔者研究齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物的 A 环引入异噁唑、吡唑、吡嗪、喹啉、吲哚和喹啉杂环 (缀合物 **3, 4, 5, 6, 7, 8**) 对其骨形成活性的影响。报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雌性 SD 大鼠, 鼠龄 10 ~ 11 周, 体重 205 ~ 255 g, 雌性昆明乳小鼠, 鼠龄 1 ~ 3 d, 体重 6 ~ 8 g; 由武汉大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号: SYXK (鄂) 2008-0004; 实验动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2010-2012; 动物级别: 无特定病原体 (SPF) 级。在 SPF 级动物房自由饮水和摄食, 每天光照 12 h, 室温 20 ~ 25 °C, 相对湿度 (60 ± 40) %。

**1.2 试剂和细胞** 齐墩果酸 (北京百灵威科技有限公司, 批号: 117093, 含量 > 95 %); 阿司匹林 (北京百灵威科技有限公司, 批号: DRE-C10024000, 含量 > 95 %)。齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物由武汉大学刘远教授合成和结构确证 (含量 > 95 %); 达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM, Hyclone 公司, 批号: SH30022.01B)、α-MEM 培养基 (Hyclone 公司, 批号: SH30024.01B)、胎牛血清 (Hyclone 公司, 批号: 16250-078); 色氨酸羟化酶-1 (tryptophan hydroxylase 1, TPH-1) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (武汉 Cusabio 公司); 5-HT 标准品 (上海生物科技有限公司, 批号: CSB-E13596h); 甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH, 阿拉丁试剂有限公司, 批号: P121395); 二甲亚砜 (DMSO) 等其他试剂均为分析纯; RBL-2H3 细胞株购自上海细胞典藏中心, 本实验室冻存使用。

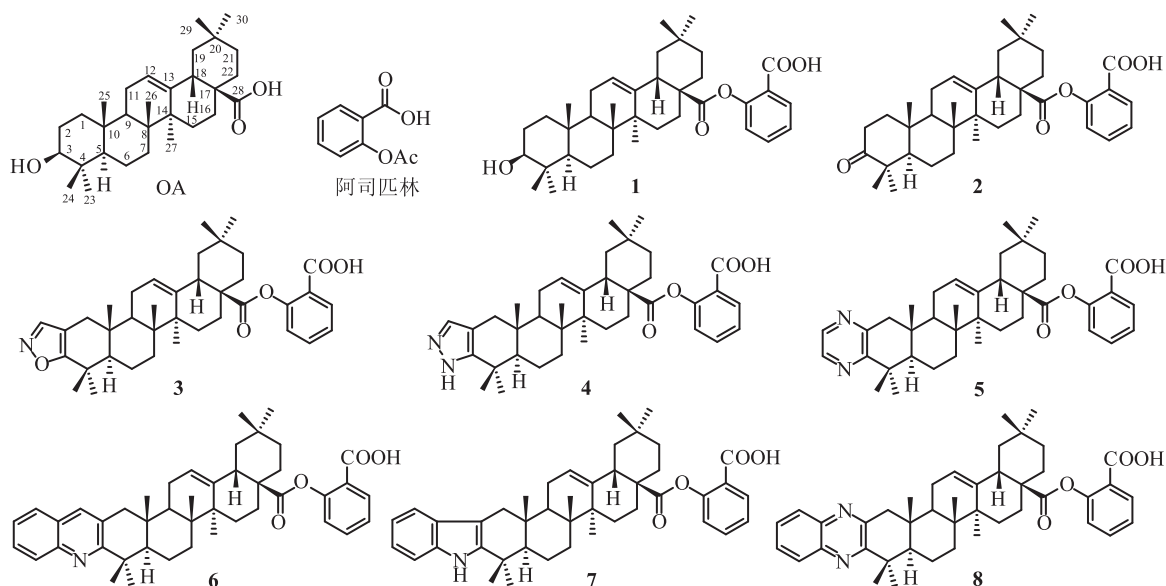


图 1 齐墩果酸、阿司匹林及齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物的化学结构

Fig.1 Structures of oleanolic acid, aspirin, and oleanolic acid-aspirin conjugates

**1.3 仪器** Agilent1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);BP211D 型电子天平(北京和悦达科技有限公司,感量:0.01 mg);BB16/BB5060 仪器二氧化碳(CO<sub>2</sub>)培养箱(上海力创科学仪器有限公司);超净工作台(北京半导体设备一厂);ELx800 通用酶标仪(美国 BioTek 公司);IX70-81FZ 倒置显微镜(Olympus 公司)。

**1.4 体外肠源性血清素合成抑制测定** 取对数生长期的 RBL-2H3 细胞株,悬浮于 DMEM 中,铺至 48 孔细胞培养板,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后加入不同浓度的测试药物,终浓度分别为 2.5, 5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>,对照组仅加入溶剂 DMSO (1 μL·mL<sup>-1</sup> 培养液),培养 48 h 后弃去培养液,并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,然后每孔加入 RIPA 强裂解液 100 μL 裂解细胞,再加入 PBS 200 μL 稀释,离心后直接用 HPLC 法测定 5-HT 的峰面积,并计算出药物对 5-HT 生物合成的抑制率。抑制率(%) = (1 - 测试化合物峰面积/对照组峰面积) × 100%。

**1.5 体外细胞毒性测定** 取对数生长期 RBL-2H3 细胞株悬浮于 DMEM 培养液中,铺至 96 孔板。待细胞完全贴壁后,弃去原培养液,加入含有测试药物的培养液 100 μL,终浓度分别为 2.5, 5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育 48 h 后,每孔加入 5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT30 μL,继续孵育 4 h,然后每孔加入 DMSO 100 μL 溶解。使用酶标仪在 570 nm 波长处测定每孔吸光度(A)值。

**1.6 缀合物对 TPH-1 蛋白量的影响** 取对数生长期的 RBL-2H3 细胞株悬浮于 DMEM 培养液中,铺至 24 孔板,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后,加入测试药物,终浓度分别为 2.5, 5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>,对照组仅加入溶剂 DMSO (1 μL·mL<sup>-1</sup> 培养液),培养 48 h 后弃去培养液,并用 PBS 洗涤,然后将细胞反复的冻融,收集裂解液用 TPH-1 的 ELISA 试剂盒测试在 450 nm 波长处每孔 A 值,并用标准曲线定量,  $Y = 0.0021X + 0.2534$ ,  $R^2 = 0.9956$ , 纵坐标(Y)为 A 值,横坐标(X)为 TPH-1 蛋白浓度(pg·mL<sup>-1</sup>),从而确定缀合物对 TPH-1 蛋白量的影响。

**1.7 缀合物对 TPH-1 基因表达的影响**

**1.7.1 总 RNA 的提取** 取对数生长期的 RBL-2H3 细胞株悬浮于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中,铺至

6 孔细胞培养板中。待细胞完全贴壁后,加入不同浓度测试药物 3 (对照组不加药物),培养 2 d 后弃去原培养液,每孔加入 Trizol 试剂 1 mL,吹打细胞,使细胞充分裂解;随后加入三氯甲烷 0.2 mL,室温静置 5 min 后离心 15 min,将上层水相移置另一个 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,并加入预冷的异丙醇 0.5 mL 沉淀 RNA,离心后弃上清液,加入 75% 乙醇(含 0.1% DEPC,纯化水现配现用) 1 mL,用移液器吹打乙醇,洗涤 RNA 沉淀,离心后弃上清液,将离心管倒置,室温晾 10 min 后加入 DEPC 水 80 μL 溶解 RNA。使用紫外分光光度计检测 RNA 浓度值,计算  $A_{260}/A_{280}$  值, -80 ℃ 冰箱保存。

**1.7.2 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)** 先登录 GenBank database 和文献查寻 TPH-1 基因序列<sup>[17]</sup>,并确定所用引物序列为 5'-GAAGACGTGGGGAGT TGTGT-3', 5'-ACAGTGGAAAACACGGAAGG-3';接着以 RNA 为模板反转录出第一条 cDNA 链(5 × PrimeScript™ Buffer (for Real Time) 2 μL; PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 0.5 μL; Oligo dT Primer (50 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.5 μL; Random 6 mers (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL; Total RNA 500 ng; 补加 Rnase Free 蒸馏水至 10 μL。设定程序为 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 4 ℃ 5 min);随后以 cDNA 为模板进行 Real-Time PCR (SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL; PCR Forward Primer (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 0.8 μL; ROX Reference Dye (50 ×) 0.4 μL; DNA 模板 2 μL; 重蒸水 6 μL,设定程序为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 进行 40 个循环, 95 ℃ 20 s, 60 ℃ 60 s, 95 ℃ 15 s)。

**1.8 体内抑制血清素合成测定** 构建去势大鼠骨质疏松症(osteoporosis in ovariectomized rats, OVX)模型。将雌鼠分为给药组(剂量为 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、模型对照组、甲状腺激素组和假手术组,每组 5 只。在摘除卵巢造模术后第 4 天开始给药,甲状腺激素组腹腔注射甲状腺激素 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续给药 35 d 后经颈动脉取血。将血液在 37 ℃ 下静置 45 min 后得到血清,用 HPLC 法测定血清素含量,并用标准曲线定量。  $Y = 0.5957X + 2.0657$ ,  $R^2 = 0.9942$ , Y 为 A 值, X 为 5-HT 浓度(ng·mL<sup>-1</sup>)。

**1.9 促进骨细胞增殖** 无菌条件下将 25 只出生 2 ~ 3 d 乳小鼠处死,取出其头盖并刮去软组织,PBS 清洗,剪碎后转移到培养瓶中,用混合酶(0.25% 胰酶 + 0.1% II 型胶原酶 = 1:1),37 ℃ 消化 15 min,弃去上清液;再用 0.1% II 型胶原酶消化 4 次,合并上清液并用

收稿日期 2016-11-05 修回日期 2017-01-16

作者简介 吉璐宏(1979-),男,湖北宜昌人,主治医师,硕士,研究方向:四肢骨与关节复杂创伤的研究。电话:0728-3220129,E-mail:hc7598@126.com。

培养液终止消化,将上清液用孔径0.075 mm(200 目)滤网滤过,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min 收集细胞,将收集的细胞接种到培养瓶中培养 4 d,洗去未贴壁的细胞,剩下细胞即为成骨细胞;取对数生长期成骨细胞悬浮 α-MEM 培养液中,铺至 96 孔板。待细胞完全贴壁后,弃去原培养液,加入浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>测试药物,对照组仅加入溶剂 DMSO (1 μL·mL<sup>-1</sup>培养液),置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,培养 12 h 后弃去培养液,每孔加入5 mg·mL<sup>-1</sup> MTT 30 μL,继续孵育 4 h,然后每孔加入 DMSO 100 μL 溶解。使用酶标仪在 570 nm 波长测定每孔 A 值。

**1.10 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 版统计软件进行分析,进行各组数据的正态性检验,对符合正态性分布的数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间均数进行 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 体外抑制 5-HT 合成** 5-HT 主要由 TPH-1 合成,因此,5-HT 的水平变化反映 TPH-1 活性。通过应用高表达 TPH-1 的 RBL-2H3 细胞株来检测缀合物对 5-HT 生物合成的抑制率,并以对 TPH-1 有较好抑制剂活性的药物 LP533401 为阳性对照,结果见表 1。采用 MTT 法测定各组药物对 RBL-2H3 细胞的毒性情况。结果见表 2。结果显示,各种药物对 5-HT 生物合成的抑制呈浓度依赖性,在浓度 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时抑制活性最大。缀合物 7 对 5-HT 的生物合成抑制活性最强。

表 1 各种药物对 5-HT 生物合成的抑制率

Tab. 1 Inhibitory effects of the test drugs on 5-HT biosynthesis

化合物	2.5 μmol·L <sup>-1</sup>	5 μmol·L <sup>-1</sup>	10 μmol·L <sup>-1</sup>
对照组	0.00 ± 0.03	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.04
OA 组	3.70 ± 0.12	5.50 ± 0.47	7.10 ± 1.12
阿司匹林	1.90 ± 0.29	3.10 ± 0.55	4.50 ± 0.86
OA + 阿司匹林 (1:1)	4.40 ± 0.37	7.90 ± 0.93	8.40 ± 1.11
LP533401	32.80 ± 2.52	55.30 ± 3.43	84.60 ± 2.73
缀合物 1	31.70 ± 1.75	58.20 ± 2.09	87.20 ± 3.53
缀合物 2	20.40 ± 1.89	33.80 ± 1.67	42.80 ± 2.55
缀合物 3	29.50 ± 2.11	48.60 ± 3.43	81.10 ± 2.81
缀合物 4	27.20 ± 1.35	43.40 ± 2.88	76.90 ± 3.56
缀合物 5	35.30 ± 2.76	59.90 ± 3.54	88.20 ± 4.09
缀合物 6	39.80 ± 1.94	63.30 ± 2.61	91.60 ± 3.74
缀合物 7	41.70 ± 2.08	66.20 ± 3.47	92.50 ± 4.57
缀合物 8	37.60 ± 2.99	60.70 ± 2.72	89.30 ± 2.28

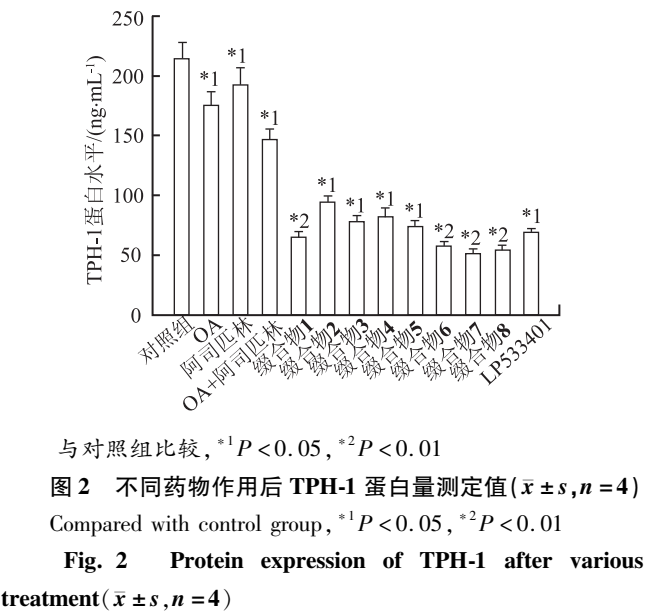
表 2 各种药物对 RBL-2H3 细胞的毒性

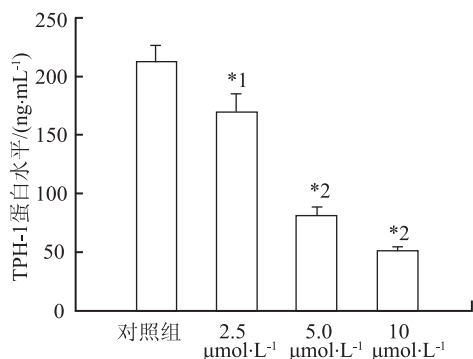
Tab. 2 Toxicity of the tested drugs on RBL-2H3 cells

化合物	2.5 μmol·L <sup>-1</sup>	5 μmol·L <sup>-1</sup>	10 μmol·L <sup>-1</sup>
对照组	0.0 ± 0.03	0.0 ± 0.04	0.0 ± 0.02
OA 组	1.4 ± 0.17	3.2 ± 0.61	5.2 ± 0.78
阿司匹林	1.1 ± 0.09	2.4 ± 0.27	4.2 ± 0.45
OA + 阿司匹林 (1:1)	1.3 ± 0.15	2.8 ± 0.22	4.6 ± 0.69
LP533401	4.8 ± 1.81	5.5 ± 1.57	6.2 ± 1.28
缀合物 1	2.8 ± 1.07	3.5 ± 0.44	4.2 ± 0.51
缀合物 2	2.1 ± 0.83	3.9 ± 0.97	5.1 ± 1.42
缀合物 3	0.9 ± 0.15	2.6 ± 0.53	3.8 ± 0.84
缀合物 4	3.2 ± 1.08	3.7 ± 1.25	4.3 ± 0.96
缀合物 5	3.5 ± 0.96	4.1 ± 0.68	5.6 ± 1.21
缀合物 6	2.7 ± 0.91	3.4 ± 0.77	4.7 ± 0.68
缀合物 7	1.8 ± 0.12	2.6 ± 0.39	3.3 ± 0.72
缀合物 8	3.4 ± 1.04	4.2 ± 0.84	5.5 ± 0.96

**2.2 缀合物对 TPH-1 蛋白量的影响** 检测各种药物在浓度 10 μmol·L<sup>-1</sup> 时对 TPH-1 蛋白量的影响,结果见图 2。与对照组比较,各组 TPH-1 蛋白量显著降低 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。其中缀合物 7 作用最强。进一步考察 2.5, 5.0, 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 缀合物 7 对 TPH-1 蛋白量影响,结果见图 3。图 3 可见,缀合物 7 对 TPH-1 蛋白量的表达有浓度依赖性,浓度为 10.0 μmol·L<sup>-1</sup> 时作用最强。

**2.3 缀合物 7 对 TPH-1 mRNA 表达的影响** 结果见图 4。



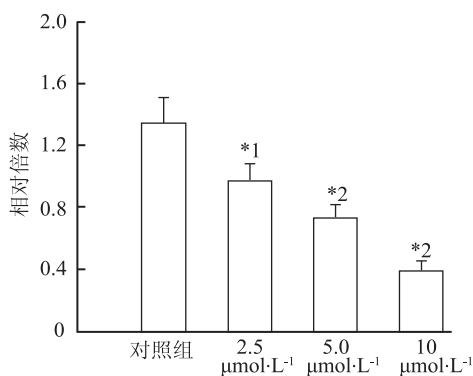


与对照组比较, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

图3 不同浓度缀合物7对TPH-1蛋白量的影响( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

Compared with control group, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

Fig. 3 Effect of conjugate 7 at different concentration on the protein expression of TPH-1 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)



与对照组比较, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

图4 不同浓度缀合物7对TPH-1 mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

Compared with control group, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

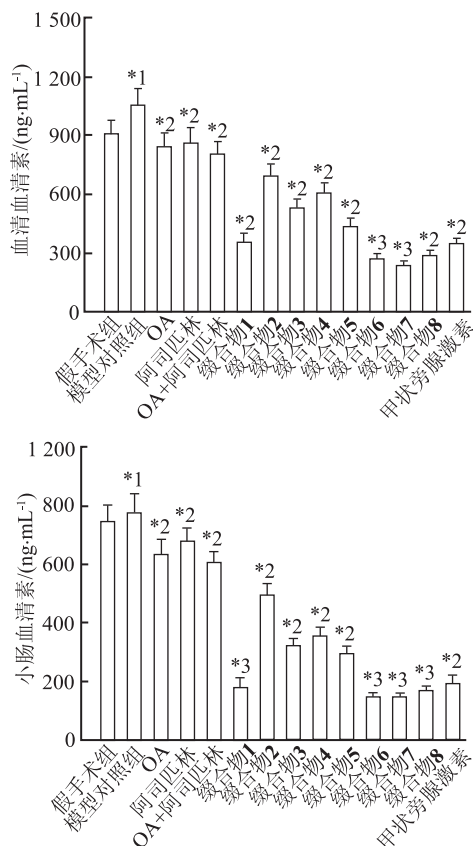
Fig. 4 Effect of conjugate 7 at different concentration on the mRNA expression of TPH-1 ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

2.4 缀合物对OVX大鼠血清和肠中血清素合成的影响 结果见图5。

2.5 齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物促进成骨细胞增殖 通过MTT法探讨齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物的促成骨细胞增殖的活性,结果见图6。

### 3 讨论

本研究结果显示,这些齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对血清素均有抑制作用,强于先导化合物OA和阿司匹林;与物理混合组相比,化学合成的缀合物对5-HT合成有更强抑制作用。但缀合物之间对5-HT合成的抑制作用差异有统计学意义,其中异噁唑、吡唑和吡嗪类齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物(缀合物3, 4, 5)抑制5-HT合成的活性低于缀合物1和阳性药物LP533401,而喹啉、吡啶和喹啉类齐墩果酸衍生物-

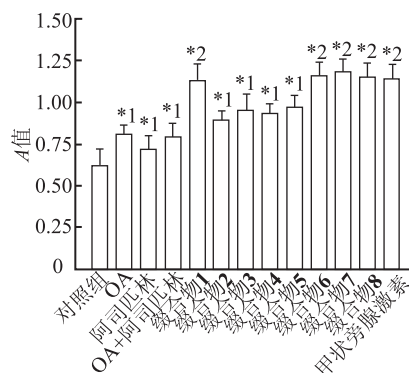


与假手术组比较, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05; 与模型对照组比较, \*<sup>2</sup>*P* < 0.05, \*<sup>3</sup>*P* < 0.01

图5 不同药物作用后大鼠血清和小肠血清素水平( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

Compared with sham operation group, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05; Compared with model control group, \*<sup>2</sup>*P* < 0.05, \*<sup>3</sup>*P* < 0.01

Fig. 5 Serotonin level in serum and intestine of rats after various treatment ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)



与对照组比较, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

图6 齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物促进成骨细胞增殖效果( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

Compared with control group, \*<sup>1</sup>*P* < 0.05, \*<sup>2</sup>*P* < 0.01

Fig. 6 Effects of oleanolic acid-aspirin conjugates on osteoblast proliferation ( $\bar{x} \pm s$ , *n* = 4)

阿司匹林缀合物(缀合物**6,7,8**)抑制血清素合成活性要强于缀合物**1**和阳性药物 LP533401,尤其是缀合物**7**在  $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  对血清素的抑制作用最强,分别是齐墩果酸和阿司匹林的 13 和 20 倍,这些结果说明苯并杂环类齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物能提高母体化合物抑制血清素合成的活性。进一步研究发现,这些齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物对 RBL-2H3 细胞株基本没有毒性。这说明缀合物对血清素合成的抑制活性不是其细胞毒性,而是其对 TPH-1 的抑制活性,并能明显抑制 TPH-1 蛋白含量及其 mRNA 表达,其中缀合物**7**也展现出最强的活性,强于阳性药物 LP533401,并呈浓度依赖性。在动物水平上,与空白对照组比较,骨质疏松模型组大鼠血清和小肠中血清素水平明显增高,大鼠给予缀合物后血清素水平却明显降低,其抑制血清素的作用也强于齐墩果酸、阿司匹林和齐墩果酸与阿司匹林混合物。这些结果说明缀合物在动物体内也能够抑制血清素的合成。缀合物能显著促进成骨细胞增殖,尤其是缀合物**7**促成骨细胞增殖活性最强。

综上所述,TPH-1 是治疗骨质疏松症的一个重要靶点,而齐墩果酸衍生物-阿司匹林缀合物能够抑制 TPH-1,从而抑制血清素合成,促进成骨细胞的增殖。这为今后开发新型、高效、低毒的齐墩果酸类抗骨质疏松药物提供新的思路。

#### 参考文献

- [1] LIU J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid [J]. J Ethnopharmacol, 1995, 49(2): 57–68.
- [2] 王立新, 韩广轩, 刘文庸, 等. 齐墩果酸的化学及药理研究[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(2): 104–107.
- [3] CAMELIO A M, CLAUSSEN K R, CLAUSSEN K R, et al. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(19): 4342–4346.
- [4] SOMMERWERK S, HELLER L, KUHFS J, et al. Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines [J]. Eur J Med Chem, 2016, 119: 1–16.
- [5] FAYCAL H, HICHEM B, JIHEN C, et al. Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds [J]. Comptes Rendus Chimie, 2003, 6(4): 473–483.
- [6] CHEN L, ZHANG Y, KONG X, et al. Design, synthesis, and antihepatocellular carcinoma activity of nitric oxide releasing derivatives of oleanolic acid [J]. J Med Chem,

2008, 51(15): 4834–4838.

- [7] NIE W, LUO J G, WANG X B, et al. Synthesis of new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on oleanolic acid incorporating cinnamic amides [J]. Chem Pharm Bull, 2011, 59(8): 1051–1056.
- [8] SAARINEN A, SAUKKONEN T, KIVELA T, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mutations and osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2010, 72(4): 481–488.
- [9] ROSEN C J. Serotonin rising – the bone, brain, bowel connection[J]. N Eng J Med, 2009, 360(10): 957–959.
- [10] YADAV V K, OYRY F, SUDA N, et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure [J]. Cell, 2009, 138(5): 976–989.
- [11] PLEINER-DUXEUNER J, ZWETTLER E, PASCHALIS E, et al. Treatment of osteoporosis with parathyroid hormone and teriparatide [J]. Calcif Tissue Int, 2009, 84(3): 159–170.
- [12] 张玲娣, 陆帅, 金萍, 等. 阿司匹林与其他非甾体抗炎药相互作用[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 219–221.
- [13] PARTIGNAN P, PATRONO C. Aspirin and cancer [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(9): 967–976.
- [14] 陈志文, 吴子祥, 桑宏勋, 等. 阿司匹林治疗大鼠绝经后骨质疏松的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(13): 925–929.
- [15] 王建超, 颜强, 桑宏勋, 等. 阿司匹林预防去卵巢大鼠骨量丢失[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2012, 5(2): 111–118.
- [16] CHADALAPAKA G, JUTOORU I, STEFANACB A M, et al. Structure-dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2-substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(8): 2633–2639.
- [17] BA K K, ZHUO Y, CHEN F L, et al. Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as potent cytotoxic agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(7): 2488–2493.
- [18] TU H Y, HUANG A M, WI B L, et al. Ursolic acid derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis in NTUB1 cells associated with reactive oxygen species [J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(20): 7265–7274.
- [19] 温小安, 张迎霞, 柳军, 等. 杂环并五环三萜化合物的合成及糖原磷酸化酶抑制活性 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(6): 491–496.