

艾纳香中 1 个新倍半萜内酯及其细胞毒活性研究

胡 永^{1,2,3}, 段玉书^{1,2}, 苑春茂^{1,2}, 黄烈军^{1,2}, 李 霞⁴, 顾 玮^{1,2*}, 郝小江^{1,2*}

1. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014

2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014

3. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025

4. 贵州宏宇药业有限公司, 贵州 贵阳 550018

摘 要: 目的 研究黔产艾纳香 *Blumea balsamifera* 叶中的化学成分并对其进行细胞毒活性评价。方法 使用硅胶柱色谱、薄层色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等方法分离纯化艾纳香中化学成分, 以宫颈癌 (HeLa) 细胞株、乳腺癌 (MCF-7) 细胞株、肺腺癌 (A549) 细胞株、胃癌 (MGC-803) 细胞株、结肠癌 (COLO-205) 细胞株为供试细胞株, 并采用 MTT 法对分离纯化的化合物进行细胞毒活性筛选。结果 从艾纳香中分离得到 2 个倍半萜内酯, 通过波谱数据分析鉴定为艾纳香烯 N (1) 和艾纳香烯 F (2)。细胞毒活性筛选结果表明化合物 1 对供试的 5 种细胞株均具有明显的抑制活性, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 48.730~97.907 μmol/L; 化合物 2 对乳腺癌 MCF-7 细胞株也具有一定的抑制活性, IC₅₀ 值为 91.188 μmol/L。结论 化合物 1 为新的倍半萜内酯类化合物; 活性筛选结果表明 2 个倍半萜内酯类化合物都具有一定的细胞毒活性。

关键词: 艾纳香; 新倍半萜内酯化合物; 艾纳香烯 N; 细胞毒活性; MTT 法

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)14-3274-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.003

A new sesquiterpenoid ester from *Blumea balsamifera* and its cytotoxic activity

HU Yong^{1,2,3}, DUAN Yu-shu^{1,2}, YUAN Chun-mao^{1,2}, HUANG Lie-jun^{1,2}, LI Xia⁴, GU Wei^{1,2}, HAO Xiao-jiang^{1,2}

1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China

3. School of Pharmaceutical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

4. Guizhou Hongyu Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China

Abstract: Objective In order to further study the chemical constituents of *Blumea balsamifera* and evaluate the cytotoxic activities of the compounds. **Methods** The chemical components of *B. balsamifera* were purified by various chromatographic methods. MTT method was employed to screen the cytotoxic activities to the five tumor cells (HeLa, MCF-7, A549, MGC-803 and COLO-205 cells) of the purified compounds. **Results** Two sesquiterpenoid esters blumeaene N (compound 1) and blumeaene F (compound 2) were isolated from *B. balsamifera*, of which, blumeaene N was a novel compound. The screening results of cytotoxin activities showed that compound 1 had certain inhibitory activities for the five tumor cells with the IC₅₀ value ranges from 48.730 μmol/L to 97.907 μmol/L; Compound 2 also had a weak inhibitory activity on MCF-7 cell lines with the IC₅₀ value of 91.188 μmol/L. **Conclusion** Compound 1 is a new sesquiterpenoid ester found from *B. balsamifera*. Cytotoxic activities screening results indicated that *B. balsamifera* contains anti-tumor active ingredients.

Key words: *Blumea balsamifera* DC.; new sesquiterpenoid ester; blumeaene N; cytotoxic activity; MTT method

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31600280); 国家自然科学基金资助项目 (31860074); 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2018] 2799 号); 黔科合平台人才 (2017-5737); 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室开放课题项目 (FAMP201704K)

作者简介: 胡 永 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学及其药理活性。E-mail: 15873138830@163.com

*通信作者 郝小江 Tel: (0851)63804492 E-mail: haoxj@mail.kib.ac.cn

顾 玮 Tel: (0851)63804492 E-mail: guwei@mail.kib.ac.cn

艾纳香 *Blumea balsamifera* DC. 是菊科艾纳香属多年生草本植物, 别名大风艾、冰片艾等, 生长于海拔 300~800 m 的山坡灌丛, 我国主要分布在贵州、云南、广西、广东、海南等地^[1-2]。艾纳香具有祛风除湿、温中止泻、活血解毒的功效, 常用于治疗风寒感冒、风湿痹痛、寒湿泻痢、跌打损伤等, 对痈肿疮疖、皮癣等皮肤损伤也有较好的疗效, 为贵州省汉族、苗族、布依族等民族习用药物^[3]。近年来, 随着对艾纳香的化学成分和药理作用的深入研究, 越来越多具有生物活性的化合物被发现, 艾纳香中多种化合物被证实具有抗肿瘤^[4-5]、抗氧化^[6-7]、抗菌^[8-9]等药理活性。现阶段的研究多集中在艾纳香中含有的挥发油及黄酮类成分, 对其他类型成分研究相对较少^[10-11]。已有的文献报道^[12-14]从艾纳香中分离得到 17 个倍半萜类化合物, 目前尚未有证据表明这一类倍半萜类化合物是艾纳香抗肿瘤的药效基础。为了进一步寻找艾纳香中具有抗肿瘤的活性成分, 本研究运用硅胶、Sephadex LH-20 等柱色谱进行分离鉴定, 得到了 2 个倍半萜内酯类化合物, 分别为艾纳香烯 N (blumeaene N, **1**)、艾纳香烯 F (blumeaene F, **2**), 结构见图 1。其中, 化合物 **1** 为新化合物, 运用 MTT 法对得到的 2 个倍半萜内酯类化合物进行了细胞毒活性评价。

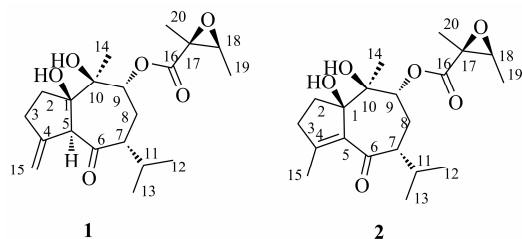


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的结构

Fig. 1 Structures of compounds **1** and **2**

1 仪器与材料

1.1 药材

艾纳香鲜叶样品于 2016 年 9 月由贵州宏宇药业有限公司提供, 由省部共建药用植物功效与利用重点实验室, 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室顾玮副研究员鉴定为艾纳香 *Blumea balsamifera* DC. 叶。凭证标本 (LPANX-2) 保存在贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室。

1.2 仪器与试剂

EYELA N-1100 旋转蒸发仪 (日本东京理化器

械株式会社); BioTek Epoch 全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); Bruker AvanceIII400 MHz 及 500 MHz 核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); QSTAR Pulsar I 型串连四极杆飞行时间液质联用质谱仪 (美国 Applied Biosystems 公司); API-Qstar-Pulsar 质谱仪 (美国 Applied Biosystems 公司); Bruker Tensor 27 红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); 硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); RP₁₈ (40~63 μm, 日本富士硅化学株式会社); Sephadex LH-20 (25~100 μm, Pharmacia 公司); 石油醚、醋酸乙酯、丙酮、甲醇等均为分析纯 (天津市富宇精细化工有限公司)。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥艾纳香叶片 15 kg, 粉碎后用 70%乙醇加热回流提取 4 次, 每次 4 h, 合并滤液, 减压回收溶剂, 浓缩得浸膏。浸膏加适量的水混悬后, 依次用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取。醋酸乙酯部位 (177 g) 经 40~80 目硅胶柱色谱以石油醚-醋酸乙酯 (20:1→5:1) 及氯仿-甲醇 (20:1→0:1) 梯度洗脱, 得 8 个组分 (Fr. 1~8)。Fr. 2 经 RP₁₈ 反相硅胶柱, 以甲醇-水 (40%~100%) 梯度洗脱, 得到 7 个组分 (Fr. 2.1~2.7), Fr. 2.6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱及 ODS 柱色谱得到化合物 **1** (9 mg) 和 **2** (12 mg)。

2.2 细胞毒活性实验

采用 MTT 法^[15]对化合物 **1** 和 **2** 进行细胞毒性研究, 用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM) 配成 5×10⁴/mL 细胞悬液, 每孔体积 100 μL 接种到 96 孔培养板, 培养 24 h 后加入待测化合物, 设置 3 个复孔。另设置阴性对照组 (细胞培养液) 和阳性对照组 (细胞培养液+每孔加入质量浓度为 40 μg/mL 的阿霉素 100 μL), 每组均设置 3 个复孔。加入待测化合物及阳性对照药后将培养板置于 5% CO₂、37 °C 饱和湿度培养箱中培养 48 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μL, 继续孵育 4 h 后终止培养, 弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液, 使其充分溶解, 将培养板放置在酶标仪上, 选取波长为 490 nm 记录吸光度 (A) 值, 计算其相应的抑制率, 待测化合物初筛终质量浓度设置为 40 μg/mL, 在初筛中对肿瘤细胞生长抑制率在 50% 附近的化合物设 5 个质量浓度进入梯度复筛, 计算结果用 SPSS 21.0 软件得出半数抑制浓度 (IC₅₀)。

抑制率 = 1 - 待测化合物组 A 平均值 / 阴性对照组 A 平均值

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 无色无定形固体。 $[\alpha]_D^{19} +45.6^\circ$ (c 0.3 CH₃OH)。质谱数据为 ESI-MS m/z 389 [M+Na]⁺, HR-ESI-MS m/z 389.193 4 [M+Na]⁺ (计算值 389.193 5, C₂₀H₃₀NaO₆)。结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱图可以确定化合物分子式为 C₂₀H₃₀O₆, 不饱和度为 6。IR 光谱显示化合物中有羟基信号 (3 445 cm⁻¹)、羰基信号 (1 714 cm⁻¹), 以及端乙烯基信号 (976 cm⁻¹, 936 cm⁻¹)。UV 光谱显示该化合物的最大吸收波长在 202 nm。

核磁谱图数据 (表 1) 表明化合物有 20 个碳和 30 个氢信号。¹H-NMR 中显示 2 个烯氢质子信号 δ 4.78 (1H, s) 和 δ 5.25 (1H, s), 5 个甲基质子信号 δ 1.42 (3H, s), δ 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz) 和 δ 0.87 (3H, d, J = 6.8 Hz), δ 1.61 (3H, s), δ 1.38 (3H, d, J = 5.2 Hz)。¹³C-NMR 中 5 个甲基信号出现在高场分别为 δ_C (20.3, 19.2, 18.2, 16.4, 13.6), 2 个烯碳信号为 δ_C

(111.5, 146.6), 低场出现的信号峰显示化合物结构中含有 2 个羰基碳 δ_C (209.8, 169.8)。HMBC 谱 (图 2) 中显示 H-2 和 C-3, C-1 与 H-3, H-3 和 C-2, H-3、H-5 和 C-15, H-5 和 C-1, H-5、H-7、H-11 和 C-6, H-9 和 C-7、C-10、C-16, H-5、H-14 和 C-10 存在相关。¹H-¹H COSY 谱 (图 2) 中显示 H-2 和 H-3, H-8 分别和 H-7、H-9, H-11 分别和 H-12、H-13, H-18 和 H-19 存在相关。由上述信息结合分子式 C₂₀H₃₀O₆ 可确定化合物 **1** 的分子骨架和文献报道^[12]的化合物 blumeaene G 一致。高场区存在 2 个氧化的碳信号 C-17 (δ_C 59.9) 和 C-18 (δ_C 60.0), 提示化合物存在 1 个环氧结构, 从 HMBC 谱中的连接 (H-18/C-17、C-19; CH₃-20/C-17; H-18/C-16; CH₃-19/C-18; CH₃-20/C-16) 可以看到这个环氧结构连接着 2 个甲基和 1 个酯羧基结构, 由此可以得出这个基团为 1 个 2,3-环氧-2-甲基丁酰基。通过 HMBC 谱可以看出这个基团连接在 9 位碳上 (H-9/C-16)。ROESY 谱 (图 3) 中显示, H-5 和 H-12、H-13

表 1 化合物 1、2 的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectral data of compound 1^a and compound 2^b

碳位	1		2	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	86.1		91.2	
2	34.7	1.85 (1H, m), 1.97 (1H, m)	36.6	2.52 (1H, m), 1.76 (1H, m)
3	30.4	2.63 (1H, m), 2.38 (1H, m)	37.7	2.91 (1H, m), 2.40 (1H, m)
4	146.6		161.3	
5	59.0	3.72 (1H, s)	139.1	
6	209.8		203.7	
7	54.8	2.45 (1H, m)	52.7	2.63 (1H, m)
8	28.0	2.00 (1H, m), 1.71 (1H, m)	27.8	1.78 (1H, m), 1.44 (1H, m)
9	77.7	5.27 (1H, d, J = 10.8 Hz)	80.7	5.54 (1H, dd, J = 11.6, 3.2 Hz)
10	77.7		79.2	
11	31.6	2.23 (1H, m)	29.2	2.27 (1H, m)
12	20.3	0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz)	21.2	0.92 (3H, d, J = 7.2 Hz)
13	18.2	0.87 (3H, d, J = 6.8 Hz)	18.4	0.82 (3H, d, J = 7.2 Hz)
14	16.4	1.42 (3H, s)	16.2	1.12 (3H, s)
15	111.5	4.78 (1H, s), 5.25 (1H, s)	17.8	2.07 (3H, s)
16	169.8		171.4	
17	59.9		61.4	
18	60.0	3.08 (1H, dd, J = 5.2, 10.8 Hz)	61.0	3.12 (1H, dd, J = 5.6, 10.8 Hz)
19	13.6	1.38 (3H, d, J = 5.2 Hz)	13.9	1.32 (3H, d, J = 5.6 Hz)
20	19.2	1.61 (3H, s)	19.4	1.58 (3H, s)

^a ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃); ^b ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD), ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD)

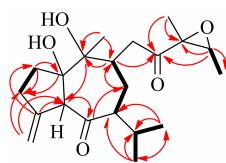


图 2 化合物 1 的关键 HMBC ($H \rightarrow C$) 和 1H - 1H COSY ($H \rightarrow H$) 相关

Fig. 2 Key HMBC ($H \rightarrow C$) and 1H - 1H COSY ($H \rightarrow H$) correlations of compound 1

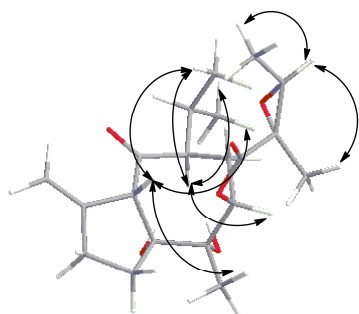


图 3 化合物 1 的关键 ROESY ($H \leftrightarrow H$) 相关

Fig. 3 Key ROESY ($H \leftrightarrow H$) correlations of compound 1

及 H-14 相关, H-7 和 H-9、H-12、H-13 相关, 而 H-18 和 H-19、H-20 相关, 和文献报道^[12]14 位甲基构型对比可以确认化合物 1 的 14 位甲基为 β 构型, 而 H-7、H-9 均为 α 构型, 由此该化合物的结构得到确认。参考文献报道^[12-14]将化合物 1 命名为艾纳香烯 N。

化合物 2: 无色无定形固体 (甲醇), $[\alpha]_D^{19} +40^\circ$ (c 0.1 CH_3OH), ESI-MS m/z : 389 $[M+Na]^+$, 结合 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) 和 ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) 谱图数据 (表 1) 可以确定化合物分子式为 $C_{20}H_{30}O_6$, 不饱和度为 6。化合物 2 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据与文献报道^[12]对照基本一致, 可确认化合物为艾纳香烯 F (图 1)。

3.2 细胞毒活性实验

本实验以宫颈癌 (HeLa) 细胞株、乳腺腺癌 (MCF-7) 细胞株、肺腺癌 (A549) 细胞株、胃癌 (MGC-803) 细胞株、结肠癌 (COLO-205) 细胞株为供试细胞株, 采用 MTT 法对化合物 1 和 2 进行体外细胞毒活性筛选, 结果见表 2。从筛选结果可

表 2 化合物 1 和 2 对 5 种细胞株的 IC_{50}

Table 2 IC_{50} values of five cancer cells treated with compound 1 and compound 2

化合物	$IC_{50}/(\mu mol \cdot L^{-1})$				
	HeLa	MCF-7	A549	MGC-803	COLO-205
1	48.730	76.109	85.191	78.519	97.907
2	105.831	91.188	>109.290	>109.290	>109.290
阿霉素	1.530	1.746	2.886	2.276	2.018

以看出, 化合物 1 对供试的 5 种细胞株均具有较明显的抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $48.730 \sim 97.907 \mu mol/L$, 其中对宫颈癌细胞株 HeLa 的生长抑制活性最强 (IC_{50} 值为 $48.730 \mu mol/L$)。化合物 2 对肺腺癌细胞株、胃癌细胞株、结肠癌细胞株均无明显抑制活性, 其 IC_{50} 值均大于 $100 \mu mol/L$, 对乳腺腺癌 MCF-7 细胞株的生长有微弱的抑制活性 (IC_{50} 值为 $91.188 \mu mol/L$)

4 讨论

本实验从黔产苗药艾纳香叶片提取物中发现 2 个倍半萜内酯化合物, 其中化合物 1 为新化合物。用 MTT 法对 2 个化合物进行了体外细胞毒活性筛选, 结果显示, 化合物 1 对供试的 5 种细胞株均具有抑制活性, 化合物 1 和 2 均对宫颈癌细胞 HeLa 和乳腺腺癌细胞 MCF-7 生长具有一定的抑制活性, 表

明艾纳香中含有抗肿瘤的活性成分, 该结果为艾纳香抗肿瘤功效方面的综合开发与利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国药材公司. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 官玲亮, 庞玉新, 王 丹, 等. 中国民族特色药材艾纳香研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 4(13): 695-698.
- [3] 汪 毅. 黔本草 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2015.
- [4] Hiroo H, Yasuaki Y, Kanki K, *et al*. Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea* abrogates TRAIL resistance in leukemia cells [J]. *Blood*, 2006, 107(2): 679-688.
- [5] Saewan N, Koysomboon S, Chantapromma K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. [J]. *J Med Plants Res*,

- 2011, 5(6): 1018-1025.
- [6] 胡 永, 杨万霞, 李亚男, 等. 艾纳香中的黄酮类化合物及其抗氧化与 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(11): 1898-1903.
- [7] 白 琳, 官玲亮, 陈松笔, 等. 茉莉酸甲酯对艾纳香活性成分、抗氧化酶活力以及内源激素含量的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 203-209.
- [8] 袁 媛, 庞玉新, 元 超. 艾纳香乙酸乙酯部位抗菌活性成分研究 [J]. 热带作物学报, 2018, 39(6): 1195-1199.
- [9] 李 安, 刘 印, 张泽望, 等. 微波辅助提取艾纳香精油的工艺优化及抗菌活性的研究 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(7): 751-755.
- [10] 庞玉新, 元 超, 胡 璇, 等. 黎药艾纳香化学成分研究 [J]. 中药材, 2019, 42(1): 91-95.
- [11] 韦玥吟, 谢晓琴, 刘思彤, 等. 壮药滇桂艾纳香与中药艾纳香的化学成分及药理作用研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(18): 55-57.
- [12] Chen M, Qin J J, Fu J J, *et al.* Blumeaenes A-J, sesquiterpenoid esters from *Blumea balsamifera* with NO inhibitory activity [J]. *Planta Med*, 2010, 76(9): 897-902.
- [13] Shirota O, Oribello JM, Sekita S, *et al.* Sesquiterpens from *Blumea balsamifera* [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(3): 470-476.
- [14] Saifudin A, Tanaka K, Kadota S, *et al.* Chemical constituent of *Blumea balsamifera* of indonesia and their protein tyrosine phosphatase inhibitory activity [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(7): 815-818.
- [15] van Meerloo J, Kaspers G J L, Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 731(1): 237-245.