

- retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(9): 3229-3232.
- [6] Yang S L, Liu Y L. Chemical constituents of *Glycyrrhiza inflata* Bat [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, 30(2): 176-182.
- [7] Tu P F, Tao J, Hu Y Q, et al. Flavones from the wood *Draena conchinchinensis* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2003, 1(1): 27-29.
- [8] Xuan C S, Zhao X H, Feng F S, et al. The study of chemical components of *Glycyrrhiza* in Shanxi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(2): 18-25.
- [9] Wu Z E, Lin H, Liang R Y. Separation and identification of the inoxidizable and anti-aspergillus flavus components from licorice [J]. *Food Sci* (食品科学), 1996, 17(4): 46-50.

粗吻海龙抗肿瘤活性部位研究

王梦月¹, 秦孙星¹, 张朝晖², 何云瑾¹, 李晓波^{1*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200030; 2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212001)

海龙为补益类名贵海洋中药, 具有温肾壮阳、散结消肿之功效。《中国药典》2005年版收载海龙为刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch)或尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体。我国海龙资源丰富, 除《中国药典》收载品种外, 同科的粗吻海龙 *Trachyrhamphus serratus* (Temminck et Schlegel)在我国分布广、产量大, 在辽宁、山东、广东、福建、海南等地, 为海龙的主流品种之一^[1]。前期研究证明粗吻海龙具性激素样作用, 其作用与尖海龙等《中国药典》收载的品种作用相当^[2]; 同时还首次发现粗吻海龙醇提物具有明显的抗肿瘤作用^[3]。为进一步研究粗吻海龙的抗肿瘤活性成分, 对粗吻海龙抗肿瘤的活性部位进行了筛选, 并对活性部位进行了GC-MS分析, 为海龙科药用动物的抗肿瘤新药开发提供依据。

1 实验部分

1.1 药品与试剂: 粗吻海龙药材 2003年11月购自海南省海口市, 经李晓波教授鉴定为粗吻海龙 *T. serratus* (Temminck et Schlegel)的干燥全体, 凭证标本保存于上海交通大学药学院中药基因组学实验室。RPMI 1640 购自 Gibco 公司; 四氮唑盐(MTT)、磺酰罗单明 B(SRB)、Tris、SDS 购自 Sigma 公司; 95%乙醇、石油醚、醋酸乙酯、异丁醇、三氯醋酸、乙酸均为国产分析纯。

1.2 主要仪器: Autosystem (XL) GC-MS(美国 Perkin Elmer 公司); Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Labsystems); CO₂ 培养箱(Thermo Forma)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);

DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 细胞株: 人白血病细胞株 HL-60、人肝癌细胞株 BEL-7402、人肺癌细胞株 A-549 和小鼠白血病细胞株 P388 均由中国科学院上海药物研究所提供。

1.4 样品的制备: 粗吻海龙粉末 200 g, 95%乙醇超声提取 2 h, 滤过, 低温回收溶剂至干, 得粗吻海龙提取物(A); 同时另取 200 g 粗吻海龙粉末, 水超声提取 2 h, 滤过, 所得滤液用醋酸乙酯反复萃取后, 低温收尽溶剂, 得粗吻海龙的不含脂溶性成分的提取物(B); -20℃储存。筛选到的活性组分 A 悬浮于水中, 分别用石油醚、醋酸乙酯萃取, 低温收尽溶剂得组分 A₁、组分 A₂, 萃余母液低温收干溶剂得组分 A₃。

1.5 活性测试: MTT 法^[4]检测组分对 HL-60、P388 肿瘤细胞的生长抑制作用; SRB 法^[4]检测组分对 BEL-7402、A-549 肿瘤细胞的生长抑制作用。

1.6 GC-MS 分析: 气相色谱条件: 色谱柱为 DB-5ht (30 mm×0.25 mm, 0.25 μm), 柱温为 80℃(1 min), 以 5℃/min 的程序升至 310℃, 进样室温度为 310℃, 不分流。载气为氦气(99.999%), 压力为 68.948×10³ Pa, 流量为 1.0 mL/min。质谱条件: 离子源温度为 200℃, 接口温度为 300℃, 质谱离子源为 EI 源, 电子能量为 70 eV, 扫描范围为 20~550 m/z。所得质谱图经计算机数据处理和 NIST-98 标准质谱图库检索分析各组分, 按峰面积归一化法计算化学成分的质量分数。

2 实验结果

2.1 不同提取物的抗肿瘤活性: 粗吻海龙的 95%

收稿日期: 2006-10-18

基金项目: 上海-SK 研究发展基金资助项目(2003012-t); 国家自然科学基金项目(30672620)

作者简介: 王梦月(1973-), 男, 汉族, 博士, 从事中药学研究。

* 通讯作者 李晓波(1963-), 女, 回族, 博士、教授、博士生导师。 Tel: (021)34204806 E-mail: xbli@sytu.edu.cn

乙醇提取物(A)和水提取物(B)对 HL-60 等 4 种肿瘤细胞株的作用结果显示,提取物 A 和 B 对肿瘤细胞均有一定的杀伤作用,但 A 活性更高,作用范围更广,且显示出一定的剂量依赖效应,因此初步确定粗吻海龙抗肿瘤的有效部位为 95%乙醇提取部分,用于进一步分离。

2.2 不同极性组分的抗肿瘤活性:对提取物 A 的不同极性组分 A₁、A₂、A₃ 进行抗肿瘤活性研究结果表明,组分 A₁、A₂ 均有明显活性,A₃ 无明显作用,其中组分 A₁ 对 BEL-7402 和 A-549 的抑制率更高,而 B 对 HL-60 的抑制更强,说明两部分均含有抗肿瘤活性成分,对不同肿瘤细胞有选择性抑制;BEL-7402 和 A-549 都是实体瘤细胞,HL-60 是悬浮细胞,提示粗吻海龙抗肿瘤活性成分可能包含多个化合物,并且具有不同的作用机制。

2.3 活性部位的 GC-MS 分析:运用 GC-MS 对抗肿瘤活性组分 A₁ 和 A₂ 进行化学成分分析,分别检出 89 个和 56 个成分(表 1、表 2)。可知 A₁ 和 A₂ 主

要成分均为脂肪酸、甾体类成分,但组分 A₁ 所含不饱和脂肪酸、甾体化合物的量明显高于 A₂;A₂ 高级脂肪酸及其酯的量较 A₁ 高。

3 讨论

本实验首次对海龙水溶性组分和脂溶性组分的抗肿瘤作用进行了比较研究,发现脂溶性组分(A)对 HL-60、BEL-7402、A549 细胞毒性远高于水溶性组分(B),而对 P388 的抑制作用两者相当,从而初步认为脂溶性小分子是粗吻海龙抗肿瘤主要的活性部位。为进一步追踪活性部位,对 95%醇提物(A)进行了分离,先后用石油醚、醋酸乙酯萃取其中的脂溶性成分,并对石油醚萃取物、醋酸乙酯萃取物、母液(主要是水溶性成分)的抗肿瘤作用进行了比较,结果发现石油醚萃取物、醋酸乙酯萃取物均有明显的抗肿瘤作用,而母液无效。进一步证明脂溶性小分子可能是粗吻海龙抗肿瘤作用的主要物质基础,当然也不排除水溶性大分子对其他细胞株也有一定的抗肿瘤活性,并有不同的作用机制,目前水溶

表 1 粗吻海龙抗肿瘤活性组分 A₁ GC-MS 分析结果

Table 1 GC-MS Analysis on anti-tumor active fraction A₁ of *T. serratus*

峰号	化合物名称	质量分 数/%	峰号	化合物名称	质量分 数/%	峰号	化合物名称	质量分 数/%
1	辛烷	0.013	32	1-十四醇	0.060	63	芥酸酰胺	0.026
2	1-甲基丙基-环己烷	0.026	33	十七烷	0.097 8	64	胆甾烷-4-甲基-8,24-二烯-3-醇	0.040 0
3	壬烷	0.302	34	棕榈酸甲酯	0.041 8	65	胆甾烷-5-烯-3-醇	11.51
4	3-甲基-辛烷	0.081	35	邻苯二酸	0.082 6	66	胆甾烷-5-烯-3-醇丙酯	0.057
5	3-二甲基-辛烷	0.191	36	11(E)-十六酸甲酯	5.104	67	胆甾烷-3,5-二烯-7-酮	0.294
6	2,3-二甲基-庚烷	0.055	37	十八酸	5.030	68	胆甾烷-4-烯-3-酮	0.065
7	4-甲基-2-丙基-戊醇	0.094	38	9(Z)-十八酸	6.245 6	69	24-丙烯基-胆甾烷-5-烯-3-醇	0.087
8	癸烷	0.192	39	十八烷	0.111	70	胆甾烷-3,5-二烯-3-酮	3.044
9	3-甲基-十一烷	0.062	40	十七酸	0.966	71	5,6-环氧-胆甾烷-3-醇	0.081
10	戊酸	0.080	41	十七酸甲酯	0.045 8	72	坎利酮	0.033
11	1-乙基-3-异丙基-苯	0.031	42	6-庚基-四氢-吡喃-2-酮	0.046 5	73	未鉴定	0.047
12	十一烷	0.060	43	十八酸乙酯	0.111	74	胆甾烷-3,7-二醇	0.106
13	2-乙基-己醇	0.049	44	油酸	7.494	75	胆甾醇乙酸酯	0.223
14	1-乙基丙基-4-甲基-苯	0.033	45	N,N-二甲基-十二酰胺	0.177 2	76	11,14,17-二十碳三烯酸甲酯	0.038
15	十二烷	0.039	46	十九烷	2.636	77	7-甲基-(Z)-十四烯-1-醇乙酸酯	0.077
16	十三烷	0.033	47	二十烷	0.034 3	78	6-甲基-十八烷	0.162
17	十四烷	0.030	48	十一醛	0.128	79	3-十九碳烯-1-醇乙酸酯	0.065
18	2-癸酮	0.029	49	花生四烯酸甲酯	2.371	80	未鉴定	0.492
19	2-甲基-壬烷	0.103	50	2(E)-十八烯-1-醇	1.154	81	十八酸甲酯	0.444
20	2-甲基-十一烷	0.075	51	9(Z)-油酸酰胺	0.358	82	三十二烷	0.035
21	亚油酸	3.045	52	十六酰胺	0.067 6	83	胆甾醇丁酸酯	0.109
22	十五烷	0.064	53	未鉴定	0.025 8	84	胆甾-5-烯-3-醇十四酸酯	0.040 3
23	十二酸	0.173	54	1-辛烯-3-醇	0.063	85	三十烷	0.038 4
24	2(E)-丁烯酸乙酯	0.088	55	1-柠檬烯-10-醇	0.019	86	2-甲基-十九烷	0.462
25	二十七烷	0.019	56	1(Z),4(Z),6(Z)-十九碳三烯	1.466	87	胆甾-5-烯-3-醇壬酸酯	0.034 6
26	十六烷	0.088	57	4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸甲酯	2.068	88	胆甾醇	8.036 6
27	2,7,10-三甲基-十二烷	0.039	58	角鲨烯	1.384	89	胆甾-5-烯-3-醇乙酸酯	0.180
28	十四酸	3.810	59	胆甾烷-4,6-二烯-3-醇	0.523	90	硬脂酸	1.377
29	未鉴定	0.096	60	胆甾烷-3,5-二烯	0.592	91	4-丙基-十七烷	0.054 2
30	棕榈酸(十六酸)	23.180	61	麦角甾烷-5,7-二烯-3-醇	0.039	92	十九酸甲酯	0.674
31	十三酸甲酯	0.041	62	二十四烷	0.026	93	亚麻酸	1.235

表2 粗吻海龙抗肿瘤活性组分 A₂ GC-MS 分析结果Table 2 GC-MS Analysis on anti-tumor active fraction A₂ of *T. serratus*

峰号	化合物名称	质量分 数/%	峰号	化合物名称	质量分 数/%	峰号	化合物名称	质量分 数/%
1	3-甲基-丁酸	0.484	21	4-酰胺吡啶	4.415	41	2-甲基-十一醛	0.065
2	2,3-丁二醇	5.246	22	4-壬醇	2.733	42	十八酸十八酯	1.094
3	戊酸	0.205	23	1-甲基-4-硝基-吡啶	0.347	43	3-烯-二十二酸	0.108
4	2-戊醇	0.642	24	4-甲基-5-癸醇	1.358	44	邻苯二酸二辛酯	0.281
5	4-甲基-环己酮	0.736	25	十四酸	2.758	45	2(E)-己烯醛	0.050
6	丁酸	1.529	26	棕榈酸乙酯	0.102	46	未鉴定	0.266
7	4-甲基-4-己烯-3-酮	0.415	27	棕榈酸	18.639	47	壬胺	0.285
8	2-甲基-2-丙烯酸乙酯	0.074	28	6-己基-四氢呋喃-2-酮	0.472	48	胆甾-4,6-二烯-3-醇	0.714
9	2,3,5-三甲基-己烷	0.532	29	邻苯二酸二丙酯	0.252	49	4-甲基-胆甾醇-8,24-二烯-3-醇	10.547
10	三乙酸甘油酯	0.300	30	油酸	6.118	50	4,7,10-三烯-十六酸甲酯	0.101
11	庚烷	0.154	31	十六酸乙酯	0.665	51	戊酰胺	0.086
12	未鉴定	0.606	32	十六酸	1.188	52	胆甾-4-烯-3-酮	0.375
13	2-乙基-己醇	0.882	33	十七酸	6.248	53	三十二烷	2.004
14	2-戊醇	0.197	34	11(E)-十六酸乙酯	0.306	54	二十六醇	0.462
15	苯乙酸	0.388	35	十四酸乙酯	0.431	55	十八酸甲酯	2.343
16	未鉴定	3.594	36	十二酰胺	0.323	56	十六酸十四酯	4.066
17	3-甲基-庚醇	0.205	37	十三酸	3.340	57	2-丙基-癸醇	0.584
18	3,5-二甲基-3-己醇	4.663	38	未鉴定	0.107	58	1-十九烯	1.165
19	癸烷	0.498	39	1(Z),4(Z),6(Z),9(Z)-十九碳四烯	0.163	59	胆甾-5-烯-3-醇十四酸酯	0.541
20	2-庚醇	0.403	40	9(Z)-十八烯-1-醇	0.159	60	三十酸	2.968

性大分子抗肿瘤作用研究正在进一步研究中。

用石油醚和醋酸乙酯分别萃取醇提物得到的 A₁、A₂ 组分主要是低极性的化合物,GC-MS 分析的结果也证实了这一结果。从石油醚提取物中检出 89 个化合物,其中 18 个甾类化合物,主要为胆甾酮、胆甾醇、麦角甾醇;其余 71 个成分主要为不饱和脂肪酸、高级脂肪酸及其酯。值得注意的是石油醚提取物中含有大量不饱和脂肪酸、角鲨烯,醋酸乙酯提取物中油酸、4-甲基-胆甾醇-8,24-二烯-3-醇等的量也较大,粗吻海龙脂溶性成分值得进一步深入研究。

References:

- [1] Zhang Z H, Xu G J, Xu L S, et al. Characters and commodity identification of Hailong [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1997, 20(2): 63-65.
- [2] Zhang Z H, Xu G J, Xu L S, et al. Hormonic effect of the ethanol extracts of *Syngnathus* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1995, 18(4): 197-199.
- [3] Zhang Z H, Ni Q G, Wu L Y, et al. Studies on anti-tumor activity of *Trachyrhamphus serratus* [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1998, 68(4): 10-12.
- [4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. Methodology of Pharmacology Experiment (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和 E-mail)。