

虎杖的抗补体活性蒽醌类成分及其作用靶点

沈路路, 卢燕*, 程志红, 陈道峰*

复旦大学药学院 生药学教研室, 上海 201203

摘要: 目的 研究虎杖 *Polygonum cuspidatum* 中的抗补体活性蒽醌类成分及其作用靶点。方法 采用溶血试验法进行抗补体活性成分的导向分离, 对所得化合物进行抗补体活性测定, 并利用补体缺失血清鉴定主要活性化合物的作用靶点。结果 从虎杖醋酸乙酯活性部位分离得到 10 个蒽醌类和 3 个其他类成分, 分别鉴定为大黄素甲醚 (1)、大黄酚 (2)、大黄素-8-甲醚 (3)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (4)、大黄素 (5)、大黄酸 (6)、迷人醇 (7)、6-羟基芦荟大黄素 (8)、xanthorin (9)、isorhodoptilometrin (10)、2, 5-二甲基-7-羟基-色原酮 (11)、7-羟基-4-甲氧基-5-甲基-香豆素 (12) 和 5, 7-二羟基-异苯并呋喃酮 (13)。化合物 9、10 为首次从蓼科中分离得到, 化合物 9 是首次从虎杖中发现的茜草素型蒽醌; 化合物 3~9 对补体系统的经典和旁路途径有不同程度的抑制活性, 以化合物 7 的活性最显著 [$CH_{50} = (6 \pm 2) \mu\text{g/mL}$; $AP_{50} = (50 \pm 5) \mu\text{g/mL}$]。靶点研究表明, 化合物 4 作用于补体系统的 C1q、C2 及 C9 组分; 化合物 7 作用于 C1q、C2、C4 及 C9 组分。结论 蒽醌类化合物是虎杖的主要抗补体活性成分, 迷人醇活性强、靶点明确, 值得深入研究。

关键词: 虎杖; 蒽醌类化合物; 抗补体活性; 大黄素; 迷人醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2502-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.003

Anti-complementary anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* and their action targets

SHEN Lu-lu, LU Yan, CHENG Zhi-hong, CHEN Dao-feng

Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To study the anti-complementary anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* and their action targets. **Methods** The anti-complementary activity-directed isolation was carried out with the hemolysis test as guide. All isolates were evaluated for their *in vitro* anti-complementary activities. The action targets of the main bioactive constituents were also examined using complement-depleted sera. **Results** Ten anthraquinones and three other compounds were isolated from the EtOAc fraction of *P. cuspidatum* extract, including physcion (1), chrysophanol (2), questin (3), emodin-8-*O*- β -D-glucoside (4), emodin (5), rhein (6), fallacinol (7), citreorosein (8), xanthorin (9), isorhodoptilometrin (10), 2, 5-dimethyl-7-hydroxychromone (11), 7-hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin (12), and 5, 7-dihydroxy-1-isobenzofuranone (13). Compounds 9 and 10 were isolated from the plants of Polygonaceae for the first time, and compound 9 was the alizarin-type anthraquinone first obtained from *P. cuspidatum*. Compounds 3—9 showed the anti-complementary activity in different degrees, and compound 7 exhibited the most significant activity against the classical and alternative pathway [$CH_{50} = (6 \pm 2) \mu\text{g/mL}$, $AP_{50} = (50 \pm 5) \mu\text{g/mL}$]. The study on the preliminary mechanism revealed that compound 4 interacted with C1q, C2, and C9 in complement activation cascade, while compound 7 acted on C1q, C2, C4, and C9. **Conclusion** The anthraquinones are main anti-complementary constituents in *P. cuspidatum*; and fallacinol (7) is a potential complement inhibitor with strong activity and definite targets, which should be further studied in future.

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; anthraquinones; anti-complementary activity; emodin; fallacinol

补体系统是体内重要的免疫防御系统之一, 它 衡有重要作用, 但其过度激活会引发系统性红斑狼的正常激活对抵御外来微生物的入侵和维持机体平 疮、类风湿性关节炎、急性呼吸窘迫综合征等多种

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30925042); 科技部重大专项资助项目 (2009ZX09502-013); 《中国药典》国家药品标准提高研究项目 (369, 虎杖)

作者简介: 沈路路 (1987—), 男, 2010 级硕士研究生, 研究方向为中药的药效物质基础与品质评价。

Tel: 13564241506 E-mail: 10211030039@fudan.edu.cn

*通信作者 卢燕, 副教授, 硕士生导师。Tel: (021)51980157 E-mail: luyan@fudan.edu.cn

陈道峰, 教授, 博士生导师。Tel: (021)51980135 E-mail: dfchen@shmu.edu.cn

疾病^[1]。传染性非典型肺炎(SARS)和禽流感也与补体系统的过度激活有关^[2]。本课题组的前期研究发现,很多清热解毒中药普遍具有抗补体活性^[3-6],因此,研究清热解毒中药的抗补体活性成分,不仅可为治疗补体过度激活相关疾病提供高效低毒的天然补体抑制剂,对于揭示此类中药的药效物质基础也具有重要意义。

虎杖为蓼科(Polygonaceae)植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。具清热解毒、祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效^[7],常用于治疗风湿及类风湿性关节炎和各型肺炎^[8-9],主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类及多糖等多种成分^[10]。据报道,虎杖对烧伤后小鼠补体的过度活化有一定程度的调理改善作用^[11],作者也发现虎杖乙醇提取物具有显著的抗补体活性 [$CH_{50} = (40 \pm 6) \mu\text{g/mL}$],但迄今未见虎杖中抗补体活性成分的报道。本实验对虎杖的醇提物进行了抗补体活性导向分离,从活性较好的醋酸乙酯部位中分离鉴定了10个蒽醌类和3个其他类成分:大黄素甲醚(phycion, **1**)、大黄酚(**2**)、大黄素-8-甲醚(**3**)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(**4**)、大黄素(**5**)、大黄酸(**6**)、迷人醇(**7**)、6-羟基芦荟大黄素(**8**)、xanthorin(**9**)、isorhodoptilometrin(**10**)、2,5-二甲基-7-羟基-色原酮(**11**)、7-羟基-4-甲氧基-5-甲基-香豆素(**12**)和5,7-二羟基-异苯并呋喃酮(**13**)。其中化合物**9**、**10**为首次从蓼科植物中分离得到,化合物**9**是首个从虎杖中得到的茜草素型蒽醌;同时对化合物**1**~**9**进行了经典和旁路途径的抗补体活性测定,并选择其中活性最强的化合物**7**和唯一的蒽醌苷化合物**4**进行了作用靶点研究,为虎杖的清热解毒药效物质基础研究及其在治疗补体过度激活相关疾病方面的应用提供科学依据。

1 仪器与材料

中压制备色谱仪(上海利穗科技有限公司);MULTISKAN MK3型酶标仪(Thermo Scientific, 美国);DRX-400型核磁共振仪(Bruker, 瑞士);HP-5989A质谱仪(Palo Alto, 美国)。柱色谱硅胶(200~300、300~400目,青岛海洋化工厂);薄层色谱硅胶分析板、厚制备板(烟台江友硅胶开发有限公司);Sephadex LH-20(Pharmacia Biotech);聚酰胺(30~60目,上海化学试剂公司);RP-18填料(EM SCIENCE, 德国);试剂均为分析纯。虎杖药材于2011年7月购自安徽亳州药材市场(产地:

山东),经复旦大学药学院陈道峰教授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根,凭证标本(DFC-HZ-20110718)存于复旦大学药学院生药学教研室药材标本室。

豚鼠(200~300 g)、新西兰兔(2.5~3 kg),雌雄不限,复旦大学实验动物部(合格证编号分别为:SCXK沪2012-1006和SCXK沪2012-2057);无菌绵羊血(SRBC,上海试剂供应研究中心);溶血素(复旦大学药理学教研室);兔红细胞(RE)、豚鼠血清及人血清均为自制;Anti-C1q、Anti-C2、Anti-C9抗血清(Abcam, UK,批号分别为ab71089、ab77498、ab17931),Anti-C3、Anti-C4、Anti-C5抗血清(浙江玉环南方试剂厂,批号分别为201105、201106、201107);肝素(上海爱紫特生物科技有限公司,批号090602)。大黄酚(批号110796-201017)、大黄酸(批号110757-200206)对照品均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 经典途径抗补体活性测定^[12]

取临界质量浓度的补体(豚鼠血清)分别与不同质量浓度的供试品混匀,加入适量的BBS缓冲液、溶血素和2%羊红细胞(SRBC)。37℃水浴30 min,离心取上清在405 nm下测定吸光度(*A*值)(中药组)。同时设置中药对照组(将等量的供试品加入BBS缓冲液中,用于测定中药本底*A*值)、补体组(取临界质量浓度的补体直接加入适量的BBS缓冲液、溶血素和2%SRBC,用于测定临界质量浓度补体所造成红细胞溶血的*A*值)和全溶血组(将2%SRBC加入水中使之全溶血,用于观察补体组是否达到或接近全溶血水平)。计算溶血抑制率。

$$\text{溶血抑制率} = 1 - (A_{\text{中药组}} - A_{\text{中药对照组}}) / A_{\text{补体组}}$$

以溶血抑制率对供试品质量浓度作图计算经典途径50%抑制溶血所需供试品质量浓度值(CH_{50})。

2.2 旁路途径抗补体活性测定^[12]

取临界浓度的补体(人血清)分别与不同质量浓度的供试品混匀,加入适量的旁路途径(AP)缓冲液(0.1 mol/L EGTA 80 mL,巴比妥缓冲液 180 mL, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.41 g,加蒸馏水补足至1000 mL。以1 mol/L NaOH调节pH值至7.5)和0.5%的兔红细胞。37℃水浴30 min,离心取上清在405 nm下测定吸光度(中药组)。同时设置中药对照组、补体组、全溶血组。以溶血抑制率对供试品质量浓度作图计算旁路途径50%抑制溶血所需供试品质量浓度值(AP_{50})。

2.3 提取与分离

虎杖药材粗粉 16 kg, 以 5 倍量 95%乙醇提取 3 次, 每次 2 h。减压回收溶剂, 得到浸膏 950 g, 浸膏悬浮于蒸馏水中, 依次用石油醚、醋酸乙酯和正丁醇萃取, 分别得到石油醚部位 20 g, CH₅₀ 为 (120±15) μg/mL、醋酸乙酯部位 400 g, CH₅₀ 为 (10±2) μg/mL、正丁醇部位 260 g, CH₅₀ 为 (60±10) μg/mL。取醋酸乙酯萃取物 200 g, 经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷、二氯甲烷-甲醇、甲醇梯度洗脱, 得到 5 个组分 Fr. 1~5。Fr. 2 在醋酸乙酯中重结晶得到化合物 **1** (60 mg)、**2** (12 mg)、**5** (50 mg); Fr. 3 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (20:1) 洗脱, 得化合物 **3** (14 mg)、**11** (2 mg)、**12** (3 mg) 和 **13** (2 mg); Fr. 4 经硅胶、聚酰胺、RP₁₈ 柱色谱和 Sephadex LH-20 纯化后得化合物 **7** (8 mg)、**8** (15 mg) 和 **10** (2 mg); Fr. 5 经硅胶、RP₁₈ 中压制备色谱和 Sephadex LH-20 纯化后得化合物 **4** (20 mg)、**6** (10 mg) 和 **9** (3 mg)。

2.4 抗补体作用靶点的确定^[12]

取临界质量浓度的补体抗体分别与临界质量浓度的补体 (人血清) 混合, 37 °C 水浴 15 min 后取上清作为补体缺失血清冷冻保存备用。取临界质量浓度的补体和供试品混匀后加入适量的补体缺失血清、溶血素和 2% 的 SRBC。37 °C 水浴 30 min, 离心取上清在 405 nm 下测定靶点组的 *A* 值 (靶点检测组)。同时设置缺失血清组、补体组和全溶血组。若靶点组较缺失血清组溶血能力明显恢复, 说明供试品不作用于该缺失组分, 若溶血能力不恢复, 则说明供试品作用于该缺失组分。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 黄色针晶 (氯仿), mp 206~208 °C。ESI-MS *m/z*: 283 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6.67 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-2), 7.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-4), 7.61 (1H, s, H-5), 7.27 (1H, s, H-7), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃), 2.45 (3H, s, 6-CH₃), 12.32, 12.12 (各 1H, s, 1, 8-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 166.5 (C-1), 106.8 (C-2), 162.5 (C-3), 108.2 (C-4), 124.5 (C-5), 148.5 (C-6), 121.3 (C-7), 165.4 (C-8), 190.8 (C-9), 182.0 (C-10), 135.2 (C-4a), 113.7 (C-8a), 110.3 (C-9a), 133.2 (C-10a), 22.2 (6-CH₃), 56.1 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[13], 故鉴定化合物 **1** 为大黄素甲醚。

化合物 **2**: 黄色针晶 (氯仿), mp 195~198 °C。ESI-MS *m/z*: 253 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.27 (1H, s, H-2), 7.60 (1H, s, H-4), 7.86 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, H-5), 7.67 (1H, dd, *J* = 8.4, 7.4 Hz, H-6), 7.42 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, H-7), 2.48 (3H, s, 3-CH₃)。以上氢谱数据与文献报道^[14]的大黄素数据一致, 并用薄层色谱与大黄酚对照品对照, 两者 R_f 值 (0.62, 环己烷-醋酸乙酯 10:1) 一致, 故鉴定化合物 **2** 为大黄素。

化合物 **3**: 黄色针晶 (氯仿), mp 300~302 °C。ESI-MS *m/z*: 283 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.04 (1H, d, *J* = 0.8 Hz, H-2), 7.47 (1H, d, *J* = 0.8 Hz, H-4), 7.19 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-5), 6.67 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-7), 2.41 (3H, s, 3-CH₃), 3.95 (3H, s, 8-OCH₃), 12.37, 10.38 (各 1H, s, 1, 6-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 161.7 (C-1), 124.2 (C-2), 146.7 (C-3), 119.2 (C-4), 107.0 (C-5), 164.5 (C-6), 105.0 (C-7), 163.5 (C-8), 186.4 (C-9), 182.3 (C-10), 132.0 (C-4a), 112.7 (C-8a), 114.4 (C-9a), 136.8 (C-10a), 21.4 (3-CH₃), 56.4 (8-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[15], 故鉴定化合物 **3** 为大黄素-8-甲醚。

化合物 **4**: 桔红色针晶 (甲醇), mp 192~193 °C。ESI-MS *m/z*: 431 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.09 (1H, s, H-2), 7.38 (1H, s, H-4), 7.23 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-5), 6.97 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-7), 2.39 (3H, s, 6-CH₃), 13.19 (1H, s, 1-OH), 5.03 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Glc-H-1), 3.42 (1H, m, Glc-H-2), 3.37 (1H, m, Glc-H-3), 3.25 (1H, m, Glc-H-4), 3.71 (1H, m, Glc-H-5), 4.39 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, Glc-H-6a), 4.14 (1H, d, *J* = 11.6 Hz, Glc-H-6b); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.3 (C-1), 119.2 (C-2), 146.9 (C-3), 124.2 (C-4), 108.4 (C-5), 161.1 (C-6), 108.4 (C-7), 161.7 (C-8), 186.4 (C-9), 182.1 (C-10), 132.1 (C-4a), 113.2 (C-8a), 114.5 (C-9a), 136.5 (C-10a), 21.4 (6-CH₃), 100.8 (Glc-C-1), 73.3 (Glc-C-2), 77.3 (Glc-C-3), 69.4 (Glc-C-4), 76.4 (Glc-C-5), 60.6 (Glc-C-6)。以上数据与文献报道一致^[16], 故鉴定化合物 **4** 为大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷。

化合物 **5**: 桔红色针晶 (甲醇), mp 263~265 °C。ESI-MS *m/z*: 269 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.54 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-2), 7.15 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-4), 7.52 (1H, s, H-5), 7.06 (1H, s, H-7), 2.41 (3H, s, 6-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz,

DMSO- d_6) δ : 165.5 (C-1), 107.8 (C-2), 161.3 (C-3), 108.8 (C-4), 124.0 (C-5), 148.1 (C-6), 120.3 (C-7), 164.3 (C-8), 189.6 (C-9), 181.2 (C-10), 134.9 (C-4a), 113.2 (C-8a), 108.7 (C-9a), 132.6 (C-10a), 21.4 (6-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[17], 故鉴定化合物 **5** 为大黄素。

化合物 **6**: 桔红色针晶 (甲醇), mp 320~322 °C。ESI-MS m/z : 283 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CHCl₃) δ : 8.11 (1H, s, H-2), 7.77 (1H, s, H-4), 7.39 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.72 (1H, m, H-6), 7.83 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-7), 11.88 (1H, brs, 3-COOH)。以上数据与文献报道一致^[14], 并与大黄酸对照品共薄层 (氯仿-甲醇 5:1), 两者 Rf 值及显色行为一致, 故鉴定化合物 **6** 为大黄酸。

化合物 **7**: 黄色针晶 (氯仿-甲醇), mp 232~234 °C。ESI-MS m/z : 301 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.22 (1H, s, H-2), 7.60 (1H, s, H-4), 7.10 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-5), 6.79 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-7), 3.89 (3H, s, 6-OCH₃), 4.60 (2H, d, J = 5.5 Hz, 3-CH₂OH), 5.58 (1H, t, J = 5.5 Hz, 3-CH₂OH), 12.10, 11.94 (各 1H, s, 1, 8-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.4 (C-1), 117.2 (C-2), 153.2 (C-3), 120.9 (C-4), 107.7 (C-5), 161.6 (C-6), 106.6 (C-7), 166.2 (C-8), 190.0 (C-9), 181.2 (C-10), 132.9 (C-4a), 109.9 (C-8a), 114.4 (C-9a), 134.8 (C-10a), 56.4 (6-OCH₃), 62.0 (3-CH₂OH)。以上数据与文献报道一致^[18], 故鉴定化合物 **7** 为迷人醇。

化合物 **8**: 桔红色针晶 (氯仿-甲醇), mp 286~288 °C。ESI-MS m/z : 285 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.32 (1H, s, H-2), 7.78 (1H, s, H-4), 7.26 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 6.69 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 4.80 (2H, d, J = 5.5 Hz, 3-CH₂OH), 4.62 (1H, t, J = 5.5 Hz, 3-CH₂OH), 12.24, 12.17, 10.20 (各 1H, s, 1, 6, 8-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.5 (C-1), 117.1 (C-2), 152.9 (C-3), 120.7 (C-4), 108.9 (C-5), 161.5 (C-6), 107.9 (C-7), 165.7 (C-8), 189.7 (C-9), 181.3 (C-10), 132.8 (C-4a), 108.9 (C-8a), 114.0 (C-9a), 135.1 (C-10a), 62.0 (3-CH₂OH)。以上数据与文献报道一致^[19], 故鉴定化合物 **8** 为 6-羟基芦荟大黄素。

化合物 **9**: 红色针晶 (氯仿-甲醇), mp 244~246 °C。ESI-MS m/z : 301 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.04 (1H, s, H-2), 7.62 (1H, s, H-4),

6.61 (1H, s, H-7), 4.01 (3H, s, 6-OCH₃), 2.42 (3H, s, 3-CH₃), 13.60, 12.79, 12.26 (各 1H, s, 1, 5, 8-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 162.3 (C-1), 124.4 (C-2), 147.9 (C-3), 120.4 (C-4), 157.6 (C-5), 150.3 (C-6), 106.6 (C-7), 160.1 (C-8), 188.2 (C-9), 187.0 (C-10), 132.8 (C-4a), 105.4 (C-8a), 112.3 (C-9a), 114.0 (C-10a), 56.5 (6-OCH₃), 22.0 (3-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[20], 故鉴定化合物 **9** 为 xanthorin。

化合物 **10**: 黄色粉末, $[\alpha]_D^{20}$ -33.6° (c 0.20, MeOH)。ESI-MS m/z : 313 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 7.42 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-2), 8.00 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-4), 7.71 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 7.00 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 2.92 (2H, m, J = 6.3 Hz, 3-CH₂-), 4.28 (1H, q, J = 6.3 Hz, 3-CH₂CH-), 1.38 (3H, d, J = 6.3 Hz, 3-CH₂CHOHCH₃), 12.38, 12.20 (各 1H, s, 1, 8-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 162.5 (C-1), 121.7 (C-2), 150.7 (C-3), 125.4 (C-4), 110.1 (C-5), 165.9 (C-6), 108.8 (C-7), 167.5 (C-8), 190.7 (C-9), 182.3 (C-10), 133.6 (C-4a), 109.7 (C-8a), 114.5 (C-9a), 135.8 (C-10a), 46.5 (3-CH₂-), 67.6 (3-CH₂CH-), 24.1 (3-CH₂CHOHCH₃)。以上数据与文献报道一致^[21], 故鉴定化合物 **10** 为 isorhodoptilometrin。

化合物 **11**: 无色针晶 (氯仿-甲醇), mp 232~234 °C。ESI-MS m/z : 191 [M+H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.00 (1H, s, H-3), 6.63 (2H, t, J = 2.0 Hz, H-6, 8), 2.59 (3H, s, 2-CH₃), 2.32 (3H, s, 5-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 160.3 (C-2), 98.7 (C-3), 179.1 (C-4), 140.1 (C-5), 115.1 (C-6), 163.7 (C-7), 108.5 (C-8), 158.6 (C-9), 112.6 (C-10), 20.2 (2-CH₃), 16.9 (5-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[22], 故鉴定化合物 **11** 为 2, 5-二甲基-7-羟基色元酮。

化合物 **12**: 无色针晶 (氯仿-甲醇), mp 297~299 °C。ESI-MS m/z : 205 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.70 (1H, s, H-3), 6.92 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6), 6.86 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-8), 2.56 (3H, s, 5-CH₃), 4.66 (3H, s, 4-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 169.8 (C-2), 87.3 (C-3), 157.4 (C-4), 139.0 (C-5), 116.9 (C-6), 162.0 (C-7), 101.3 (C-8), 162.8 (C-9), 107.0 (C-10), 23.4 (5-CH₃), 55.9 (4-OCH₃)。以上数据与文献报道一致^[23], 故鉴定化合物 **12** 为 7-羟基-4-甲氧基-5-甲基香豆素。

化合物 **13**: 无色针晶 (氯仿-甲醇), mp 255~

257 °C。ESI-MS m/z : 167 $[M+H]^-$ 。 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.18 (2H, s, H-3); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 172.7 (C-1), 70.5 (C-3), 103.3 (C-4), 159.7 (C-5), 101.5 (C-6), 152.7 (C-7), 104.3 (C-8), 167.0 (C-9)。以上数据与文献报道一致^[24], 故鉴定化合物 **13** 为 5, 7-二羟基异苯并呋喃酮。

3.2 经典途径和旁路途径的抗补体活性测定结果

测定了化合物 **1~9** (其余化合物因量不足未测) 的抗补体活性, 结果见表 1。化合物 **3~9** 对补体系统的经典和旁路途径有不同程度的抑制活性, CH_{50} 和 AP_{50} 值分别为 6~500 $\mu g/mL$ 和 50~350 $\mu g/mL$ 。其中, 化合物 **7** 活性最强, 对 2 条途径的抑制作用均强于阳性对照肝素, CH_{50} 和 AP_{50} 值分别达到 $(6 \pm 2) \mu g/mL$ 和 $(50 \pm 5) \mu g/mL$ 。化合物 **6~8** 对经典和旁路途径的抗补体活性均较强, 可能与其 C-3 位上的-COOH 或- CH_2OH 取代有关。具有 2 个酚羟基的化合物 **5** 和 **9** 对经典途径的抑制活性强于只有 1 个酚羟基的化合物 **1** 和 **2**, 酚羟基苷化后化合物 **4** 活性明显降低, 提示酚羟基数目对于这些蒽醌成分的抗补体活性是重要的。

表 1 蒽醌类化合物 **1~9** 的抗补体活性测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Anti-complementary activities of anthraquinones **1~9** ($n = 3$)

化合物	$CH_{50} / (\mu g \cdot mL^{-1})$	$AP_{50} / (\mu g \cdot mL^{-1})$
1	—	—
2	—	—
3	340 ± 15	—
4	500 ± 25	350 ± 20
5	47 ± 3	—
6	95 ± 15	110 ± 20
7	6 ± 2	50 ± 5
8	20 ± 10	120 ± 15
9	100 ± 10	—
肝素	70 ± 5	110 ± 10

“—”: 无活性

“—”: no activity

3.3 活性化合物的作用靶点鉴定结果

为了更好地阐明虎杖中蒽醌类化合物对补体系统的抑制作用, 本实验选取活性最强的化合物 **7** 和唯一的蒽醌苷化合物 **4** 进行了抗补体作用靶点研究, 结果见图 1。对于补体系统的 C1q、C2 及 C9 组分, 化合物 **4** 的靶点组较相应缺失血清组溶血能

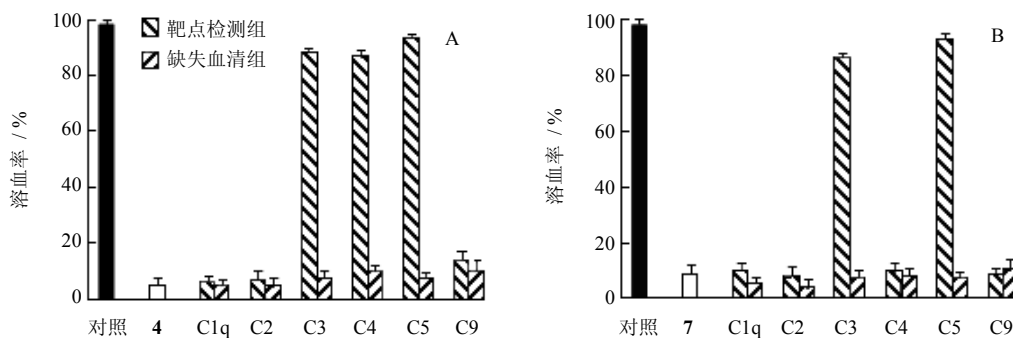


图 1 化合物 **4** (A) 和 **7** (B) 的抗补体作用靶点 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Anti-complementary action targets of compounds **4** (A) and **7** (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

力未能恢复; 而对于 C3、C4 及 C5 组分, 化合物 **4** 的靶点组较相应的缺失血清组溶血能力明显恢复, 溶血率分别达到 $(90 \pm 1.78) \%$ 、 $(88 \pm 2.91) \%$ 和 $(98 \pm 1.91) \%$, 表明化合物 **4** 作用于补体系统的 C1q、C2 和 C9 组分。同理, 化合物 **7** 作用于补体的 C1q、C2、C4 及 C9 组分。2 个化合物的作用靶点差异仅在于 C4 组分。

4 讨论

虎杖富含蒽醌类成分, 本研究发现该类成分是虎杖的主要抗补体活性成分, 其中迷人醇 (**7**) 对补体

激活的经典和旁路途径都有显著的抑制活性, 为虎杖在治疗补体过度激活相关疾病方面的新药研发奠定了基础。虎杖作为常用清热解暑中药, 对于风湿及类风湿性关节炎等有明显疗效^[8], 而这些疾病的病理过程又与补体系统的过度激活相关, 提示蒽醌类抗补体活性成分是虎杖的重要药效物质, 但需要进一步的动物实验考察这些活性成分的体内药理作用。

参考文献

[1] Makrides S C. Therapeutic inhibition of the complement system [J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(1): 59-88.

- [2] Zhang T, Chen D F. Anticomplementary principles of a Chinese multiterb remedy for the treatment and prevention of SARS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117: 351-361.
- [3] 徐 晗, 章蕴毅, 陈道峰, 等. 天然产物中的抗补体活性成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 322-332.
- [4] Jin J H, Cheng Z H, Chen D F. Anti-complement constituents of *Commelina communis* and their targets in complement activation cascade [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 21: 577-581.
- [5] Du D S, Cheng Z H, Chen D F. A new unusual delta (11 (12)-oleane triterpene and anti-complement triterpenes from *Prunella vulgaris* spikes [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7: 501-505.
- [6] Wu Y, Chen D F. Anti-complementary effect of polysaccharide B3-PS1 in herba *Scutellariae barbatae* [J]. *Immunopharm Immunot*, 2009, 31, 696-701.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 张 明, 朱 周, 王一飞. 虎杖痛风颗粒治疗急性痛风性关节炎临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(6): 16-18.
- [9] 张雷家, 孔令芬. 虎杖合剂联合抗生素治疗小儿支原体肺炎的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(1): 68-69.
- [10] 李菁雯, 陈祥龙, 孟祥智. 虎杖及其提取物的研究进展 [J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 103-106.
- [11] 罗中华, 黄文华, 周 新, 等. 中药对烫伤小鼠补体系统的作用 [J]. 上海免疫学杂志, 1994, 14(4): 210-211.
- [12] Xu H, Zhang Y Y, Chen D F, *et al.* Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 175-182.
- [13] 梁永锋. 陇东虎杖化学成分研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 12736-12748.
- [14] 张兰胜, 程永现, 刘光明. 戟叶酸模乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中成药, 2012, 34(5): 892-895.
- [15] Park Y B, Seon K. Isolation and identification of antitumor promoters from the seeds of *Cassia tora* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(10): 1043-1048.
- [16] 夏新中, 周思祥, 屠鹏飞. 细梗胡枝子化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1432-1435.
- [17] 张承忠, 李 冲, 陶保全, 等. 单脉大黄化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 660-662.
- [18] Wang W L, Zhu H W, Zhu W M, *et al.* Two new cytotoxic quinine type compounds from the halotolerant fungus *Aspergillus variegator* [J]. *J Antibiot*, 2007, 60(10): 603-607.
- [19] 张兰胜, 刘光明, 程永现. 戟叶酸模乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中成药, 2012, 34(5): 892-895.
- [20] Wei X, Jiang J S, Zhang P C, *et al.* Anthraquinone benzoisochromanquinone dimers from the roots of *Berberis floribunda* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(9): 1248-1252.
- [21] Nanthaphong K, Morakot K, Jariya S, *et al.* Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(3): 461-468.
- [22] Konigs P, Binker B, Waldvogel S R, *et al.* Structural revision and synthesis of altechromone A [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73: 2064-2066.
- [23] Braulio M, Fraga, Melchor G, *et al.* A chemotaxonomic study of nine canarian siderites species [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1038-1048.
- [24] 高云佳, 闽 鹏, 颜 鸣, 等. 脱皮马勃化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(1): 47-49.