

• 化学成分 •

夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究

柏玉冰^{1,3}, 李 春², 周亚敏^{1,3}, 皮胜玲^{1,3}, 夏伯候^{1,3}, 李亚梅^{1,3}, 林丽美^{1,3*}, 廖端芳^{1,3}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

3. 湖南省中药不良成分快速检测及脱除工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 研究夏枯草 *Prunella vulgaris* 果穗的化学成分及其抗乳腺癌细胞活性。方法 运用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 等色谱方法进行分离纯化, 根据理化性质和波谱数据并参考文献鉴定化合物的结构; 通过 MTT 法, 对化合物体外抗乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 的活性进行筛选。结果 从夏枯草果穗中分离得到 14 个化合物, 分别鉴定为寡肽 (1)、5 α ,8 α -过氧麦角-6,22-二烯-3 β -醇 (2)、 β -香树素 (3)、白桦脂酸 (4)、3-羟基-11-烯-11,12-脱氢-28,13-乌苏酸内酯 (5)、大戟醇 (6)、2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸 (7)、candelabrone 12-methyl ether (8)、cyclopentaneacetic acid (9)、2 α -羟基熊果酸 (10)、 α -菠菜甾醇 (11)、齐墩果酸 (12)、熊果酸 (13)、 β -谷甾醇 (14)。结论 化合物 2、5、6、8 和 9 均为首次从该属植物中分离得到; 化合物 10 和 13 对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 及正常乳腺细胞 MCF-10A 均具有明显抑制作用; 化合物 4 对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 具有明显抑制作用, 而对正常乳腺细胞 MCF-10A 抑制不明显, 能选择性地抑制肿瘤细胞。

关键词: 夏枯草; 三萜; 3-羟基-11-烯-11,12-脱氢-28,13-乌苏酸内酯; 大戟醇; 白桦脂酸; 乳腺癌细胞

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)24-3623-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.002

Chemical constituents of triterpenoids from *Prunella vulgaris* and their antitumor activitiesBAI Yu-bing^{1,3}, LI Chun², ZHOU Ya-min^{1,3}, PI Sheng-ling^{1,3}, XIA Bo-hou^{1,3}, LI Ya-mei^{1,3}, LIN Li-mei^{1,3}, LIAO Duan-fang^{1,3}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Hunan Engineering Center for Rapid Test and Removal of Toxic and Harmful Substances in Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents from *Prunella vulgaris* and their antitumor activities. **Methods** Silica gel, reverse-phase octadecylsilyl (ODS), Sephadex LH-20 chromatographic methods, and HPLC were applied to isolating and purifying compounds. MS and NMR spectroscopic methods were used to determine their structures. Furthermore, the cytotoxicity of these chemical components for MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10A cell lines was measured by MTT method. **Results** Fourteen compounds were isolated from the fruits of *P. vulgaris* and their structures were identified as: autantiamide acetate (1), 5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol (2), β -amyrin (3), betulinic acid (4), 3-hydroxy-11-en-11,12-dehydrogenation-28,13-oic acid lactone (5), eburicol (6), 2 α ,3 α ,24-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (7), candelabrone 12-methyl ether (8), cyclopentaneacetic acid (9), 2 α ,3 β -dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (10), α -spinasterol (11), oleanolic acid (12), ursolic acid (13), and β -sitosterol (14). **Conclusion** Compounds 2, 5, 6, 8, and 9 are isolated from the genus of *Prunella* L. for the first time. The results of cytotoxic assay indicate that compounds 10 and 13 can obviously inhibit the activity of MCF-7, MDA-MB-231, and the normal cell lines MCF-10A. Compound 4 can selectively inhibit the activity of MCF-7 and MDA-MB-231 while show no effect on the normal cell lines MCF-10A.

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 科技部“重大新药创制”(2013ZX09201019); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20124323120004); 湖南省自然科学基金(13JJ4089); 公益性行业科研专项(201507002); 长沙市重点科技计划(k1406039-31); 湖湘青年科技创新创业平台人才项目(2013); 湖南省“十二五”重点学科药学学科资助

作者简介: 柏玉冰(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及其质量标准化研究。Tel: 18274856494 E-mail: baiyubing07@163.com

***通信作者** 林丽美, 女, 副教授, 主要从事中药药效物质基础及其质量标准化研究。Tel: (0731)88458230 E-mail: lizasmile@163.com

Key words: *Prunella vulgaris* L.; triterpenoids; 3-hydroxy-11-en-11,12-dehydrogenation-28,13-oic acid lactone; eburicol; betulinic acid; breast cancer cell

夏枯草 *Prunellae Spica* 为唇形科 (Labiatae) 夏枯草属 *Prunella* L. 植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗, 味辛、苦, 性寒, 入肝、胆经。具有清火、明目、散结、消肿的功能, 用于目赤肿痛、目珠夜育、头痛眩晕、瘰癧、癭瘤、乳痈肿痛^[1]。研究表明, 夏枯草中主要含有三萜及其皂苷、酚酸、甾醇及其苷、黄酮及其苷、有机酸、挥发油及糖类成分^[2-3]。药效关系研究表明, 夏枯草中抗病毒活性的主要贡献成分为鞣质和多糖^[4-5], 抗炎活性成分为迷迭香酸^[6], 抗氧化活性成分为酚酸和多糖^[7-8], 而其抗肿瘤主要贡献成分为三萜类, 如齐墩果酸可以明显抑制肺腺癌 SPC-A-1 细胞的生长^[9]; 熊果酸对 A549、SK-OV-3、SK-MEL-2 和 HCT15 细胞均有温和的细胞毒性作用^[10]; 3 α ,19 α ,24-三羟基-12-烯-28-乌苏酸和 3 β ,16 α ,24-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸对人肺癌细胞 A549 瘤株有明显的抑制作用^[11]; 2 α ,3 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸还可诱导人急性白血病 Jurkat T 细胞的凋亡^[12]。早在《神农本草经》中就有记载“夏枯草, 味苦、辛, 主寒热瘰癧, 头创, 破症, 散结…”, 现代研究表明, 夏枯草对于乳腺癌的治疗也有效^[13]。但是, 目前其抗乳腺癌研究方面的药效物质基础研究尚不够明确。因此, 本课题组对其进一步的物质基础研究和选择抗肿瘤主体成分三萜类进行抗乳腺癌细胞活性筛选研究。本实验从夏枯草果穗中分离得到了 14 个化合物, 分别鉴定为寡肽 (autantiamide acetate, **1**)、5 α ,8 α -过氧麦角-6,22-二烯-3 β -醇 [5 α ,8 α -epidioxy-(22E,24R)-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, **2**]、 β -香树素 (β -amyrin, **3**)、白桦脂酸 (betulinic acid, **4**)、3-羟基-11-烯-11,12-脱氢-28,13-乌苏酸内酯 (3-hydroxy-11-en-11,12-dehydrogenation-28,13-oic acid lactone, **5**)、大戟醇 (eburicol, **6**)、2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸 (2 α ,3 α ,24-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid, **7**)、candelabrone 12-methyl ether (**8**)、cyclopentaneacetic acid (**9**)、2 α -羟基熊果酸 (2 α ,3 β -dihydroxyursa-12-en-28-oic acid, **10**)、 α -菠菜甾醇 (α -spinasterol, **11**)、齐墩果酸 (oleanolic acid, **12**)、熊果酸 (ursolic acid, **13**)、 β -谷甾醇 (**14**)。其中化合物 **2**、**5**、**6**、**8** 和 **9** 为首次从该属植物中分离得到。并通过 MTT 法, 对三萜类化合物 **3**、**4**、**5**、**7**、**10**、**12** 和 **13** 进行体外抗乳

腺癌细胞的活性进行筛选。化合物 **10** 和 **13** 能明显抑制 MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A 细胞增殖; 化合物 **4** 能明显抑制乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 的增殖, 而对 MCF-10A 抑制不明显, 能选择性地抑制肿瘤细胞。

1 仪器与材料

GT-2127QT 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司), RE-52A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), Bruker AV-400 型核磁共振光谱仪 (德国 Bruker 公司), Agilent 1100 Series LC/MSD Trap 质谱仪 (美国 Agilent 公司), X-4 型显微熔点仪 (杭州科博仪器有限公司), 凝胶 Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司), 薄层色谱硅胶预涂板 (青岛海洋化工厂), ODS (50 mm, YMC, 日本东京 Merck 公司), 柱色谱硅胶 (80~100、200~300、300~400 目, 青岛海洋化工厂), 溶剂均为分析纯或化学纯。CJ-1F 型医用净化工作台 (苏州冯氏实验动物设备有限公司), 台式低速离心机 (湖南凯达实业发展有限公司), DMIL 型倒置显微镜 (Leica), 3111 型 CO₂ 培养箱 (Thermo), MR-96A 酶标仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

化合物 **3**、**4**、**5**、**7**、**10**、**12**、**13** (实验室自制), 阳性对照品顺铂 (批号 130922, 齐鲁制药有限公司), 高糖 DMEM 培养基 (HyClone, NXJ0709), 胎牛血清 (HyClone, NXC0582), 噻唑蓝 (Sigma, MKBH7489V), 二甲基亚砜 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20120705), 胰蛋白酶 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号 04D10151)。夏枯草植物样本于 2013 年 5 月采于安徽夏枯草 GAP 基地, 经湖南中医药大学刘塔斯教授和龚力民讲师共同鉴定为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L.。

人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 购自中国科学院上海细胞库, 人正常乳腺细胞 MCF-10A 购自上海复祥生物科技有限公司。

2 提取与分离

夏枯草果穗 90 kg 粉碎后经甲醇超声提取 3 次, 每次 40 min, 合并提取液, 减压浓缩得总浸膏 2.13 kg, 甲醇溶解, 经硅胶柱色谱, 依次用石油醚、醋酸乙酯、甲醇洗脱, 减压浓缩得各部分浸膏。

取醋酸乙酯部分 (880 g), 经硅胶柱色谱 (200~

300目),用洗脱剂石油醚-醋酸乙酯(10:1、5:1、2:1)梯度洗脱,得馏份Fr. 1~7。Fr. 2经硅胶柱色谱(200~300目)分离,石油醚-醋酸乙酯9:1洗脱,得12个馏份,馏份3~5重结晶得化合物**3**(830 mg),馏份9~11重结晶得化合物**6**(27 mg);Fr. 4经硅胶柱色谱(200~300目)分离,石油醚-醋酸乙酯7:1洗脱,得27个馏份,馏份11~15减压浓缩后得化合物**11**(2.56 g),馏份19~22减压浓缩后得化合物**4**(520 mg);Fr. 5经硅胶柱色谱(200~300目)分离,经二氯甲烷-丙酮100:1洗脱,得152个馏份,馏份22~28析出晶体**14**(57 mg),馏份55~71析出晶体**12**(1.62 g),馏份80~102经硅胶柱色谱(200~300目)分离,石油醚-醋酸乙酯3:1,得到化合物**5**(236 mg),馏份112~120析出化合物**13**(1.73 g),馏份137~140经Sephadex LH-20纯化得到化合物**8**(7 mg)。Fr. 6经硅胶柱色谱及ODS柱色谱分离,得55个馏份,馏份22~27得化合物**2**(375 mg),馏份35~40得化合物**1**(211 mg)。

取甲醇部位73 g,经硅胶柱色谱(200~300目)分离,用石油醚-醋酸乙酯(3:1、1:1、0:1)梯度洗脱,得到组分Fr. 1~6。Fr. 3经硅胶及ODS柱色谱分离,得78个馏分,馏分23~31得化合物**10**(76 mg),馏分35~44得化合物**9**(10 mg);Fr. 5经硅胶柱色谱分离,二氯甲烷-甲醇40:1洗脱,得到化合物**7**(360 mg)。

3 结构鉴定

化合物**1**:白色粉末(甲醇),紫外254 nm下呈暗斑。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 4.77(1H, d, J = 5.6 Hz, H-2), 3.21(1H, dd, J = 13.6, 5.6 Hz, H-3a), 3.05(1H, dd, J = 13.6, 5.6 Hz, H-3b), 7.25(5H, m, H-5, 9), 7.72(2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 7'), 7.44(2H, t, J = 7.6 Hz, H-4', 6'), 7.53(1H, t, J = 7.4 Hz, H-5'), 4.35(1H, m, H-1''), 2.75(2H, m, H-2''), 7.07(2H, m, H-4'', 8''), 7.15(2H, m, H-5'', 7''), 3.82(1H, dd, J = 11.4, 4.2 Hz, H-9''), 3.93(1H, dd, J = 11.4, 5.0 Hz, H-9''), 2.02(3H, s, -COCH₃), 5.99(1H, d, J = 8.4 Hz, α -NH), 6.76(1H, d, J = 6.4 Hz, β -NH); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 170.2(C-1), 55.0(C-2), 38.4(C-3), 136.6(C-4), 128.5(C-5, 9), 129.3(C-6, 8), 127.1(C-7), 167.1(C-1'), 133.6(C-2'), 128.6(C-3', 7'), 127.0(C-4', 6'), 131.9(C-5'), 49.4(C-1''), 37.4(C-2''), 136.7(C-3''), 128.7(C-4'', 8''), 129.1

(C-5'', 7''), 126.7(C-6''), 64.5(C-9''), 170.7(-CO-), 20.8(-CH₃)。以上数据与文献报道一致^[14],故鉴定化合物**1**为寡肽。

化合物**2**:无色针晶(石油醚-丙酮),1%香草醛浓硫酸溶液显色呈墨绿色。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 3.97(1H, m, H-3), 6.25(1H, d, J = 8.2 Hz, H-6), 6.51(1H, d, J = 8.0 Hz, H-7), 0.81(3H, s, H-18), 0.88(3H, s, H-19), 0.99(3H, d, J = 6.8 Hz, H-21), 5.14(1H, dd, J = 15.6, 8.0 Hz, H-22), 5.22(1H, dd, J = 15.2, 7.2 Hz, H-23), 0.81(3H, d, J = 6.4 Hz, H-26), 0.83(3H, d, J = 6.4 Hz, H-27), 0.90(3H, d, J = 6.8 Hz, H-28); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 34.6(C-1), 30.1(C-2), 66.4(C-3), 37.0(C-4), 82.1(C-5), 135.4(C-6), 130.7(C-7), 79.4(C-8), 51.0(C-9), 36.9(C-10), 23.4(C-11), 39.3(C-12), 44.5(C-13), 51.6(C-14), 20.6(C-15), 28.6(C-16), 56.1(C-17), 12.8(C-18), 18.2(C-19), 39.7(C-20), 20.9(C-21), 135.2(C-22), 132.3(C-23), 42.7(C-24), 33.0(C-25), 19.6(C-26), 19.9(C-27), 17.5(C-28)。上述数据与文献报道一致^[15],故鉴定化合物**2**为5 α ,8 α -过氧麦角-6,22-二烯-3 β -醇。

化合物**3**:白色针状结晶(醋酸乙酯),1%香草醛浓硫酸溶液显色呈红色。¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.18(1H, t, J = 3.2 Hz, H-12), 3.22(1H, dd, J = 10.8, 4.8 Hz, H-3), 1.13(3H, s, H-27), 1.00(3H, s, H-23), 0.98(3H, s, H-25), 0.94(3H, s, H-24), 0.87(3H, s, H-29), 0.87(3H, s, H-30), 0.83(3H, s, H-28), 0.79(3H, s, H-26); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 38.6(C-1), 27.2(C-2), 79.0(C-3), 39.8(C-4), 55.2(C-5), 18.4(C-6), 32.6(C-7), 38.8(C-8), 47.6(C-9), 36.9(C-10), 23.5(C-11), 121.7(C-12), 145.2(C-13), 41.7(C-14), 26.1(C-15), 26.9(C-16), 32.5(C-17), 47.2(C-18), 46.8(C-19), 31.1(C-20), 34.7(C-21), 37.1(C-22), 28.1(C-23), 15.5(C-24), 15.6(C-25), 16.8(C-26), 26.0(C-27), 28.4(C-28), 33.3(C-29), 23.7(C-30)。上述数据与文献报道基本一致^[16],故鉴定化合物**3**为 β -香树素。

化合物**4**:白色果冻状结晶(氯仿),1%香草醛浓硫酸溶液显色呈红色。ESI-MS m/z : 455 [M-H]⁻, 457 [M+H]⁺。¹H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.69(1H, s, H-29), 4.56(1H, s, H-29), 3.16(1H, d, J = 5.2 Hz, H-3), 1.64(3H, s, 30-Me), 0.93, 0.87, 0.87, 0.76, 0.65(3H $\times$ 5, s, 27, 25, 26, 24, 23-Me); ¹³C-NMR(100

MHz, DMSO- d_6) δ : 38.5 (C-1), 27.4 (C-2), 77.0 (C-3), 38.8 (C-4), 55.2 (C-5), 18.2 (C-6), 34.2 (C-7), 40.5 (C-8), 50.2 (C-9), 36.6 (C-10), 20.7 (C-11), 25.6 (C-12), 37.9 (C-13), 42.3 (C-14), 29.5 (C-15), 32.0 (C-16), 55.7 (C-17), 46.9 (C-18), 48.8 (C-19), 150.6 (C-20), 30.4 (C-21), 37.0 (C-22), 28.4 (C-23), 16.0 (C-24), 16.2 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 177.5 (C-28), 109.9 (C-29), 19.2 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **4** 为白桦脂酸。

化合物 **5**: 白色粉末 (甲醇), 1%香草醛浓硫酸溶液显色呈红色。ESI-MS m/z : 931 $[2M+Na]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.96 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-12), 5.30 (1H, dd, J = 10.4, 2.4 Hz, H-11), 3.22 (1H, dd, J = 11.0, 5.0 Hz, H-3), 2.13 (1H, d, J = 5.6, H-18), 1.16 (3H, s, 27-Me), 1.05 (3H, s, 26-Me), 0.99 (3H, s, 25-Me), 0.99 (3H, d, J = 6.0 Hz, 29-Me), 0.93 (3H, d, J = 5.6 Hz, 30-Me), 0.91 (3H, s, 23-Me), 0.78 (3H, s, 24-Me); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 38.2 (C-1), 27.0 (C-2), 78.8 (C-3), 38.9 (C-4), 54.7 (C-5), 17.7 (C-6), 31.2 (C-7), 41.9 (C-8), 53.0 (C-9), 36.3 (C-10), 128.8 (C-11), 133.5 (C-12), 89.7 (C-13), 41.6 (C-14), 25.5 (C-15), 22.8 (C-16), 45.1 (C-17), 60.5 (C-18), 40.2 (C-19), 38.1 (C-20), 30.8 (C-21), 31.3 (C-22), 27.7 (C-23), 14.9 (C-24), 19.1 (C-25), 18.9 (C-26), 16.1 (C-27), 180.0 (C-28), 17.9 (C-29), 17.8 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[18], 故鉴定化合物 **5** 为 3-羟基-11-烯-11,12-脱氢-28,13-乌苏酸内酯。

化合物 **6**: 白色粉末 (醋酸乙酯), 1%香草醛浓硫酸溶液显色呈红色。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.72 (1H, brs, H-28a), 4.66 (1H, brs, H-28b), 3.10 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-26), 1.02 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-27), 1.01 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-21), 0.89 (6H, s, H-30, 31), 0.71 (3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 35.0 (C-1), 27.3 (C-2), 76.5 (C-3), 39.2 (C-4), 50.4 (C-5), 17.9 (C-6), 28.2 (C-7), 133.2 (C-8), 134.6 (C-9), 36.5 (C-10), 20.7 (C-11), 25.5 (C-12), 31.1 (C-13), 47.0 (C-14), 31.0 (C-15), 30.7 (C-16), 50.4 (C-17), 15.7 (C-18), 18.3 (C-19), 35.0 (C-20), 18.7 (C-21), 33.8 (C-22), 31.2 (C-23), 156.9 (C-24), 31.3 (C-25), 21.8 (C-26), 22.0 (C-27), 105.9 (C-28), 28.1 (C-29), 15.0 (C-30), 24.4

(C-31)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **6** 为大戟醇。

化合物 **7**: 白色粉末 (甲醇), 1%香草醛浓硫酸溶液显色呈蓝色。ESI-MS m/z : 487 $[M-H]^-$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.17 (1H, brs, H-12), 4.23 (1H, m, H-2), 3.91 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-3), 3.71 (1H, brs, H-24b), 3.54 (1H, brs, H-24a), 2.74 (1H, dd, J = 3.6, 13.2 Hz, H-18), 1.09 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-23), 0.88 (6H, s, H-30, 25), 0.85 (3H, s, H-29), 0.68 (3H, s, H-26); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 41.6 (C-1), 64.9 (C-2), 72.8 (C-3), 41.6 (C-4), 48.5 (C-5), 18.2 (C-6), 33.0 (C-7), 39.2 (C-8), 47.3 (C-9), 37.9 (C-10), 23.4 (C-11), 121.7 (C-12), 144.1 (C-13), 42.0 (C-14), 27.3 (C-15), 22.8 (C-16), 45.9 (C-17), 41.0 (C-18), 45.7 (C-19), 30.7 (C-20), 33.6 (C-21), 32.3 (C-22), 22.0 (C-23), 64.0 (C-24), 17.0 (C-25), 16.7 (C-26), 25.9 (C-27), 178.8 (C-28), 33.1 (C-29), 23.6 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[20], 故鉴定化合物 **7** 为 2 α ,3 α ,24-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸。

化合物 **8**: 黄色针状晶体 (甲醇), 紫外 254 nm 下呈暗斑, 365 nm 下呈亮黄色荧光, 1%香草醛浓硫酸溶液显色呈黄色。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.99 (1H, dt, J = 14.4, 8.6 Hz, H-1 α), 3.37 (1H, dt, J = 14.4, 6.8 Hz, H-1 β), 2.62 (2H, m, H-2), 2.41 (1H, dd, J = 14.4, 2.8 Hz, H-5 α), 2.55 (1H, dd, J = 16.4, 3.0 Hz, H-6 α), 2.74 (1H, dd, J = 16.4, 14.8 Hz, H-6 β), 3.32 (1H, m, H-15), 1.40 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-16), 1.39 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-17), 1.17 (3H, s, H-18), 1.17 (3H, s, H-19), 1.44 (3H, s, H-20), 3.81 (3H, s, OMe), 13.13 (1H, s, 14-OH), 5.72 (1H, s, 11-OH); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 36.2 (C-1), 34.5 (C-2), 215.7 (C-3), 46.9 (C-4), 48.9 (C-5), 35.5 (C-6), 204.3 (C-7), 112.0 (C-8), 138.9 (C-9), 38.9 (C-10), 133.3 (C-11), 152.4 (C-12), 126.8 (C-13), 158.1 (C-14), 26.1 (C-15), 20.3 (C-16), 20.3 (C-17), 27.0 (C-18), 20.9 (C-19), 17.5 (C-20), 62.2 (-OCH₃)。以上数据与文献对照基本一致^[21], 故鉴定化合物 **8** 为 candelabrone 12-methyl ether。

化合物 **9**: 黄色油状物, 1%香草醛浓硫酸溶液显色呈橘红色。ESI-MS m/z : 225 $[M-H]^-$, 227 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.46 (1H, m, H-3'), 5.44 (1H, m, H-2'), 3.55 (2H, t, J = 6.8 Hz,

H-5'a), 2.59 (1H, dd, $J = 14.4, 4.0$ Hz, H-2''b), 2.37 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-1'), 2.31 (2H, m, H-4'), 2.30 (1H, m, H-1), 2.24 (1H, m, H-5b), 2.08 (1H, m, H-4a), 1.99 (1H, m, H-2), 1.55 (1H, m, H-5a); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 40.7 (C-1), 56.3 (C-2), 223.6 (C-3), 39.6 (C-4), 29.2 (C-5), 27.1 (C-1'), 129.5 (C-2'), 130.1 (C-3'), 32.6 (C-4'), 63.4 (C-5'), 181.3 (C-1''), 40.8 (C-2''). 以上数据与文献报道基本一致^[22], 故鉴定化合物 **9** 为 cyclopentaneacetic acid。

化合物 **10**: 白色粉末 (甲醇), 1% 香草醛浓硫酸溶液显色呈蓝色。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 4.72 (1H, brs, H-28a), 4.66 (1H, brs, H-28b), 1.04 (3H, d, $J = 11.6$ Hz, H-18), 1.02 (3H, s, 27-Me), 1.01 (3H, m, 23, 25, 30-Me), 1.00 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 29-Me), 0.97 (3H, s, 24-Me), 0.93 (3H, s, 26-Me), 0.87 (3H, s, 26-Me), 0.87 (3H, s, 26-Me), 0.71 (3H, s, 26-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 47.3 (C-1), 67.4 (C-2), 82.5 (C-3), 38, 7 (C-4), 55.0 (C-5), 18.3 (C-6), 32.9 (C-7), 38.7 (C-8), 47.2 (C-9), 37.8 (C-10), 23.2 (C-11), 124.8 (C-12), 138.5 (C-13), 42.0 (C-14), 27.8 (C-15), 24.1 (C-16), 47.1 (C-17), 52.6 (C-18), 38.8 (C-19), 38.7 (C-20), 30.5 (C-21), 36.6 (C-22), 29.1 (C-23), 17.2 (C-24), 16.7 (C-25), 17.5 (C-26), 23.5 (C-27), 178.5 (C-28), 17.3 (C-29), 21.4 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[19], 故鉴定化合物 **10** 为 2 α -羟基熊果酸。

化合物 **11**: 白色针晶 (石油醚-醋酸乙酯), 1% 香草醛浓硫酸溶液显色呈紫红色。ESI-MS m/z : 435 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.15 (2H, dd, $J = 14.8, 8.8$ Hz, H-22, 23), 5.02 (1H, dd, $J = 14.8, 8.6$ Hz, H-7), 3.60 (1H, m, H-3), 1.55 (1H, s, OH), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.85 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-29), 0.82~0.80 (6H, m, H-26, 27), 0.80 (3H, s, H-19), 0.56 (3H, s, H-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 37.1 (C-1), 31.4 (C-2), 71.0 (C-3), 37.9 (C-4), 40.2 (C-5), 29.6 (C-6), 117.4 (C-7), 139.5 (C-8), 49.4 (C-9), 34.2 (C-10), 21.5 (C-11), 39.4 (C-12), 43.2 (C-13), 55.0 (C-14), 23.0 (C-15), 28.5 (C-16), 55.9 (C-17), 12.0 (C-18), 13.0 (C-19), 40.8 (C-20), 21.3 (C-21), 138.1 (C-22), 129.4 (C-23), 51.2 (C-24), 31.8 (C-25), 19.0 (C-26), 21.0 (C-27), 25.4 (C-28), 12.2 (C-29)。以上数据与文献报道基本一致^[23], 故鉴定化合物 **11** 为 α -菠甾醇。

化合物 **12**: 白色针状结晶 (氯仿), 1% 香草醛浓硫酸溶液显色呈紫红色。ESI-MS m/z : 455 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 457 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHCl_3) δ : 5.28 (1H, brs, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz, H-3), 2.82 (1H, dd, $J = 13.6, 4.0$ Hz, H-18), 1.13 (3H, s, 27-Me), 0.98 (3H, s, 23-Me), 0.93, 0.91, 0.90, 0.77, 0.75 (3H $\times$ 5, s, 29, 25, 26, 24-Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CHCl_3) δ : 38.4 (C-1), 27.1 (C-2), 79.0 (C-3), 38.7 (C-4), 55.2 (C-5), 18.3 (C-6), 32.4 (C-7), 39.3 (C-8), 47.6 (C-9), 37.1 (C-10), 23.4 (C-11), 122.6 (C-12), 143.6 (C-13), 41.6 (C-14), 27.8 (C-15), 23.6 (C-16), 46.5 (C-17), 40.9 (C-18), 45.9 (C-19), 30.7 (C-20), 33.8 (C-21), 32.6 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 15.3 (C-25), 17.1 (C-26), 25.9 (C-27), 183.4 (C-28), 22.9 (C-29), 33.0 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[24], 故鉴定化合物 **12** 为齐墩果酸。

化合物 **13**: 白色粉末 (氯仿), 1% 香草醛浓硫酸溶液显色呈红色。ESI-MS m/z : 455 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 457 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 5.13 (1H, brs, H-12), 3.00 (1H, m, H-3), 2.11 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-18), 1.04 (3H, s, H-27), 0.90 (3H, s, H-29, 23), 0.87 (3H, s, H-24), 0.81 (3H, s, H-30), 0.75 (3H, s, H-26), 0.68 (3H, s, H-25); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 38.5 (C-1), 24.1 (C-2), 77.1 (C-3), 36.8 (C-4), 55.0 (C-5), 18.3 (C-6), 33.0 (C-7), 38.8 (C-8), 47.1 (C-9), 36.8 (C-10), 21.3 (C-11), 124.8 (C-12), 138.4 (C-13), 41.9 (C-14), 27.2 (C-15), 23.1 (C-16), 47.3 (C-17), 52.6 (C-18), 38.7 (C-19), 38.6 (C-20), 30.4 (C-21), 36.6 (C-22), 28.5 (C-23), 16.3 (C-24), 15.5 (C-25), 17.2 (C-26), 23.5 (C-27), 178.5 (C-28), 17.2 (C-29), 21.0 (C-30)。以上数据与文献报道基本一致^[25], 故鉴定化合物 **13** 为熊果酸。

化合物 **14**: 白色针晶 (氯仿), mp 140~141 $^{\circ}\text{C}$ 。薄层色谱展开后以 1% 香草醛浓硫酸显紫红色, 与 β -谷甾醇对照品共薄层显相同斑点, 混合熔点不下降, 确认化合物 **14** 为 β -谷甾醇。

4 活性筛选

MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A 细胞株在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度环境下, 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基中培养、传代。接种时用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化, 加细胞培养基吹打成均匀细胞悬液, 将细胞制成 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中。称取一定量的样品, 用

DMSO 完全培养基配制成 100 mmol/L 的母液, 用 DMEM 配制成 200 mmol/L 的最高浓度工作液, 然后依次配制成 60、20、6、2、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。顺铂用 DMEM 完全培养基配制成浓度为 50、15、5、1.5、0.75、0.15 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液。待细胞贴壁后每孔加入含不同浓度样品或顺铂工作液 100 μL , 每个

浓度设 3 个复孔。分别于加药后 72 h 后, 每孔加 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL , 4 h 后将上清液吸出, 每孔加 DMSO 150 μL , 震荡待结晶完全溶解, 酶标仪 492 nm 测定吸光度 (A) 值。重复实验 3 次, 按公式计算各组的生长抑制率 (IR, $\text{IR} = 1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}}$)。用 SPSS 20.0 软件计算 IC_{50} 值。结果见表 1。

表 1 三萜化合物对乳腺癌细胞及正常乳腺细胞增殖抑制作用

Table 1 Inhibition of tested triterpenoids on proliferation of MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10A cells

化合物	MCF-7		MDA-MB-231		MCF-10A	
	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$^*E_{\text{max}}/\%$	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$^*E_{\text{max}}/\%$	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$^*E_{\text{max}}/\%$
顺铂	1.008	99.60	2.147	99.00	3.771	91.70
3	>100	<50	>100	<50	>100	<50
4	11.64	96.10	22.35	81.90	>100	<50
5	49.35	71.50	>100	<50	>100	<50
7	22.25	98.00	38.83	95.50	26.57	97.20
10	12.72	97.10	13.96	97.70	9.306	97.10
12	>100	<50	>100	<50	>100	<50
13	16.12	98.10	12.83	98.30	11.52	96.30

$^*E_{\text{max}}$ 为最大效能

$^*E_{\text{max}}$ is the maximum efficiency

5 结果及讨论

本实验从夏枯草中分离得到 14 个化合物, 其中化合物 2、5、6、8 和 9 为首次从夏枯草中分离, 同时也是首次从该属植物中分离, 丰富了其化学成分。并且本实验分离得到的化合物中主要为三萜, 且又首次分离得到 3-羟基-11-烯-11,12-脱氢-28,13-乌苏酸内酯和大戟醇 2 个三萜, 进一步佐证三萜为夏枯草中主要成分。

活性结果显示, 化合物 10 和 13 能明显抑制 MCF-7、MDA-MB-231、MCF-10A 细胞增殖; 化合物 4 对乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 显示出明显抑制活性, 而对 MCF-10A 抑制不明显, 能选择性地抑制肿瘤细胞。中医上, 夏枯草是一味软坚散结的传统中药, 临床上也广泛应用于乳腺增生、乳腺癌等。而现代药理研究表明, 夏枯草三萜是抗肿瘤的主要成分。因此, 对夏枯草中分离得到的主体成分三萜进行的抗乳腺癌的活性研究结果可能从物质基础上为揭示其发挥上述临床作用和药理活性提供依据。同时, 本研究为进一步研究夏枯草的物质基础奠定了基础。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 李 芳, 林丽美, 李 春, 等. 夏枯草化学成分研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 270-273.
- [3] Yu Q, Qi J, Wang L, *et al.* Pentacyclic triterpenoids from spikes of *Prunella vulgaris* L. inhibit glycogen phosphorylase and improve insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Phytother Res*, 2015, 29(1): 73-79.
- [4] Chiu L C M, Zhu W, Ooi V E C. A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in vero cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(1): 63-68.
- [5] Au T K, Lam T L, Ng T B, *et al.* A comparison of HIV-1 integrase inhibition by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs [J]. *Life Sci*, 2001, 68(14): 1687-1694.
- [6] Huang N, Hauck C, Yum M Y, *et al.* Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 and nitric oxide in RAW 264. 7 mouse macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(22): 10579-10589.
- [7] Feng L, Jia X, Zhu M M, *et al.* Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. *in vitro* and in tumor-bearing mice [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9145-9156.
- [8] 张德华. 夏枯草多糖的分离纯化与抗氧化活性研究

- [J]. 云南植物研究, 2006, 28(4): 410-414.
- [9] Feng L, Au-yeung W, Xu Y H, *et al.* Oleanolic acid from *Prunella vulgaris* L. induces SPC-A-1 cell line apoptosis via regulation of Bax, Bad and Bcl-2 expression [J]. *Asian Pac J Cancer Prevent*, 2011, 12(2): 403-408.
- [10] Lee I K, Kim D H, Lee S Y, *et al.* Triterpenoid acids of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* and their cytotoxic activities *in vitro* [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(12): 1578-1583.
- [11] 裴 慧, 钱士辉. 夏枯草中2个三萜类化合物的体外抗肿瘤活性研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(3): 43-45.
- [12] Woo H J, Jun D Y, Lee J Y, *et al.* Apoptogenic activity of 2 α ,3 α -dihydroxyurs-12-ene-28-oic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* is mediated via mitochondria-dependent activation of caspase cascade regulated by Bcl-2 in human acute leukemia Jurkat T cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(3): 626-635.
- [13] 周新颖. 夏枯草粗提物抑制乳腺癌细胞增殖和逆转耐药的作用与机制初探 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2006.
- [14] 梁侨丽, 闵知大, 成 亮, 等. 地胆草中的两个寡肽 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(3): 178-180.
- [15] Jinming G, Lin H, Jikai L. A novel sterol from Chinese truffles *Tuber indicum* [J]. *Steroids*, 2001, 66(10): 771-775.
- [16] 钟海军, 罗士德, 王惠英, 等. 万丈深的化学成分 [J]. 云南植物研究, 1999, 21(4): 531-534.
- [17] Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, *et al.* ¹³C Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(3): 1006-1008.
- [18] 孔娜娜, 方圣涛, 刘 莺, 等. 罗布麻叶中非黄酮类化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3114-3118.
- [19] 张小坡, 裴月湖, 刘明生, 等. 海芒果叶中三萜类成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(3): 443-445.
- [20] Kojima H, Tominaga H, Sato S, *et al.* Pentacyclic triterpenoids from *Prunella vulgaris* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(4): 1107-1111.
- [21] Mendes E, Marco J L, Rodriguez B, *et al.* Diterpenoids from *Salvia candelabrum* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(6): 1685-1690.
- [22] Fujita T, Terato K, Nakayama M. Two jasmonoid glucosides and a phenylvaleric acid glucoside from *Perilla frutescens* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, 60(4): 732-735.
- [23] 段 洁, 李 巍, 胡旭佳, 等. 九子参化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 528-530.
- [24] 卢汝梅, 杨长水, 韦建华, 等. 荔枝草化学成分的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 859-862.
- [25] 李胜华, 李爱民, 伍贤进, 等. 接骨草化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1502-1504.