

粉防己根中 1 个新的阿朴啡型生物碱及其细胞毒活性

陈建国¹, 杨中锋^{1,2*}, 杨立军¹, 杨淑红¹

1. 兰州理工大学生命科学与工程学院 甘肃 兰州 730050

2. 兰州理工大学温州泵阀工程研究院 浙江 温州 325100

摘要: 目的 研究粉防己 *Stephania tetrandra* 根的化学成分及其生物活性。方法 采用各种柱色谱方法分离纯化化学成分, 应用红外、高分辨质谱、核磁共振谱学技术鉴定化合物的结构; 采用 MTT 法测定化合物对人肝癌 HepG2 细胞的抑制活性。结果 从粉防己根的生物碱提取物中分离得到 1 个新的阿朴啡型生物碱, 鉴定为 7-甲基-7-(氯甲基)-9-羟基-6,7-二氢-5H-苯并[g]-1,3-苯并二氧杂环戊基[6,5,4-de]喹啉-7-胺(1); 化合物 1 对 HepG2 细胞显示出较强的增殖抑制活性, 其半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为(6.61±3.67) μg/mL。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为粉防己碱 E(stephtetrandrine E), 具有作为抗肿瘤药物开发的潜在价值。

关键词: 粉防己; 阿朴啡型生物碱; 结构鉴定; 粉防己碱 E; 细胞活力; 磷酸二酯酶 1

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)01-0041-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.006

A new aporphine alkaloid from roots of *Stephania tetrandra* and its cytotoxicity

CHEN Jian-guo¹, YANG Zhong-duo^{1,2}, YANG Li-jun¹, YANG Shu-hong¹

1. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

2. Wenzhou Engineering Institute of Pump & Valve, Lanzhou University of Technology, Wenzhou 325105, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the roots of *Stephania tetrandra* and its biological activities. **Methods** The chemical constituents were isolated by various column chromatography methods, the structures of the isolated compounds were identified by IR, HRESIMS, 1D, 2D NMR spectra and the human hepatoma cell HepG2 inhibitory activity was tested by MTT method. **Results** A new aporphine alkaloid (1) was isolated from the alkaloid extract of the roots of *S. tetrandra*, which was identified as 7-(chloromethyl)-9-hydroxy-7-methyl-6,7-dihydro-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo[6,5,4-de]quinolin-7-ium; Compound 1 showed potent inhibition against HepG2 cells with its half maximal inhibitory concentration of (6.61±3.67) μg/mL. **Conclusion** Compound 1 is a new compound, named stephtetrandrine E, which has potential value as an anti-tumor agent.

Key words: *Stephania tetrandra* S. Moore; aporphine alkaloid; structure elucidation; stephtetrandrine E; cell viability; phosphodiesterase 1

粉防己为防己科(Menispermaceae)千金藤属 *Stephania* Lour. 植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根, 广泛分布于浙江、安徽、福建等省, 主要用于自身免疫性疾病和风湿病的治疗^[1], 具有解热、利尿、消炎、抗糖尿病和抗肝纤维化的活性^[2]。阿朴啡型生物碱具有联苯的四环结构, 伴有多种氧化态型和多种取代基。1991 年, 司端运等^[3]首次从粉防己的地上部分分离鉴定了 6 个阿朴啡类生物碱: 防己醌碱、莨菪醌碱、氧化南天竹啡碱、无

根藤米里丁、南天竹啡碱(nantenine)和无根藤新碱。2016 年, Dong 等^[4]从香青藤的块茎中分离并鉴定了 1 种新的阿朴啡类生物碱香青藤宁碱(illigeranine), 该化合物显示出对丁酰胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶中等强度的抑制活性, 半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值分别为(31.62±1.15)和(81.69±2.07) μmol/L。2009 年, Chen 等^[5]从铁线莲中分离并鉴定了 1 种新的阿朴啡生物碱 β-木果酚碱(β-magnoflorine), 其对青

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22267011); 甘肃省高等学校产业支撑计划项目(2022CYZC-29); 温州市科技局项目(2022Y0872); 甘肃省自然科学基金资助项目(20JR5RA458)

作者简介: 陈建国(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: 392085702@qq.com

*通信作者: 杨中锋, 男, 教授, 硕导, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0931)2973727 E-mail: yangzhongduo@126.com

霉 UC-4376 显示出较强的抗真菌活性。到目前为止,已从 20 个科的 100 多个属植物中分离出 500 多个阿朴啡生物碱^[6-7]。为了进一步寻找新的具有生物活性的阿朴啡生物碱,本研究应用酸提碱沉法提取生物碱,综合应用大孔树脂、硅胶、LH-20 等多种色谱学方法对粉防己的化学成分进行研究,应用红外、高分辨质谱、核磁共振等谱学技术鉴定,得到了 1 个新生物碱,结构为 7-甲基-7-(氯甲基)-9-羟基-6,7-二氢-5H 苯并[g]-1,3-苯并二氧杂环戊基[6,5,4-de]喹啉-7-铵 (7-(chloromethyl)-9-hydroxy-7-methyl-6,7-dihydro-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo[6,5,4-de]-quinolin-7-ium, **1**), 命名为粉防己碱 E, 结构见图 1; 并采用 MTT 法测定了化合物 **1** 对人肝癌 HepG2 细胞的抑制活性。

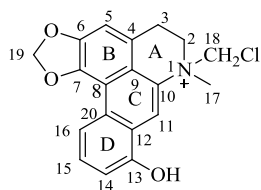


图 1 化合物 **1** 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compound **1**

1 仪器与材料

Bruker Avance III 型核磁共振谱仪 (600 MHz, 瑞士 Bruker 公司); Delta Plus 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo Finnigan 公司); JASCO P-1030 型旋光仪 (日本 JASCO 公司); Perkin Elmer 1600 型傅里叶变换红外光谱仪 (KBr 压片, 美国 Perkin-Elmer 公司); 柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 型葡聚糖凝胶柱色谱 (瑞典 Amersham Pharmacia 公司); HPD-100 大孔吸附树脂 (郑州勤实科技有限公司); 制霉菌素 (批号 N141226) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司。L-半胱氨酸 (批号 C108237, 质量分数 99%) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 表柔比星 (批号 MB1094) 购自大连美仑生物技术有限公司。磷酸二酯酶 1 (phosphodiesterase 1, PDE1, 批号 P3243) 购自 Sigma 公司。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 购自北京北纳创联生物技术有限公司 (批号 BNCC336354)。HepG2 细胞由四川大学时间生物学重点实验室赠送。

粉防己根购自甘肃兰州黄河药材市场, 经兰州理工大学杨林副教授鉴定为粉防己 *S. tetrandra* S. Moore 的干燥根。标本 (2018-ylj-1) 保存于兰州理

工大学生命科学与工程学院天然药物实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥的粉防己根 (20.0 kg) 粉碎后用 95% 乙醇水提取 3 次, 合并提取液, 旋转蒸发仪浓缩至干, 得到乙醇提取物。乙醇提取物加 3 L 热水悬浮, 用稀盐酸 (5%) 调节 pH 至 2.0, 静置过夜后, 抽滤除去不溶物。滤液用氨水 (25%) 调节 pH 至 10.0, 用 CHCl₃ (1.5 L×4) 萃取得到总生物碱 (500 g)。总生物碱溶解于 10% 的乙醇中, 进行大孔树脂柱色谱, 乙醇-水溶液 (10%、30%、50%、70%、90%、100%) 梯度洗脱, 得到 6 个组分 (Fr. 1~6)。

对 Fr. 2 (60 g) 进行硅胶柱色谱, 用三氯甲烷-甲醇 (20:1→1:1) 梯度洗脱, 薄层色谱 (TLC) 检测合并得到 4 个组分 (Fr. 2.1~2.4)。组分 Fr. 2.4 进行硅胶柱色谱分离纯化, 三氯甲烷-丙酮 (30:1→2:1) 梯度洗脱, TLC 检测合并得到 5 个组分 (Fr. 2.4.1~2.4.5)。组分 Fr. 2.4.2 用 LH-20 柱色谱分离纯化, 甲醇洗脱得到化合物 **1** (5.5 mg)。

2.2 生物活性测定

2.2.1 细胞活力测定 采用 MTT 法检测 HepG2 细胞的体外细胞活力。首先, 收集对数生长期的细胞, 用培养基将细胞重新悬浮成浓度为 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个细胞/mL 的细胞悬浮液, 然后将细胞悬浮液按每孔 100 μL 接种到 96 孔板中。将 96 孔板置于 5% CO₂ 细胞培养箱中在 37 °C 培养过夜。实验分为 3 组, 对照组、实验组和阳性药 (表柔比星) 组。第 2 天, 实验组各孔中加入 100 μL 各浓度梯度的药物, 每个药物浓度设置 3 个平行孔。对照组各孔中加入 100 μL 含 0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 的培养基。阳性药组各孔中加入 100 μL 各浓度梯度的表柔比星。上述处理组, 继续在细胞培养箱中孵育 72 h。向 96 孔板的每个孔中加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 在 37 °C 下孵育 2~4 h 形成甲瓚晶体, 去除上清液。向每个孔中加入 150 μL DMSO 溶解甲瓚晶体。完全溶解后, 用酶标仪在波长 570 nm 下测定吸光度 (A) 值。根据公式计算药物对肿瘤细胞的生长抑制率, 再使用 Graphpad Prism 软件计算 IC₅₀ 值^[8]。

$$\text{生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

2.2.2 PDE1 活性测定 测定方法参照文献方法^[9]。在 96 孔板中, 加入 160 μL 含 0.11 mol/L 氯化钠和 15 mmol/L 氯化镁的 0.11 mol/L tris-HCl 缓冲液 (pH 8.9)、PDE1 终浓度为 0.000 18 U/孔、20 μL 的样品

(化合物 1)或 20 μL 的阳性药 *L*-半胱氨酸。在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 20 min, 加入 20 μL 的 0.65 mmol/L 底物(对硝基苯基胸腺嘧啶-5-磷酸), 继续孵育 15 min 后, 在酶标仪上 405 nm 处测定 *A* 值。实验分 4 组, 样品组加 20 μL 样品, 空白组用 20 μL tris-HCl 缓冲液, 样品本底组加 20 μL 样品并用 20 μL tris-HCl 缓冲液代替底物, 完全抑制组用 20 μL 200 $\mu\text{g/mL}$ 的阳性药 *L*-半胱氨酸。每组平行测定 3 次, 用酶标仪在波长 405 nm 下测定 *A* 值, 根据 *A* 值的变化计算抑制率。

抑制率 = $\frac{(A_{\text{空白}} - A_{\text{完全抑制}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品本底}})}{(A_{\text{空白}} - A_{\text{完全抑制}})}$

2.2.3 抗尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 生长活性测定 测定方法参照文献报道^[10]。将 *F. oxysporum* 接种至 PDA 固体培养基中培养 5~6 d, 然后用 10 mL 双倍浓度的 PDA 液体培养基冲洗得悬浮液, 使用 4 层灭菌纱布过滤菌丝体, 得到分生孢子液。并用分光光度计测定分生孢子液在 625 nm 处的 *A* 值, 并用 2 倍浓度的 PDA 原液稀释分生孢子液, 使 *A* 值处于 0.09~0.12。在此稀释浓度上再稀释 100 倍即得实验用孢子悬浮液。在 96 孔板的各孔中加入 50 μL *F. oxysporum* 孢子悬浮液, 加入 50 μL 阳性药(制霉菌素)或待测样品。将 96 孔板放置在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 24 h, 每孔加入 20 μL 的碘硝基四唑紫(iononitrotetrazolium chloride, INT)染色剂, 继续培养 24 h, 观察颜色变化, 加入 INT 后颜色不变红的孔所对应的样品可认定为有抗尖孢镰刀菌活性。使用 50 μL 无菌水代替样品作为阴性对照组。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 90.0^{\circ}$ (*c* 10, CH_3OH)。HRESIMS 给出分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Cl}$ (*m/z*

342.088 9 $[\text{M}]^{+}$ (计算值 342.089 2)。红外光谱在 3419 cm^{-1} 处显示有羟基。化合物 1 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 波谱数据(表 1)显示有 1 个甲基、4 个亚甲基、5 个次甲基和 9 个季碳信号。同时 NMR 数据还表明化合物 1 具有 1 个 *N*-甲基 [δ_{H} 3.41 (3H, s, H-17), δ_{C} 50.4 (C-17)]、1 个氯甲基 [δ_{H} 5.49 (2H, s, H-18), δ_{C} 69.7 (C-18)]、1 个二氧亚甲基 [δ_{H} 6.26 (2H, s, H-19), δ_{C} 102.9 (C-19)] 和 5 个芳环质子 [δ_{H} 7.34 (1H, s, H-5), 7.86 (1H, s, H-11), 7.88 (1H, dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, H-14), 7.61 (1H, t, *J* = 9.3 Hz, H-15), 9.06 (1H, dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, H-16)]。化合物 1 的 ^1H -和 ^{13}C -NMR 数据与已知的去氢阿朴啡生物碱相似^[11-13], 这表明化合物 1 是去氢阿朴啡生物碱的类似物。H-19/C-6、H-19/C-7、H-5/C-6、H-5/C-7 之间的 HMBC 相关峰(图 2)表明二氧亚甲基与 B-环并合形成 1,3 二氧五环。H-18/C-2、H-2/C-18、H-18/C-17、H-17/C-18、H-2/C-17 之间的 HMBC 相关峰(图 2)表明, 甲基和氯甲基连接到氮原子上形成季胺。H-11/C-10、H-11/C-12、H-11/C-20、H-11/C-9 之间的 HMBC 相关峰表明 C 环形成了芳环。由于 D 环中的 3 个质子分别显示 δ_{H} 9.06 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz), 7.61 (t, *J* = 9.3 Hz), 7.88 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz) 峰, 因此 D 环中的羟基只能被取代在 C-13 或 C-16 位。通过查阅文献报道^[11,14-15], 发现当去氢阿朴啡生物碱的 C-16 位没有羟基取代时, H-16 的化学位移通常较大, δ_{H} 为 8.5~9.1, 而当在 C-16 位有羟基取代时, D 环上质子的化学位移通常不超过 δ_{H} 8.0。化合物 1 的 H-16 的化学位移达到 δ_{H} 9.06, 这表明羟基应该连接到 C-13, 而不是 C-16。

综合 NMR 图谱信息, 对化合物 1 的碳氢信号进行归属, 见表 1。鉴定化合物 1 的结构为 7-甲基-

表 1 化合物 1 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, CD_3OD)
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound 1 (600/150 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}	碳位	δ_{H}	δ_{C}
2	3.75 (m)	64.3 (CH_2)	12		127.7 (C)
3	3.60 (m)	27.2 (CH_2)	13		146.8 (C)
4		126.6 (C)	14	7.88 (dd, <i>J</i> = 9.3, 2.6 Hz)	128.9 (CH)
5	7.34 (s)	112.3 (CH)	15	7.61 (t, <i>J</i> = 9.3 Hz)	127.3 (CH)
6		144.6 (C)	16	9.06 (dd, <i>J</i> = 9.3, 2.6 Hz)	128.2 (CH)
7		146.8 (C)	17	3.41 (s)	50.4 (CH_3)
8		128.3 (C)	18	5.49 (s)	69.7 (CH_2)
9		118.3 (C)	19	6.26 (s)	102.9 (CH_2)
10		129.8 (C)	20		133.4 (C)
11	7.86 (s)	122.8 (CH)			

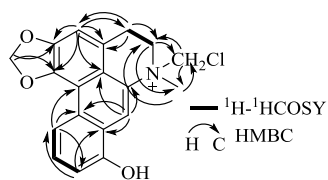


图 2 化合物 1 的 ^1H - ^1H COSY 和 HMBC 相关
Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of 1

7-(氯甲基)-9-羟基-6,7 二氢-5H 苯并[g]-1,3-苯并二氧杂环戊基[6,5,4-de]喹啉-7-胺; 经 SciFinder Scholar 检索, 化合物 1 为 1 个新的阿朴啡型生物碱, 命名为粉防己碱 E, 结构见图 1。

3.2 生物活性测定结果

通过 MTT 法、高通量抗真菌活性测定法、紫外分光光度法(酶标仪上利用 96 孔板测定)分别测定了化合物 1 对 HepG2 细胞的增殖、尖孢镰刀菌的生长和 PDE1 的抑制活性。结果表明, 化合物 1 对 HepG2 细胞增殖有较强的抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $(6.61 \pm 3.67) \mu\text{g/mL}$, 阳性药表柔比星的 IC_{50} 值为 $(4.01 \pm 1.15) \mu\text{g/mL}$ 。化合物 1 在 10 mg/mL 时对尖孢镰刀菌生长无明显抑制活性(加入 INT 后颜色变红), 化合物 1 对 PDE1 无明显抑制活性。

4 讨论

本研究从粉防己根的生物碱提取物中分离得到 1 个新的阿朴啡型生物碱, 粉防己碱 E, 其表现出良好的抗 HepG2 细胞增殖的活性。另外, 本研究同时发现了 4 个双苄基异喹啉类生物碱, 粉防己碱 A~D, 其中粉防己碱 C 也表现出良好的抑制 HepG2 细胞增殖的活性^[16]。这些研究结果将为粉防己根开发成抗肿瘤产品提供了理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ogino T, Sato T, Sasaki H, et al. Four new bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root of *Stephania tetrandra* (Fen-Fang ji) [J]. *Heterocycles*, 1988, 27(5): 1149.
- [2] Sun Y F, Wink M. Tetrandrine and fangchinoline, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* can reverse multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein activity in multidrug resistant human cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(8/9): 1110-1119.
- [3] 司端运, 赵守训. 粉防己地上部分的阿朴啡类生物碱成分 [J]. 济宁医学院学报, 1991, 14(2): 1-6.
- [4] Dong J W, Cai L, Li X J, et al. Monoterpene esters and aporphine alkaloids from *Illigeria aromatica* with inhibitory effects against cholinesterase and NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(12): 1394-1402.
- [5] Chen J H, du Z Z, Shen Y M, et al. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(1): 3-5.
- [6] 刘言娟, 柳军玺, 邸多隆. 阿朴菲类生物碱抗癌活性研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 806-814.
- [7] Chen J X, Gao K, Liu T G, et al. Aporphine alkaloids: A kind of alkaloids' extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany [J]. *Asian J Chem*, 2013, 25(18): 10015-10027.
- [8] Liu Z H, Lei Q, Wei W, et al. Synthesis and biological evaluation of (E)-4-(3-arylvinyl-1H-indazol-6-yl) pyrimidin-2-amine derivatives as PLK4 inhibitors for the treatment of breast cancer [J]. *RSC Adv*, 2017, 7(44): 27737-27746.
- [9] Fozing C D, Ali Z, Ngadjui B T, et al. Phosphodiesterase I-inhibiting Diels-Alder adducts from the leaves of *Morus mesozygia* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(2): 154-159.
- [10] Zhang Y, Kao P L, Rampal A, et al. High-throughput screening assays to identify plant natural products with antifungal properties against *Fusarium oxysporum* [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2391: 171-184.
- [11] Wang H, Cheng X, Kong S J, et al. Synthesis and structure-activity relationships of a series of aporphine derivatives with antiarrhythmic activities and acute toxicity [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1555.
- [12] 吴彤彬, 刘国卿, 闵知大, 等. 一去氢阿朴啡生物碱的结构测定 [J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(4): 235-236.
- [13] Chen C Y, Kao C L, Li W J, et al. Secondary metabolites from the stems of *Ilex cornuta* [J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54(3): 617-618.
- [14] Atanes N, et al. Synthesis of 7-substituted dehydronoraporphines, with some biogenetic considerations [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(38): 11257-11266.
- [15] Greecke M, Borer R, Brossi A. Conversion of natural (S)-bulbocapnine into two (ring A)-substituted derivatives of (R)-apomorphine [J]. *Helv Chim Acta*, 1979, 62(5): 1543-1548.
- [16] Yang L J, Yang Z D, Li Z J, et al. Steptetrandrine A-D, bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania tetrandra* [J]. *Nat Prod Res*, 2022, doi: 10.1080/14786419.2021.1961135.

[责任编辑 王文倩]