

泽漆的化学成分及其抗肿瘤转移活性研究

姚学军, 孟素蕊, 王 喆

天津医科大学第二医院, 天津 300211

摘要: 目的 研究泽漆石油醚、醋酸乙酯部位的化学成分及其抗肿瘤转移活性。方法 泽漆全草采用 50%丙酮提取、系统溶剂萃取, 综合运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、HPLC 制备色谱等方法分离纯化泽漆石油醚、醋酸乙酯部位的化学成分; 采用根据理化性质和波谱分析方法鉴定其结构; 通过 MTT 实验筛选出非细胞毒性的化学成分, 进一步通过划痕实验来评价酚酸类化合物抗肿瘤转移的活性。结果 从泽漆石油醚、醋酸乙酯部位分离鉴定了 8 个化合物, 分别鉴定为没食子酸 (1)、咖啡酸 (2)、间苯二酚 (3)、连苯三酚 (4)、没食子酸甲酯 (5)、没食子酸乙酯 (6)、杨梅素 (7)、槲皮素 (8)。抗肿瘤转移活性筛选结果表明, 化合物 1、5、6 均能剂量相关性提高抗肿瘤转移活性, 其 IC₅₀ 分别为 0.475、4.568、4.612 μmol/L。结论 化合物 1、5、6 显示出较好的抗肿瘤细胞转移活性, 其中化合物 1 的作用最为显著。

关键词: 泽漆; 没食子酸; 没食子酸甲酯; 没食子酸乙酯; 抗肿瘤转移

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)06-0826-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.06.003

Chemical constituents in *Euphorbia helioscopia* and their antitumor metastatic activities

YAO Xue-jun, MENG Su-rui, WANG Zhe

The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents in petroleum ether and ethyl acetate extracting fraction from *Euphorbia helioscopia*. and their antitumor metastatic activities. **Methods** *E. helioscopia* was extracted with 50% acetone and systematic solvent. The chemical constituents were isolated by chromatography on silica gel column, ODS column, and preparative HPLC; their structures were identified by physicochemical constants and spectroscopic methods. The non-cytotoxic concentration of compounds was tested by MTT assay. Wound healing assay was used to evaluate the antitumor metastatic activity of phenolic acids. **Results** Eight compounds were isolated from the petroleum ether and ethyl acetate extracting fraction of *E. helioscopia* and their structures were identified as gallic acid (1), caffeic acid (2), resorcinol (3), pyrogallol (4), methyl gallate (5), ethyl gallate (6), myricetin (7), and quercetin (8). The antitumor metastatic activity screening results showed that compound 1, 5, 6 could increase the antitumor metastatic activity in a dose-dependent manner, and their IC₅₀ values were 0.475, 4.568, and 4.612 μmol/L. **Conclusion** Compound 1, 5, and 6 show better antitumor metastatic activity. Compound 1 exhibits the most significant antitumor metastatic activity.

Key words: *Euphorbia helioscopia* L.; gallic acid; methyl gallate; ethyl gallate; antitumor metastasis

泽漆是大戟科大戟属植物泽漆 *Euphorbia helioscopia* L. 的干燥全草, 别名猫儿眼睛草、五风灵芝等, 分布于除新疆、西藏以外的全国各地。泽漆作为民间草药, 味苦, 性微寒, 有毒, 归肺、小肠、大肠经。据《本草纲目》记载, 泽漆具有消肿、消炎退热、散结杀虫等功效^[1-2]。临床用于治疗腹水、水肿、肺结核、颈淋巴结结核、痰多喘咳、癬疮, 民间还用于治疗宫颈癌、食道癌等, 因此泽漆是一味很有研究开发价值的药材^[3]。本实验综合运用各种

色谱法分离纯化泽漆中的化学成分, 并鉴定了 8 个化合物, 包括酚酸类和黄酮醇类化合物, 分别为没食子酸 (1)、咖啡酸 (2)、间苯二酚 (3)、连苯三酚 (4)、没食子酸甲酯 (5)、没食子酸乙酯 (6)、杨梅素 (7)、槲皮素 (8)。此外, 本实验对分离得到的酚酸类化合物进行了抗肿瘤转移活性的筛选, 结果显示化合物 1 具有较强的抗肿瘤转移活性。

1 仪器与材料

Bruker AV-400 核磁共振仪、Bruker Esquire—

收稿日期: 2013-09-24

作者简介: 姚学军 (1984—), 女, 药师, 本科, 从事药房工作。Tel: 15900292515 E-mail: 15900292515@163.com

3000 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 半制备高效液相色谱仪 (日本分光公司), 泵 PU-2089, 检测器 RI-2031、UV-2075; YMC-Pack ODS-A SH-343-5 色谱柱 (250 mm×20 mm, 5 μm)、A sahipak GS-20GH200142、H200143 色谱柱 (500 mm×20 mm, 5 μm) 均购自上海汉尧仪器设备有限公司; UV-3310 型紫外可见分光光度计 (日本 Hitachi 公司); 柱色谱硅胶 (100~200 目)、薄层色谱硅胶均购自青岛海洋化工厂; DFZ-3 型真空干燥器 (上海医用恒温设备厂); 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 (Heal Force 公司); 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 全自动酶标板分析仪 (Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 (Olympus 公司); 96 孔酶标板、6 孔酶标板 (Nest 公司)。

所用试剂均为分析纯; 氘代试剂 (Aldrich 公司); 含酚红或不含酚红 RPMI-1640 培养液 (北京四环科技公司, 500 mL, 批号 NYG0910); 胎牛血清 (BI 公司, 500 mL, 批号 715967), PBS (HyClone); LY294002 (上海荣盛生物药业有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) (Sigma); 25% 胰蛋白酶-EDTA (Bioind, 500 mL, 批号 1244616); 二甲基亚砜 (Sigma); 肺癌 A549 细胞 (中科院上海细胞库)。

泽漆, 2010 年 7 月采自甘肃, 由兰州大学生命科学院及甘肃省食品药品检验所共同鉴定为泽漆 *Euphorbia helioscopia* L. 的全草, 标本 (D20100721) 存放于天津医科大学第二医院药剂科中药房。

2 提取与分离

取自然干燥的泽漆全草 8 kg, 粉碎后用 50% 丙酮加热回流提取 3 次, 每次 6 h。提取液减压浓缩, 得浸膏 620 g, 浸膏加水混悬后, 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 得石油醚提取物 382 g、醋酸乙酯提取物 105 g、正丁醇提取物 93 g。石油醚部分经硅胶 (6 kg) 柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (50:1~1:3) 梯度洗脱, 通过 TLC 合并类似组分, 共得到 10 个组分 Fr.1~10。Fr.4 经过硅胶柱色谱石油醚-醋酸乙酯 (10:1~1:3) 梯度洗脱及制备高效液相色谱甲醇-水 (8:2) 纯化得到化合物 2 (332 mg), Fr.5 经凝胶渗透色谱二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱、制备高效液相色谱甲醇-水 (8:2)、制备薄层色谱二氯甲烷-甲醇 (95:5) 纯化, 分别得到化合物 1 (52.6 mg)、3 (102 mg)、4 (78 mg)。醋酸乙酯部分经硅胶 (1.8 kg) 柱色谱分离, 以石油醚-醋酸乙酯 (4:1~1:2)、醋酸乙酯-甲醇 (20:1~

5:1) 梯度洗脱, 通过 TLC 合并类似组分, 共得到 17 个组分 Fr.1~17。Fr.5 经硅胶柱色谱石油醚-醋酸乙酯 (3:1~1:3)、醋酸乙酯-甲醇 (10:1~5:1) 梯度洗脱、制备高效液相色谱甲醇-水 (7:3) 纯化得到化合物 5 (27 mg)、6 (21 mg); Fr.15 经凝胶渗透色谱二氯甲烷-甲醇 (1:1) 洗脱、制备高效液相色谱甲醇-水 (7:3)、制备薄层色谱二氯甲烷-甲醇 (93:7) 纯化, 得到化合物 7 (51 mg)、8 (77 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色针状结晶 (甲醇), 分子式为 C₇H₆O₅, mp 235~240 °C。ESI-MS *m/z*: 169.0 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.05 (2H, s, H-2、6), 8.89 (1H, s, OH-4), 9.22 (2H, s, OH-3、5), 12.25 (1H, br s, COOH); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 122.1 (C-1), 110.5 (C-2), 146.2 (C-3), 139.5 (C-4), 146.2 (C-5), 110.5 (C-6), 170.3 (C=O)。以上光谱数据与文献报道^[4]基本一致, 因此鉴定化合物 1 为没食子酸。

化合物 2: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 C₉H₈O₄, mp 194~198 °C。ESI-MS *m/z*: 179.1 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.48 (1H, d, *J*=16 Hz, H-7), 7.00 (1H, dd, *J*=3.0、8.0 Hz, H-2), 6.92 (1H, dd, *J*=3.0、9.0 Hz, H-6), 6.75 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-5), 6.15 (1H, d, *J*=16 Hz, H-8); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 128.0 (C-1), 115.0 (C-2), 146.8 (C-3), 149.2 (C-4), 116.5 (C-5), 122.7 (C-6), 147.0 (C-7), 115.8 (C-8), 171.1 (C-9)。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 因此鉴定化合物 2 为咖啡酸。

化合物 3: 白色结晶 (甲醇), 分子式为 C₆H₆O₂, mp 110~113 °C。ESI-MS *m/z*: 109 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.97 (1H, m), 6.28 (1H, d, *J*=2.3 Hz), 6.26 (2H, brs); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 104.5 (C-2), 159.7 (C-1、3), 105.4 ((C-4、7), 130.2 (C-5)。上述数据与文献报道^[6]基本一致, 因此鉴定化合物 3 为间苯二酚。

化合物 4: 白色针状结晶 (甲醇、氯仿、丙酮), 分子式为 C₆H₆O₃, mp 238~240 °C。ESI-MS *m/z*: 125.1 [M-H]⁻; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 6.50 (1H, t, *J*=8.1 Hz), 6.30 (2H, d, *J*=8.1 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 147.0 (C-1), 134.1 (C-2), 147.0 (C-3), 108.2 (C-4), 120.2 (C-5),

108.2 (C-6)。上述数据与文献报道^[7]基本一致,因此鉴定化合物 **4** 为连苯三酚。

化合物 **5**: 类白色粉末 (甲醇、丙酮), 分子式为 $C_8H_8O_5$, mp 197~220 °C。ESI-MS m/z : 183 $[M-H]^-$; 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 6.92 (2H, s, H-2, 6), 1.27 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3), 4.18 (2H, q, $J=7.0$ Hz, CH_2); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 121.1 (C-1), 108.2 (C-2), 146.1 (C-3), 139.7 (C-4), 146.1 (C-5), 108.2 (C-6), 169.1 (C-7), 52.1 (OCH₃)。上述数据与文献报道^[8]基本一致,因此鉴定化合物 **5** 为没食子酸甲酯。

化合物 **6**: 白色针状结晶 (MeOH), $C_9H_{10}O_5$, mp 201~203 °C。ESI-MS m/z : 197 $[M-H]^-$; 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.01 (2H, s, Ar-H), 4.30 (2H, q, $J=7.0$ Hz, OCH₂), 1.35 (3H, t, $J=7.0$ Hz, CH_3); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 122.0 (C-1), 110.1 (C-2), 146.3 (C-3), 139.7 (C-4), 146.6 (C-5), 110.1 (C-6) 168.4 (C=O), 61.8 (OCH₂), 14.7 (CH_3)。上述数据与文献报道^[9]基本一致,因此鉴定化合物 **6** 为没食子酸乙酯。

化合物 **7**: 黄绿色粉末 ($CHCl_3$ - MeOH), 分子式为 $C_{15}H_{10}O_8$, mp 324~326 °C。ESI-MS m/z : 317.2 $[M-H]^-$; 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (2H, s, H-2, 6'), 6.41 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 6.18 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 146.7 (C-2), 135.6 (C-3), 175.7 (C-4), 160.5 (C-5), 98.0 (C-6), 163.7 (C-7), 93.2 (C-8), 156.0 (C-9), 102.7 (C-10), 120.7 (C-1'), 107.0 (C-2'), 145.5 (C-3'), 135.8 (C-4'), 145.5 (C-5'), 107.0 (C-6')。上述数据与文献报道^[10]数据基本一致,因此鉴定化合物 **7** 为杨梅素。

化合物 **8**: 黄色针晶 (甲醇), $C_{15}H_{10}O_7$, mp 314~316 °C。ESI-MS m/z : 301.2 $[M-H]^-$; 1H -NMR (500 MHz, C_5D_5N) δ : 8.61 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-2'), 8.11 (1H, dd, $J=8.5$ 、2.5 Hz, H-6'), 7.38 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.75 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-8), 6.71 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR (125 MHz, C_5D_5N) δ : 150.5 (C-2), 138.1 (C-3), 177.4 (C-4), 157.8 (C-5), 99.5 (C-6), 165.8 (C-7), 4.6 (C-8), 162.7 (C-9), 104.8 (C-10), 124.0 (C-1'), 117.0 (C-2'), 148.0 (C-3'), 147.5 (C-4'), 117.0 (C-5), 121.3 (C-6')。上述数据与文献报道^[11]基本一致,因此鉴定化合物 **8** 为槲皮素。

4 抗肿瘤转移活性筛选实验

4.1 MTT 实验

将非小细胞肺癌细胞 A549 用 0.25% 胰酶消化, 吸出胰酶后, 用含 10% 胎牛血清培养液终止消化, 混匀细胞悬液, 计数, 调节细胞密度为 1×10^4 /mL。将调好的细胞悬液加于 96 孔板中, 每孔 180 μ L, 置于 37 °C、5% CO_2 的孵箱内培养 24 h, 加药, 每个浓度 (25、50 μ mol/L) 加 5 个复孔, 继续置于 37 °C、5% CO_2 的孵箱内培养 48 h。之后每孔加 15 μ L MTT (5 mg/mL), 继续置于 37 °C、5% CO_2 的孵箱内培养 4 h, 取出 96 板, 将上清液吸出, 每孔加 100 μ L 的 DMSO, 用酶标仪在 490 nm 波长下测量吸光度 (A) 值, 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - A_{\text{加药组}} / A_{\text{空白组}}$$

本实验选取非小细胞肺癌细胞 A549 为测定的肿瘤细胞系, 测定 8 个化合物对 A549 细胞增殖的影响。化合物 **2~4** 对 A549 细胞的增殖具有剂量相关性地抑制作用, 而化合物 **1、5~8** 在 25、50 μ mol/L 下对 A549 并没有显示出细胞毒作用。见表 1。

表 1 8 个化合物对 A549 的细胞毒作用 ($n=3$)

Table 1 Cytotoxicity effect on eight compounds on A549 cells ($n=3$)

浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%							
	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6	化合物 7	化合物 8
25	-2.7	53.7	58.1	50.5	2.1	2.3	-2.1	-1.5
50	4.0	78.6	84.8	81.2	3.3	3.8	1.1	5.1

4.2 划痕实验

划痕实验 (又称伤口愈合实验) 是检测细胞转移的一种方法。在没有诱化因子浓度梯度的情况下, 细胞可以感受到伤口, 并通过重组微管组织中心沿

垂直于伤口划痕的方向运动。收集对数生长期的细胞, 均匀接种于六孔板中; 待细胞长至完全融合后, 用 10 μ L 无菌枪头在每孔单层细胞中央轻轻地划一道伤痕, 沿划痕边缘等距离间隔做上标记, 以便检

测; PBS 冲洗, 换液后分别用 0.02、0.1、0.5、2.5、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的化合物处理 24 h; 然后用倒置显微镜观察划痕的愈合程度并拍照, 计算越过划痕边界的细胞数, 并与对照组越过划痕的细胞数相比计算百分率, 以此反映细胞的平面转移能力。

为了进一步确定各化合物是否具有抗肿瘤转移活性, 本实验利用肺癌 A549 细胞为体外模型, 采

用划痕实验, 测定化合物 1、5~8 在非细胞毒剂量下对非小细胞肺癌 A549 细胞转移的影响。结果显示化合物 1、5~6 及阳性对照药 LY294002 的 IC_{50} 分别为 0.475、4.568、4.612、1.215 $\mu\text{mol/L}$, 而化合物 7、8 均不显示任何抑制肿瘤转移的活性。化合物 1 与阳性对照药 LY294002 相比能够更强地抑制 A549 细胞的转移。见表 2。

表 2 化合物 1、5、6 对 A549 细胞的迁移抑制率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Inhibitory rates of compounds 1, 5 and 6 on migration of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%			
	化合物 1	化合物 5	化合物 6	LY294002 (对照)
空白	0.0 \pm 0.023	0.0 \pm 0.023	0.0 \pm 0.023	0.0 \pm 0.023
0.02	4.3 \pm 0.026	0.7 \pm 0.028	0.6 \pm 0.019	0.9 \pm 0.018
0.1	21.5 \pm 0.017	12.6 \pm 0.021	15.3 \pm 0.027	19.6 \pm 0.020
0.5	55.8 \pm 0.031	41.6 \pm 0.018	38.2 \pm 0.024	50.4 \pm 0.027
2.5	57.3 \pm 0.028	48.4 \pm 0.029	46.5 \pm 0.021	54.1 \pm 0.021
12.5	79.8 \pm 0.033	69.5 \pm 0.024	67.3 \pm 0.030	73.6 \pm 0.028

5 讨论

本实验从泽漆石油醚和醋酸乙酯部位提取分离得到 8 个化合物。本实验选取非小细胞肺癌 A549 肿瘤细胞系, 测定 8 个化合物对 A549 细胞增殖的影响, 结果显示化合物 2~4 能够剂量相关性地抑制 A549 细胞的增殖。进一步采用划痕实验, 测定化合物 1、5~8 在非细胞毒剂量下对非小细胞肺癌 A549 细胞转移的影响, 结果显示化合物 1 与阳性对照药 LY294002 相比能够更强地抑制 A549 细胞的转移, 显示了明确的体外抗肿瘤转移作用。

现代药理研究表明泽漆的水提取液在体内外均有抗肿瘤的作用。此外, 肿瘤细胞的侵袭与转移是恶性肿瘤的基本特征之一, 尤其是在肿瘤发展的最后阶段, 控制肿瘤细胞的转移是控制癌症复发的重要途径。如何降低肿瘤细胞的侵袭能力, 阻止肿瘤细胞的扩散转移是目前癌症治疗的研究热点之一。本文利用划痕实验体外模拟肿瘤细胞的迁移能力, 利用该实验对从泽漆中分离得到的化合物进行筛选, 发现化合物 1 能够有效的抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的转移, 为泽漆的抗癌活性研究提供了新的实验依据。

参考文献

- [1] 杨 莉, 陈海霞, 高文远. 泽漆化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(4): 575-577.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 26-31.
- [3] 杨 莉, 陈海霞, 高文远. 泽漆化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1585-1589.
- [4] 阮汉利, 张勇慧, 皮慧芳, 等. 蛇菰的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(1): 74-75.
- [5] 李洪娟, 罗应刚, 何志恒, 等. 袋花忍冬的化学成分研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(2): 188-191.
- [6] 龚小见, 朱海燕, 杨小生, 等. 柳叶白前化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(B06): 50-51, 54.
- [7] 王永刚, 淡 墨, 李咏华, 等. 猴耳环化学成分的研究 [J]. 中药材, 2005, 28(9): 774-775.
- [8] 盛习锋, 罗 琼. 湖丹皮化学成分研究 [J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2006, 3(3): 39-40.
- [9] 黄文强, 施敏峰, 宋晓平, 等. 使君子化学成分研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(4): 79-82.
- [10] 钱景时, 张彬锋, 王 玮, 等. 冬青叶兔唇花化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 869-872.
- [11] 邓芳叶, 王国才, 王春华, 等. 理肺散化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 861-865.