

走马胎三萜皂苷衍生物的生物转化制备及其抗肿瘤活性研究

穆丽华, 张 静, 刘 屏*

中国人民解放军总医院 药理药理学研究室, 北京 100853

摘 要:目的 利用走马胎内生菌 *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955) 和果胶酶 Ultra AFP 对走马胎三萜皂苷 Ag3 进行生物转化, 制备具有抗肿瘤活性的三萜皂苷衍生物。方法 采用硅胶柱色谱分离技术对转化产物进行分离; 采用波谱技术进行化合物结构鉴定; 采用 CCK 法进行细胞毒活性测试。结果 制备得到 5 个三萜皂苷衍生物: 3 β -O- $\{\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-西克拉敏 A (1)、3 β -O- $\{\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-西克拉敏 A (2)、3 β -O- $\{\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-西克拉敏 A (3)、3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖基-西克拉敏 A (4) 和西克拉敏皂苷元 A (5)。结论 化合物 2~5 为首次从走马胎三萜皂苷生物转化产物中分离得到, 所得部分产物具有一定的抗肿瘤活性, 其中化合物 2 对肝癌细胞的抑制活性强于底物和阳性药顺铂。

关键词: 走马胎; 三萜皂苷; 生物转化; 内生菌; 果胶酶; 抗肿瘤; 3 β -O- $\{\beta$ -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-葡萄糖吡喃糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-阿拉伯吡喃糖基}-西克拉敏 A; 西克拉敏皂苷元 A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1266-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.006

Biotransformation and antitumor activity of triterpenoid derivatives from *Ardisia gigantifolia*

MU Li-hua, ZHANG Jing, LIU Ping

Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of transformed products by *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955) and Pectinex Ultra AFP from the saponin of *Ardisia gigantifolia*. **Methods** Transformation products separated by the process of silica gel column, compounds were identified and elucidated by spectral and chemical methods. Their cytotoxicity activities were tested by Cell Counting Kit 8 colorimetric assay. **Results** Five triterpenoid saponins were obtained, including 3 β -O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-arabinopyranosyl}-cyclamiretin A (1), 3 β -O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranoside}-cyclamiretin A (2), 3 β -O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopyranoside}-cyclamiretin A (3), 3-O- α -L-arabinopyranosyl cyclamiretin A (4), and cyclamiretin A (5). **Conclusion** Compounds 2~5 are obtained by biotransformation for the first time. Some of the compounds showed certain antitumor activity, among them, compound 2 shows more cytotoxicity activity than Ag3 and positive control.

Key words: *Ardisia gigantifolia* Stapf.; triterpenoid saponins; biotransformation; endophyte; enzyme; antitumor; 3 β -O- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranoside}-cyclamiretin A; cyclamiretin A

走马胎 *Ardisia gigantifolia* Stapf. 又名大叶紫金牛, 为民间常用的跌打损伤药, 可用于治疗跌打损伤、风湿关节痛、产后瘀血及溃疡等^[1]。三萜皂苷是走马胎中的主要成分, 近年研究表明该类成分具有一定的抗肿瘤作用^[2-5]。本课题组前期研究发

现, 化合物 3 β -O- $\{\alpha$ -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-吡喃木糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)-[β -D-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-吡喃阿拉伯糖基}-西克拉敏 A (Ag3) 对人胃癌细胞 BCG-823、人宫颈癌细胞 HeLa、人膀胱癌细胞 EJ 和人肝癌细胞 HepG-2

收稿日期: 2017-09-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370006)

作者简介: 穆丽华 (1976—), 女, 副主任药师, 研究方向为天然药物化学。Tel: (010)66937909 E-mail: mulihua301@126.com

*通信作者 刘 屏 (1966—), 女, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药药理及中药化学。Tel: (010)66936676 E-mail: cpi301@163.com

具有较好的抑制作用,其 IC_{50} 值分别为 2.1、1.8、2.0 和 1.9 $\mu\text{mol/L}$ 。为了获得具有不同糖链结构的化合物,课题组通过 20%硫酸甲醇对该化合物进行了酸水解,结果获得了 4 个 13, 28 氧环遭到破坏的水解产物^[6]。化学合成过程较复杂,且副产物多、产率低、很难得到特定的产物。生物转化是由细胞、器官或酶催化的化学反应,可应用于复杂底物的特定转化,包括水解、羟基化和糖基化等^[7-9]。相比而言,生物转化则具有更强的结构选择性和特异性,非常有利于三萜皂苷这类化合物的合成及结构修饰。

本课题组从走马胎茎叶中分离、筛选出一种活性菌株,经鉴定为 *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955),其对 Ag3 具有转化作用。筛选 4 种具有水解作用的酶,发现果胶酶(Pectinex)Ultra AFP 对 Ag3 具有转化作用。本实验将转化后的产物通过硅胶柱色谱进行分离,共得到 5 个糖链部分不同的单体化合物,分别鉴定为 $3\beta\text{-O-}\{\alpha\text{-L-吡喃鼠李糖基-(1}\rightarrow\text{3)-}[\beta\text{-D-吡喃木糖基-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}\}$ -西克拉敏 A ($3\beta\text{-O-}\{\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1}\rightarrow\text{3)-}[\beta\text{-D-xylopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl}\}$ -cyclamiretin A, **1**)、 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{2)]-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}\}$ -西克拉敏 A ($3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{4)-}[\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)]-}\alpha\text{-L-arabinopyranoside}\}$ -cyclamiretin A, **2**)、 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}\}$ -西克拉敏 A ($3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-glucopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-arabinopyranoside}\}$ -cyclamiretin A, **3**)、 $3\text{-O-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基-西克拉敏 A}$ ($3\text{-O-}\alpha\text{-L-arabinopyranosyl cyclamiretin A}$, **4**)、西克拉敏皂苷元 A (cyclamiretin A, **5**)。结构见图 1。化合物 **1**~**5** 为首次从走马胎三萜皂苷生物转化产物中分离得到,该 5 个化合物尚未有从走马胎植物中分离得到的报道。并通过 CCK 法对底物转化产物进行了初步的抗肿瘤活性筛选。

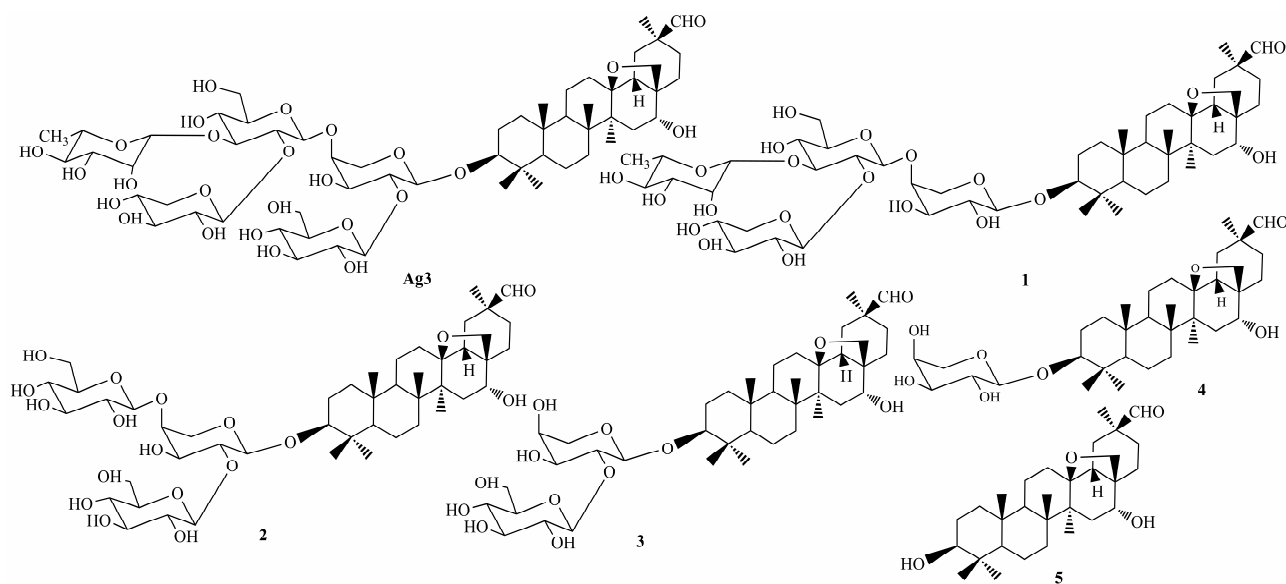


图 1 走马胎三萜皂苷 Ag3 及其转化产物的结构

Fig. 1 Structures of triterpenoid saponin Ag3 and its biotransformation derivatives

1 材料与方法

1.1 仪器

INOVA600 核磁共振仪 (美国 Varian 公司); SYNAPT MS 高分辨质谱仪 (美国 Waters 公司); API 3000 质谱仪 (美国 ABI 公司); 高效液相色谱仪 (包括 L-2130 泵, L-2450 紫外检测器, L-2200 自动进样器), 日本 Hitachi 公司; 2000ES 蒸发光散射检测器 (美国 Alltech 公司); ZDP-2120 恒温培养

箱和 ZHWY-211C 旋转式摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); Autoclave MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅 (日本 Sanyo 公司); IX51 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯有限公司)。薄层、色谱柱色谱硅胶 (青岛海洋化工厂)。

1.2 试剂与药品

Ag3 由中国人民解放军总医院临床药理研究室分离、纯化得到,质量分数 98%。马铃薯、葡萄糖

(市售); 琼脂 (郑州智逸化工产品有限公司); 注射用顺铂 (齐鲁制药有限公司, 批号 2090271DB)。CCK-8 试剂盒 (日本株式会社同仁化学研究所); RPMI 1640 培养基 (Gibco BRL); Rnase A、胎牛血清、二甲基亚砜 (DMSO)、胰蛋白酶 (均购自上海生物工程有限公司); 二氯甲烷、一水柠檬酸、十二水磷酸氢二钠、醋酸乙酯、正丁醇和甲醇等分析试剂均由国药集团化学试剂有限公司提供, 水为哇哈哈纯净水。

1.3 细胞

人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 Bel-7402、人宫颈癌细胞 HeLa、人鼻咽癌细胞 CNE、人胃癌细胞 HepG-2 均购于中国医学科学院肿瘤研究所。

1.4 微生物和酶

走马胎内生菌由本实验室从走马胎新鲜茎叶中分离获得, 经中国医学科学院医药生物技术研究所孙承航教授鉴定为 *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955); 果胶酶 (Pectinex) Ultra AFP (SON60088) 购自诺维信 (中国) 生物技术有限公司。

1.5 ISP2 培养基

酵母提取物 0.4 g、麦芽浸粉 0.5 g、琼脂 2 g、葡萄糖 0.4 g、复合维生素 100 μ L、微量盐 100 μ L、蒸馏水 100 mL。培养基 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15~20 min, 冷却至 50~60 $^{\circ}$ C 时加入抑制剂萘啶酮酸 2.5 mg/L、放线菌酮 5 mg/L、重铬酸钾 2.5 mg/L。

1.6 生物转化

1.6.1 微生物转化 在菌的筛选过程中需设空白底物 (即将底物加入到未接种菌株的无菌液体培养基中, 并与实验组相同的培养条件和处理方法, 从而确定 Ag3 在培养基中是否产生自身代谢产物) 和空白菌株对照组 (即按照与实验组相同的实验条件接种菌株, 并加入相同量的溶解 Ag3 的溶剂, 以排除微生物本身产生的次级代谢物对实验结果造成的影响)。考察了培养时间 (2、6、11 d) 对生物转化率的影响。最终确定 *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955) 培养 11 d 后可以较好地转化底物 Ag3。

Sphingomonas yabuuchiae GTC 868^T (AB071955) 接种于灭菌的改良 ISP2 液体培养基中, 在 28 $^{\circ}$ C 活化过夜。将活化后的菌株分别接种到 4 瓶 500 mL 新鲜的液体培养基中, 培养条件为 28 $^{\circ}$ C、100 r/min, 培养 3 d, 使菌株处于旺盛生长期, 加入底物 400 mg 进行共培养 (底物用甲醇溶

解, 甲醇在共培养体系中的终体积分数为 0.25%, 走马胎三萜皂苷底物在培养体系中的终质量浓度为 0.2 mg/mL), 持续培养 11 d。

1.6.2 酶转化 以 Ag3 (150 μ L 溶解于 pH 4 的缓冲液中, 质量浓度为 1 mg/mL) 作为底物, 利用果胶酶 Ultra AFP 对反应时间 (15、21、27、32、48、52、56 h)、反应 pH 值 (2.2、3、4、5、6、7、8)、反应温度 (20、30、40、50、60 $^{\circ}$ C) 进行考察。采用 TLC 分析方法, 测定产物的量作为酶活性指标。确定最佳反应条件为 50 $^{\circ}$ C, pH 4, 反应时间 52 h。

称取底物 500 mg, 溶解于盛有 300 mL 缓冲液 (pH 4) 的 500 mL 锥形瓶中, 加入 8 mL 果胶酶 Ultra AFP, 同样操作制备 4 份反应体系, 全部置于 50 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 52 h。

1.7 转化产物的分离

将微生物滤过, 先用等量醋酸乙酯萃取 3 次, 再用水饱和过的正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇萃取液, 浓缩, 得转化产物粗品 650 mg。将所得残渣通过硅胶柱色谱法进行分离, 氯仿-甲醇-水 (8:2:0.2) 洗脱, 得到转化产物化合物 1 (40.2 mg)、底物 Ag3 (120 mg)。

将酶反应液滤过, 先用等量醋酸乙酯萃取 3 次, 再用水饱和过的正丁醇萃取 3 次, 分别合并醋酸乙酯萃取液和正丁醇萃取液, 浓缩, 得醋酸乙酯转化产物粗品 280 mg, 正丁醇层转化产物粗品 350 mg。将正丁醇层所得残渣通过硅胶柱色谱法进行分离, 氯仿-甲醇-水 (8:2:0.2、7:3:0.5) 依次洗脱, 得到化合物 2 (36.3 mg)、3 (22.8 mg), 底物 Ag3 (85 mg)。将醋酸乙酯层所得残渣通过硅胶柱色谱法进行分离, 氯仿-甲醇 (9:1)、氯仿-甲醇-水 (9:1:0.1) 洗脱, 从而得转化产物化合物 4 (19 mg)、5 (10 mg)。

2 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末; 乙酸酐-浓硫酸反应和 α -萘酚-浓硫酸反应均呈阳性; 用含 10% 硫酸的乙醇显色剂显色呈紫红色, 推测该化合物可能为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 给出 m/z : 1 067 [$M+Na$]⁺, 结合核磁共振谱分析结果确定其分子式为 $C_{52}H_{84}O_{21}$ 。¹H-NMR (600 MHz, pyridine-*d*₅) 谱图中, 6 个角甲基质子信号 δ_H 0.87 (3H, s, Me-25), 1.05 (3H, s, Me-29), 1.01 (3H, s, Me-24), 1.20 (3H, s, Me-23), 1.28 (3H, s, Me-26), 1.55 (3H, s, Me-27) 及鼠李糖 6 位的甲基质子信号 δ_H 1.63 (3H, d, $J = 6.0$

Hz) 出现在高场区; 4 个糖的端基质子信号 δ_{H} 5.91 (1H, brs, Rha-H-1), 5.01 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, Xyl-H-1), 4.85 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, Glu-H-1), 4.60 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, Ara-H-1) 以及 1 个醛氢信号 δ_{H} 9.62 (1H, s) 出现在低场区。跟底物 Ag3 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据相对比, 发现少了 1 个末端葡萄糖。通过查阅文献, 发现 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据 (表 1、2) 与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 **1** 为 $3\beta\text{-O-}\{\alpha\text{-L-吡喃鼠李糖基-(1}\rightarrow\text{3)}\text{-}[\beta\text{-D-吡喃木糖基-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\beta\text{-D-吡喃葡萄}$

表 1 生物转化产物 1~5 苷元部分碳谱 (150 MHz, pyridine- d_5)
Table 1 $^{13}\text{C-NMR}$ data for aglycone moieties of 1—5 (150 MHz, pyridine- d_5)

碳位	1	2	3	4	5
1	39.1	39.7	39.3	39.3	38.9
2	26.6	26.6	26.7	26.9	27.4
3	89.0	89.0	88.8	88.7	86.3
4	39.5	39.2	39.7	39.7	39.0
5	55.7	55.7	55.7	55.8	55.1
6	18.0	18.0	18.0	18.0	17.7
7	34.4	33.4	34.4	32.4	34.0
8	42.1	44.1	42.6	42.6	42.2
9	50.5	50.5	50.5	53.4	50.1
10	36.5	36.9	36.9	42.6	36.9
11	19.8	19.8	19.2	18.6	18.6
12	32.4	34.4	32.7	30.0	32.2
13	86.4	86.4	86.4	86.4	86.3
14	44.7	44.7	44.7	44.1	44.0
15	36.9	36.9	36.9	32.7	37.1
16	77.3	77.7	77.0	77.0	76.8
17	44.2	44.7	44.1	48.3	43.6
18	53.4	53.4	53.4	50.5	52.4
19	33.5	30.5	33.4	33.4	33.1
20	48.3	48.3	48.4	36.9	48.0
21	30.5	30.5	30.5	37.0	30.0
22	32.7	32.7	32.4	30.5	31.5
23	28.2	28.2	28.2	24.1	28.0
24	16.5	16.5	16.8	16.8	16.1
25	16.5	16.5	16.5	16.5	15.3
26	18.6	18.6	18.6	18.6	18.1
27	19.2	19.2	19.8	19.2	19.6
28	77.9	78.7	77.7	77.7	77.2
29	24.2	24.2	24.2	28.2	23.9
30	207.5	207.5	207.5	207.5	207.1

糖-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}$ }-西克拉敏 A。

化合物 **2**: 白色无定形粉末; $\alpha\text{-萘酚-浓硫酸}$ 反应和乙酸酐-浓硫酸反应均为阳性; 10%硫酸乙醇显色呈紫红色, 推测该化合物可能为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 给出 m/z : 951 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱确定分子式为 $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, pyridine- d_5) 中, 6 个角甲基氢信号 δ_{H} 0.87 (3H, s, Me-25), 1.07 (3H, s, Me-29), 1.01 (3H, s, Me-24), 1.17 (3H, s, Me-23), 1.30 (3H, s, Me-26), 1.54 (3H, s, Me-27) 出现在高场区; 低场区则出现了 3 个糖的端基质子信号 δ_{H} 5.18 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, terminal Glu-H-1), δ_{H} 5.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, inner Glu-H-1), δ_{H} 4.95 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, Ara-H-1) 以及 1 个醛氢信号 δ_{H} 9.62 (1H, s)。跟底物 Ag3 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据相对比, 皂苷元部分基本相同, 不同之处在于糖链部分少了 1 个鼠李糖和 1 个木糖。 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据 (表 1、2) 与文献报道的数据基本一致^[11], 故化合物 **2** 为底物脱去鼠李糖和木糖的产物 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}[\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}\}$ -西克拉敏 A。

化合物 **3**: 白色无定形粉末; $\alpha\text{-萘酚-浓硫酸}$ 反应和乙酸酐-浓硫酸反应均为阳性; 10%硫酸乙醇显色呈紫红色, 提示该化合物可能为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 给出 m/z : 789 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 结合核磁数据确定分子式为 $\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{13}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, pyridine- d_5) 中, 6 个角甲基氢信号 δ_{H} 0.86 (3H, s, Me-25), 0.96 (3H, s, Me-29), 1.01 (3H, s, Me-24), 1.21 (3H, s, Me-23), 1.29 (3H, s, Me-26), 1.54 (3H, s, Me-27) 出现在高场区, 6 个角甲基的氢信号是三萜皂苷类化合物的特征信号; 低场区则出现了醛氢信号 δ_{H} 9.62 (1H, s)。跟底物 Ag3 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据相对比, 不同之处在于糖链部分只保留了 1 个阿拉伯糖和 1 个末端葡萄糖。通过查阅文献, 发现 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据 (表 1、2) 与文献报道基本一致^[12], 故鉴定化合物 **3** 为 $3\beta\text{-O-}\{\beta\text{-D-吡喃葡萄糖基-(1}\rightarrow\text{2)}\text{-}\alpha\text{-L-吡喃阿拉伯糖基}\}$ -西克拉敏 A。

化合物 **4**: 白色无定形粉末; $\alpha\text{-萘酚-浓硫酸}$ 反应和乙酸酐-浓硫酸反应均为阳性; 10%硫酸乙醇显色呈紫红色, 从而提示该化合物可能为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 给出 m/z : 622 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 结合核磁数据确定分子式为 $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_8$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, pyridine- d_5) 中, 6 个角甲基氢信号 δ_{H} 0.86 (3H, s, Me-25), 0.96 (3H, s, Me-29), 1.01 (3H, s, Me-24),

表 2 生物转化产物 1~4 糖链部分碳谱 (150 MHz, pyridine-*d*₅)Table 2 ¹³C-NMR data for sugar moieties of 1–4 (150 MHz, pyridine-*d*₅)

碳位	1	碳位	2	碳位	3	碳位	4
Ara-1	107.1	Ara-1	104.4	Ara-1	104.8	Ara-1	107.5
2	74.7	2	78.7	2	81.1	2	73.0
3	73.4	3	72.4	3	73.4	3	74.7
4	81.4	4	78.4	4	68.3	4	69.5
5	65.7	5	62.7	5	64.8	5	66.8
Glc-1	105.4	terminal Glc-1	105.8	Glu-1	106.1		
2	81.7	2	75.7	2	76.4		
3	86.7	3	77.7	3	78.2		
4	69.5	4	71.5	4	71.6		
5	78.1	5	78.1	5	78.2		
6	62.7	6	62.7	6	62.6		
Xyl-1	105.6	inner Glc-1	102.0				
2	75.7	2	75.7				
3	77.7	3	77.7				
4	71.0	4	71.7				
5	66.2	5	78.2				
Rha-1	103.7	6	62.7				
2	72.2						
3	72.6						
4	73.6						
5	70.6						
6	18.4						

1.21 (3H, s, Me-23), 1.29 (3H, s, Me-26), 1.55 (3H, s, Me-27) 出现在高场区, 它们是三萜皂苷类化合物的特征信号; 低场区则出现了 1 个糖的端基质子信号 δ_{H} 4.77 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, Ara-H-1), 以及 1 个醛氢信号 δ_{H} 9.62 (1H, brs)。跟底物 Ag3 的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱数据相对比, 不同之处在于糖链部分只保留了 1 个阿拉伯糖。核磁共振碳谱 (表 1、2) 数据与文献报道基本一致^[13], 故鉴定化合物 4 为 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基-西克拉敏 A。

化合物 5: 白色无定形粉末; α -萘酚-浓硫酸反应和乙酸酐-浓硫酸反应均为阳性; 10%硫酸乙醇显色呈紫红色, 提示该化合物可能为三萜皂苷类化合物。ESI-MS 显示 m/z : 495 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 结合核磁数据确定分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 。¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3) 中, 高场区域显示了 6 个角甲基质子氢信号 δ_{H} 0.74 (3H, s, Me-25), 0.84 (3H, s, Me-29), 0.95 (3H, s, Me-24), 0.98 (3H, s, Me-23), 1.11 (3H, s, Me-26), 1.22 (3H, s, Me-27), 它们是三萜皂苷类成分

的特征信号; 低场区出现了 1 个醛氢信号 δ_{H} 9.40 (1H, s)。通过与底物的 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱数据相对比, 该化合物为底物脱去糖链后的皂苷元, 其 ¹³C-NMR 谱数据 (表 1、2) 与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 5 为西克拉敏皂苷元 A。

3 细胞毒活性测试

实验选择 A549、Bel-7402、HeLa、CNE、HepG-2 细胞作为测试细胞, 采用 CCK-8 试剂盒对走马胎三萜皂苷底物 Ag3 及 5 个生物转化产物进行细胞毒活性测试, 以顺铂作为阳性对照药物。化合物对 5 种肿瘤细胞的生长抑制活性见表 3。

研究结果 (表 3) 发现, 化合物 4、5 对 5 株肿瘤细胞均无显著抑制作用; 化合物 3 对这些细胞均表现出一定的抑制作用, 而对 CNE 的抑制效果不明显; 化合物 1 对 6 种细胞都表现出明显的抑制作用; 化合物 2 对各细胞株的抗肿瘤活性最为显著, 尤其对人肝癌细胞 HepG-2 的细胞毒活性较底物 Ag3 和阳性药顺铂更佳。

表3 化合物对不同肿瘤细胞的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 3 IC₅₀ value of different drugs on different tumor cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)				
	CNE	HepG-2	HeLa	A549	Bel-7402
1	48.19 $\pm$ 0.33	22.30 $\pm$ 1.37	19.88 $\pm$ 0.77	32.03 $\pm$ 0.80	30.80 $\pm$ 0.62
2	18.90 $\pm$ 0.58	14.49 $\pm$ 0.89	20.01 $\pm$ 0.61	16.34 $\pm$ 0.22	14.42 $\pm$ 0.09
3	>50	33.50 $\pm$ 1.02	34.71 $\pm$ 0.42	41.53 $\pm$ 0.39	34.85 $\pm$ 0.77
4	>50	>50	>50	>50	>50
5	>50	>50	>50	>50	>50
Ag3	10.96 $\pm$ 0.27	30.71 $\pm$ 0.55	10.70 $\pm$ 0.53	4.59 $\pm$ 0.52	13.88 $\pm$ 0.87
顺铂	30.22 $\pm$ 0.43	17.77 $\pm$ 0.58	43.61 $\pm$ 1.21	11.40 $\pm$ 1.78	32.96 $\pm$ 0.94

4 讨论

通过生物转化的方法可以定向改造底物得到一系列的衍生物,且这些类似物中不乏药理活性较高的化合物。课题组前期利用燕麦曲霉 *Aspergillus avenaceus* AS 3.4454 和链格孢酶 *Alternaria alternata* AS 3.6872 对底物 Ag3 进行了转化研究,获得了羟基化和脱去末端葡萄糖的新化合物^[15-16]。本实验首次对走马胎新鲜茎叶中的内生菌进行分离鉴定,并筛选对 Ag3 有水解活性的菌,发现活性菌种 *Sphingomonas yabuuchiae* GTC 868^T (AB071955)。同时筛选多种市售的酶,发现果胶酶 (Pectinex) Ultra AFP 能将底物 Ag3 转化为小极性化合物。本实验选择通过这两种菌和酶将 Ag3 转化为糖链中有不同糖基个数的化合物 1~5, 并进行了抑制肿瘤细胞增殖的活性研究,发现了抗肿瘤活性较强次生皂苷化合物 2, 为走马胎皂苷的综合利用和抗肿瘤新药的研究提供依据。

参考文献

- [1] 卢文杰, 王雪芬, 陈家源, 等. 大叶紫金牛化学成分的研究 [J]. 华西药志, 1990, 5(3): 136-138.
- [2] Li W, Bi X Y, Wang K, et al. Triterpenoid saponins from *Impatiens sicutifera* [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(6): 816-821.
- [3] Gong Q Q, Mu L H, Liu P, et al. New triterpenoid saponin from *Ardisia gigantifolia* Stapf. [J]. *Chin Chem Lett*, 2010, 21: 449-452.
- [4] Mu L H, Gong Q Q, Zhao H X, et al. Triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia* Stapf. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(9): 1248-1251.
- [5] Mu L H, Wei N Y, Liu P. Cytotoxic triterpenoid saponins from *Ardisia gigantifolia* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 617-621.
- [6] Mu L H, Huang C L, Zhou W B, et al. Methanolysis of triterpenoid saponin from *Ardisia gigantifolia* Stapf. and structure-activity relationship study against cancer cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(22): 6073-6078.
- [7] Giri A, Dhingra V, Giri C C, et al. Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(3): 175-199.
- [8] Su J, Xu J H, Lu W Y, et al. Enzymatic transformation of ginsenoside Rg3 to Rh2 using newly isolated *Fusarium proliferatum* ECU2042 [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2006, 38: 113-118.
- [9] Zhan J X, Guo H Z, Dai J G, et al. Microbial transformations of artemisinin by *Cunninghamella echinulata* and *Aspergillus niger* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(25): 4519-4521.
- [10] 谷永杰. 走马胎三萜皂苷类化合物的分离及 Ag3 的生物转化研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2014.
- [11] Ihsan C, Aysen Y, Nevin T, et al. Triterpenoid saponins from *Cyclamen coum* var. *coum* [J]. *Planta Med*, 1997, 63(2): 166-170.
- [12] Chaweevan J, Herbert B, Lennart K, et al. Ardisiacrispin A and B, two utero-contracting saponins from *Ardisia crispa* [J]. *Planta Med*, 1987, 53(5): 405-409.
- [13] Zhang G X, Zhang D M, Chen M F, et al. Antiproliferative triterpenoid saponins from the stem of *Psychotria* sp. [J]. *Planta Med*, 2013, 79(11): 978-986.
- [14] 刘岱琳, 张晓明, 王乃利, 等. 紫金牛属植物中三萜皂苷类成分核磁共振波谱学特征 [J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 394-400.
- [15] Mu L H, Gu Y J, Wang L H, et al. Biotransformation on the triterpenoid saponin of *Ardisia gigantifolia* by *Aspergillus avenaceus* AS 3.4454 [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17(1): 40-46.
- [16] Mu L H, Gu Y J, Ma B P, et al. Two new triterpenoid saponins obtained by microbial hydrolysis with *Alternaria alternata* AS 3.6872 [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(7): 638-643.