

蛇莓中具有抗癌活性的三萜类成分

吴培楠¹, 段宏泉¹, 姚 智², 潘 勤³, 张富康¹

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070;

3. 天津中新药业集团股份有限公司 研究开发中心, 天津 300457)

蛇莓作为一种传统中药, 是蔷薇科植物蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Focke 的全草, 始载于《别录》, 别名蛇泡草、蛇葡萄等^[1]。蛇莓味甘、苦, 性寒, 具有清热解毒、凉血止血、散瘀止痛之功效。民间主要用于治疗热病、惊痫、咽痛、疔肿、烫火伤等^[2]。文献报道从蛇莓中分离得到的化合物主要有三萜及其苷类、香豆素类、黄酮类、甾醇类等^[3,4], 现代药理研究表明蛇莓具有较强的抗癌活性^[5,6]。

笔者对蛇莓提取物的前期实验表明, 其石油醚提取物和醋酸乙酯提取物对宫颈癌 HeLa 细胞具有较强的细胞毒活性, 见表 1。在进一步的化学成分研究中, 从石油醚和醋酸乙酯提取物中分离得到 5 个三萜类化合物, 通过有机波谱解析鉴定了其化学结构, 分别为乌苏酸(ursolic acid, I)、2 α -羟基乌苏酸(corosolic acid, II)、蔷薇酸(euscaphic acid, III)、3-O-乙酰坡模醇(pomolic acid acetate, IV)、2 α -羟基齐墩果酸(maslinic acid, V)。化合物 IV、V 为首次从蛇莓属植物中分得, 细胞毒实验显示化合物 I~V 对宫颈癌 HeLa 细胞具有一定的细胞毒作用。

表 1 蛇莓提取物对 HeLa 细胞的抑制率($n=4$)Table 1 Inhibitory rate of extract from *D. indica* to HeLa cell ($n=4$)

提取物	不同质量浓度的抑制率/%		
	400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
P. E	93.50	86.40	39.60
EtOAc	93.14	86.20	36.30
n-Bu	81.20	49.90	17.20

1 仪器、试剂、动物及药材

核磁共振仪: Bruker AVANCE 300 instrument (TMS 内标), 制备高效液相色谱仪: 日本分光公司 (JASCO), PU-1580 (泵), RI-1530 和 UV-1575 (检测器); HPLC 色谱柱: YMC-Pack ODS-A SH-343-5 250 mm $\times$ 20 mm (YMC), HPLC-Si 柱 Econosphere (Alltech), 凝胶色谱柱: Toyopearl HW-40C (Tosoh); 液质联用色谱仪: Alliance 2695, Quattro

Micro TM ESI (Waters); 柱色谱和薄层色谱用硅胶均系青岛海洋化工厂生产, 所用试剂均为分析纯。蛇莓 *Duchesnea indica* (Andr.) Focke 采自湖北省鹤峰县, 由中南民族大学生命科学院万定荣教授鉴定, 标本 (D20040905) 存放于天津医科大学药学院。

Bio-Rad 550 酶标仪, 美国 REVCO CO₂ 培养箱; 胎牛血清 (Hyclone 公司), RPMI-1640 (Gibco 公司); MTT (四甲基偶氮唑盐) 和 DMSO (二甲基亚砷) 为 Sigma 公司产品。

2 提取分离

蛇莓 4.5 kg, 粉碎, 95% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 6 h。提取液减压浓缩得浸膏 870 g, 浸膏加水混悬后, 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇进行萃取, 得石油醚提取物 71 g、醋酸乙酯提取物 109 g、正丁醇提取物 167 g。石油醚提取物经硅胶柱色谱分离得 17 个组分。组分 9 经凝胶渗透色谱、制备高效液相色谱分离得到化合物 I (30 mg) 和 IV (4.8 mg), 组分 16 经硅胶柱色谱分离, 制备高效液相色谱纯化得化合物 II (20 mg)、III (28 mg) 和 V (35 mg)。

3 细胞毒实验

取对数生长期细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成单细胞悬液 5×10^4 个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 180 μL 。培养 24 h 后, 加入受试药物, 提取物终质量浓度为 400、200、100 $\mu\text{g/mL}$; 化合物终质量浓度为 30 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 。将平板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的温箱中孵育 3 d, 去除培养液。每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的 PBS 液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 h。弃去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 于酶标仪 570 nm 处测吸光度 (A) 值, 细胞抑制率 = $1 - (\text{加药细胞 A} / \text{对照细胞 A}) \times 100\%$, 结果见表 2。

4 结构鉴定

化合物 I: 白色无定形粉末。¹³C-NMR 数据见表 3。ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 光谱数据与文献

收稿日期: 2006-12-22

基金项目: 天津医科大学科研基金资助 (2004xk32)

* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022) 23542838 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn

表2 化合物细胞毒性实验数据($n=6$)
Table 2 Data of cytotoxicity in compounds
from *D. indica* ($n=6$)

细胞株	化合物	抑制率/%	
		30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
HeLa	I	27.33	11.82
	II	3.49	2.52
	IV	13.56	9.11
	V	79.26	9.88
A549	I	18.43	3.93
	II	2.90	8.28
	IV	10.77	5.38
	V	10.77	0.83

表3 化合物 I ~ V 的 ^{13}C -NMR(CD_3OD)
Table 3 ^{13}C -NMR Data of compounds I ~ V (CD_3OD)

序号	I ¹⁾	I	II	IV ²⁾	V
1	40.3	48.4	42.6	37.5	48.6
2	29.1	69.6	67.3	27.4	69.9
3	79.6	84.5	80.2	80.9	85.0
4	39.8	39.2	41.4	37.7	41.1
5	56.8	56.7	49.4	55.2	57.2
6	19.4	24.5	25.0	18.3	20.1
7	34.2	34.3	34.2	32.6	34.1
8	40.7	40.5	39.5	38.1	41.0
9	48.9	49.2	48.3	47.1	48.6
10	36.7	40.9	39.5	36.9	39.7
11	24.2	29.4	27.4	23.5	24.5
12	126.8	126.7	129.5	129.3	123.9
13	139.5	139.9	140.2	137.9	145.8
14	43.2	43.4	42.8	39.9	43.2
15	28.8	31.8	29.7	28.2	29.3
16	25.3	25.4	26.7	24.5	25.1
17	48.9	48.4	48.3	47.7	47.7
18	54.2	54.4	55.2	52.9	43.3
19	40.3	40.5	73.7	73.1	47.7
20	39.9	41.2	43.2	41.1	32.1
21	31.7	19.6	19.4	25.4	35.4
22	38.0	38.2	38.3	36.9	34.1
23	27.8	30.8	29.3	28.0	29.8
24	16.0	17.9	22.6	15.3	18.2
25	16.3	17.7	17.6	16.1	17.5
26	17.6	17.5	16.7	16.9	17.9
27	24.3	24.1	27.2	23.7	26.9
28	181.6	181.7	182.4	182.4	182.4
29	17.8	21.6	25.0	25.9	34.3
30	21.6	17.2	17.4	16.7	24.6

¹⁾Pyrr, ²⁾ CDCl_3

报道^[7]的数据一致,因此鉴定化合物 I 为乌苏酸。

化合物 II:白色无定形粉末。ESI-MS m/z :471 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$)。 ^1H -NMR(CD_3OD) δ : 0.81(3H,s), 0.85(3H,s), 0.88(3H,d, $J=6.5$ Hz), 0.97(3H,s), 1.02(6H,s), 1.12(3H,s), 2.21(1H,d, $J=11.4$ Hz), 2.91(1H,d, $J=9.6$ Hz, H-3), 3.61(1H,m, H-2), 5.24(1H,br s, H-12)。 ^{13}C -NMR数据见表3。以上光谱数据与文献报道^[8]的数据一致,因此鉴定化合物 I 为2 α -羟基乌苏酸。

化合物 III:白色无定形粉末。 ^{13}C -NMR数据见表3。ESI-MS、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR光谱数据与文献报道^[9]的数据一致,因此鉴定化合物 III 为蔷薇酸。

化合物 IV:白色无定形粉末。ESI-MS m/z :493 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$)。 ^1H -NMR(CDCl_3) δ : 0.73(3H,s), 0.85(3H,s), 0.87(3H,s), 0.88(3H,s), 0.94(3H,s), 1.21(3H,s), 1.25(3H,s), 2.05(3H,s, CH_3CO), 2.54(1H,s), 4.50(1H,t, $J=8.5$ Hz), 5.35(1H,brs, H-12)。 ^{13}C -NMR数据见表3。以上光谱数据与文献报道^[10]的数据一致,因此鉴定化合物 IV 为3-O-乙酰坡模醇。

化合物 V:白色无定形粉末。ESI-MS m/z :471 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$)。 ^1H -NMR(CD_3OD) δ : 0.81(3H,s), 0.82(3H,s), 0.91(3H,s), 9.4(3H,s), 1.00(3H,s), 1.01(3H,s), 1.17(3H,s), 2.83(1H,m), 2.91(1H,d, $J=9.6$ Hz, H-3), 3.6(1H,m, H-2), 5.26(1H,t, $J=3.5$ Hz, H-12)。 ^{13}C -NMR数据见表3。以上光谱数据与文献报道^[11]的数据一致,因此鉴定化合物 V 为2 α -羟基齐墩果酸。

5 结果与讨论

蛇莓在民间用于治疗癌症,化合物 V 对 HeLa 细胞具有较高的抑制率,但化合物 I ~ N 只显示一定的抑制作用,说明蛇莓中还存在其他抗癌化学成分,有必要进一步深入研究。具有抗癌作用的三萜类化合物的分离鉴定,可以为蛇莓的癌症治疗作用提供部分依据。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.
- [2] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [3] Peng J N, Lu Y R, Chen D C. Studies on the chemical constituents from *Duchesnea indica* Focke [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 22(7): 339-341.
- [4] Ye L, Yang J S. New ellagic glycosides and known triterpenoids from *Duchesnea indica* Focke [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31(11): 844-848.
- [5] Zhang Z X, Bo X S. Effect of *Duchesnea indica* on extracorporeal esophageal cancer cells [J]. *Chin J Intergr Tradit Chin West Med* (中西医结合杂志), 1988, 8(4): 221.
- [6] Duan J Y, Liu X P, Li Q, et al. Studies on the anticancer effect of *Duchesnea indica* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1998, 14(3): 28.
- [7] Shashi B M, Asish P K. ^{13}C -NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(6): 1517.
- [8] Shoko T, Yoko I, Eri K, et al. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* call [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(3): 315.

- [9] Lu X Z, Luo H W. Studies on the chemical constituents of *Salvia trijuga* Diels [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1996, 21(7): 424-425.
- [10] Guo X M, Zhang L, Quan S C, et al. Isolation and identification on the triterpenes from *Chaenomeles lagenaria* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(9): 546-547.
- [11] Yu J H, Li G P, Li L, et al. Studies on the constituents of *Passiflora wilsonii* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(1): 27-29.

荔枝叶的化学成分研究

黄绍军^{1,4}, 黄秋玲², 义祥辉³, 黄路路⁴, 喻菁⁴

(1. 同济大学 化学系, 上海 200092; 2. 湖南省永州市第八中学, 湖南 永州 425100; 3. 桂林师范高等专科学校 化学系, 广西 桂林 541001; 4. 江西中医药高等专科学校 基础部, 江西 抚州 344000)

荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 是无患子科植物, 产于我国福建、广东、广西等地。它是一种营养较丰富的水果和药物。能生津、益血、理气、止痛, 治烦渴、胃痛、牙痛、外伤出血等; 而且荔枝叶具有抗炎、止痛、解暑消滞及收湿敛疮作用^[1,2]。体外试验表明荔枝叶的水提取物具有明显的抗乙肝病毒作用。为充分利用荔枝资源, 拓宽其利用价值, 寻找高效、低毒的抗乙肝病毒药物, 本课题组在药理活性初筛的基础上, 首次对荔枝叶的化学成分进行了较系统的研究, 从其水提物中分离得到6个化合物, 并用化学和波谱(¹³C-NMR、¹H-NMR、DEPT、HSQC、¹H-¹H COSY、HMBC、FAB-MS)方法鉴定了此6个化合物。分别为异落叶松脂素-9-O-β-D-木糖苷(I)、4,4',9'-三羟基-3,5,3'-三甲氧基-7-苯基四氢萘木脂素-9-O-β-D-木糖苷(II)、山奈酚-3-O-α-L-鼠李糖-7-O-[α-L-鼠李糖基(1→2)-β-D-半乳糖]苷(III)、槲皮素-3-O-[α-L-鼠李糖基(1→2)-β-D-半乳糖]-7-O-α-L-鼠李糖苷(IV)、山奈酚-3-O-α-L-鼠李糖-7-O-[α-L-鼠李糖基(1→2)-β-D-葡萄糖]苷(V)、槲皮素-3-O-α-L-鼠李糖-7-O-[α-L-鼠李糖基(1→2)-β-D-葡萄糖]苷(VI)。该6个化合物均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器和试剂

P200 I 型高效液相色谱仪及 UV200 I 型紫外可变波长检测器(大连依利特分析仪器有限公司); WRX-1S 显微热分析仪(上海精密科学仪器有限公司); Bruker AV500MHz/DRX500 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司), TMS 为内标, CD₃OD 为溶剂; VG AutoSpec 3000 有机磁质谱仪, 甘油为底物;

D-101 大孔吸附树脂(天津富邦化工科技有限公司); 柱色谱用硅胶(200~300 目)、硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工厂产品; 其他化学试剂均为分析纯; 荔枝叶 2004 年 11 月采于广西陆川, 经义祥辉教授鉴定, 阴干处理, 样品保存于江西中医药高等专科学校化学教研室。

2 提取和分离

称取干燥的荔枝叶 1 kg, 破碎后用蒸馏水煮沸 2 h, 冷却后滤过, 重复 3 次。合并滤液, 将滤液用蒸馏水稀释后以 20 mL/min 的体积流量流过填有 D-101 大孔吸附树脂的色谱柱(60 cm×8.0 cm)。吸附完毕后, 先用蒸馏水洗柱, 至柱流出液(B)为无色, 然后用 80% 乙醇洗脱, 洗脱液减压蒸干得粗产品(A)60 g。粗产品再经无水乙醇回流提取, 滤过, 得滤渣(A₂)31 g, 又将滤渣减压蒸干得精品(A₁)29 g。将上述 3 部分 A₁、A₂ 和 B 分别经抗乙肝病毒实验, 应用 HepG2.2.15 细胞系培养系统检测它们对 HBsAg 和 HBeAg 的表达抑制作用, 在质量浓度 400 μg/mL 下, 于实验第 6 天对 HBsAg 和 HBeAg 的抑制率: A₁ 为 76.1% 和 73.4%, A₂ 为 46.8% 和 37.8%, B 为 10.2% 和 7.7%。表明荔枝叶对乙肝病毒起抑制作用的较有效部位是 A₁。因此, 对 A₁ 部位进行了深入的化学成分研究。取 A₁ 13.3 g 进行硅胶(500 g, 200~300 目)柱(60 cm×6.0 cm)色谱, 用氯仿-甲醇(100:0~20:80)梯度洗脱, 每份收集 200 mL, 共收集 60 份(Fr. 1~60), TLC 及 HPLC 检识, 合并相同组分。Fr. 12~18 浓缩得黄色粉末 C(1.3 g), 再经硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇-甲酸(100:20:0.5)洗脱, 放置使溶剂挥发自然结晶, 滤过, 得

收稿日期: 2007-02-18

作者简介: 黄绍军(1975—), 男, 湖南省永州市人, 现正在同济大学攻读有机化学博士学位。

Tel: 13402080875 (021)65986184 E-mail: huangshaojun1975@163.com