

茶藤生物碱成分的分离鉴定及抗肿瘤活性研究

何琴慧^{1,2}, 姜雨辰^{1#}, 王文玲², 李丽梅^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 成都医学院, 四川 成都 610500

摘要: 目的 对茶藤 *Melodinus magnificus* 的生物碱成分进行分离、鉴定和抗肿瘤活性研究。方法 采用薄层色谱、柱色谱等色谱方法对总生物碱浸膏进行分离和纯化。通过 ESI-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等波谱技术和文献对比等方法鉴定生物碱化合物的结构, 并采用 MTT 法对分离得到的生物碱化合物进行抗肿瘤细胞 (人肝癌 HepG2 细胞、乳腺癌 MCF7 细胞和人肺癌 A549 细胞) 活性筛选, 随后利用网络药理学和分子对接技术对具有抗肿瘤活性生物碱化合物的潜在靶点和作用通路进行预测。结果 从茶藤枝叶总生物碱中共获得 10 个化合物, 分别鉴定为 strictamine (1)、deacetylakuammiline (2)、19-(Z)-akuammidine (3)、14,15-didehydrovincamine (4)、14,15-didehydro-16-*epi*-vincamine (5)、19-(S)-methoxytubotaiwine (6)、19-(R)-methoxytubotaiwine (7)、rhazimine (8)、rhazicine N⁴-oxide (9) 和 rhazicine (10)。抗肿瘤活性实验发现 7 个生物碱化合物 (1、4~9) 对 3 种肿瘤细胞株具有较显著的增殖抑制活性, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值在 0.40~1.16 μmol/L。分子对接结果显示 7 个生物碱化合物能够与蛋白稳定结合, 结合能范围-31.35~46.75 kJ/mol, 且通过 4 个关键靶标基因 RXRA、SRC、MAPK1、PIK3R1 起到抗多种肿瘤的作用。结论 所有化合物均为首次从该植物中分离得到。通过整合分离、鉴定、抗肿瘤活性筛选和网络药理学方法初步阐述了茶藤的抗肿瘤活性物质基础和作用机制, 为寻找抗肿瘤药物提供了新的资源。

关键词: 茶藤; 单萜吲哚生物碱; 抗肿瘤活性; 分子对接; strictamine; deacetylakuammiline; rhazimine

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)03-0704-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.004

Isolation and identification of alkaloids from *Melodinus magnificus* and their antitumor activity

HE Qin-hui^{1,2}, JIANG Yu-chen¹, WANG Wen-ling², LI Li-mei¹

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

2. Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: **Objective** To isolate and identify the antitumor activity of alkaloids from *Melodinus magnificus*. **Methods** The separation and purification of the total alkaloid extract were carried out by preparative thin layer chromatography and column chromatography. The structures of the isolated alkaloids were identified by ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and by comparing with literature. MTT method was used to evaluate the antitumor activity of all monoterpene indole alkaloids. Network pharmacology and molecular docking technologies were used to predict the potential targets of alkaloids with cytotoxicity. **Results** A total of 10 alkaloid compounds were obtained from the extract of total alkaloids from branches and leaves of *M. magnificus*. They were identified as strictamine (1), deacetylakuammiline (2), 19-(Z)-akuammidine (3), 14,15-didehydrovincamine (4), 14,15-didehydro-16-*epi*-vincamine (5), 19-(S)-methoxytubotaiwine (6), 19-(R)-methoxytubotaiwine (7), rhazimine (8), rhazicine N⁴-oxide (9), and rhazicine (10), respectively. All alkaloids were isolated from this plant for the first time. The results of MTT screening showed that seven alkaloid compounds (1, 4~9) had significant inhibitory activity on the proliferation of three tumor cell lines, with IC₅₀ values ranging from 0.40 to 1.16 μmol/L. Molecular docking results showed that they could stably bind to proteins with binding energy ranging from -31.35 to 46.75 kJ/mol. They possibly play antitumor roles through four key target genes RXRA, SRC, MAPK1, and

收稿日期: 2022-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31870341)

作者简介: 何琴慧, 硕士研究生。E-mail: 1159440098@qq.com

*通信作者: 李丽梅, 教授, 研究方向为中药与民族药研究与开发。E-mail: limeili@swun.edu.cn

#共同第一作者: 姜雨辰, 硕士研究生。E-mail: 1106317878@qq.com

PIK3R1. **Conclusion** In this study, through integrating isolation, identification, anti-tumor activity screening, and network pharmacology methods, the substance basis and mechanism of antitumor activity of *M. magnificus* are preliminarily expounded, which provide new resources for finding antitumor drugs.

Key words: *Melodinus magnificus* Tsiang; monoterpenoid indole alkaloids; antitumor activity; molecular docking; strictamine; deacetylakuammiline; rhazimine

茶藤 *Melodinus magnificus* Tsiang 是夹竹桃科 (Apocynaceae) 山橙属 *Melodinus* J. R. Forst. & G. Forst. 的攀援木质藤本植物, 俗称大山橙。主要分布在中国广西等地, 多生长于山地疏林或山坡向阳处, 为我国特有植物, 其叶揉制作茶饮料, 有兴奋作用^[1], 也具有清热排毒、利喉消肿、抗菌消炎等作用^[2]。目前仅见 1 篇文献报道从广西壮族自治区上思县的茶藤中分离得到 4 个单萜吲哚生物碱^[2]。本研究组在预实验中发现茶藤的总生物碱浸膏对肿瘤细胞 (人肝癌 HepG2 细胞、乳腺癌 MCF7 细胞和人肺癌 A549 细胞) 增殖有一定的抑制作用, 因此, 为进一步在该植物中发现结构各异且潜在的具有抗肿瘤活

性的生物碱成分, 本研究通过常规的天然药物化学方法提取分离纯化茶藤生物碱成分, 采用核磁、质谱等波谱技术鉴定化合物的结构, 得到的 10 个化合物分别为 strictamine (1)、deacetylakuammiline (2)、19-(Z)-akuammidine (3)、14,15-didehydrovincamine (4)、14,15-didehydro-16-*epi*-vincamine (5)、19-(*S*)-methoxy tubotaiwine (6)、19-(*R*)-methoxy-tubotaiwine (7)、rhazimine (8)、rhazicine N^4 -oxide (9) 和 rhazicine (10); 所有化合物均为首次从该植物中分离得到, 化学结构见图 1。并采取 MTT 法筛选化合物的抗肿瘤活性, 以及结合网络药理学和分子对接技术预测具有抗肿瘤活性的生物碱的靶点和通路。

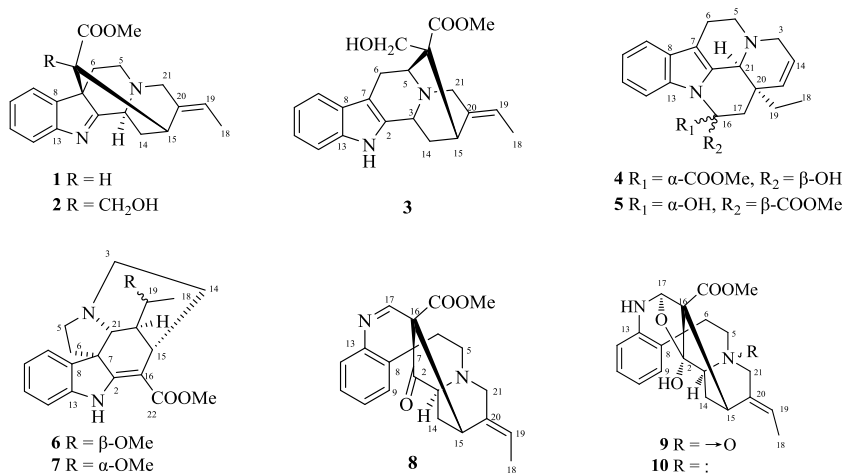


图 1 化合物 1~10 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1—10

1 仪器与材料

Brucker AV 400 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Bruker Micro TOF QII 质谱仪 (瑞士 Bruker 公司); 薄层色谱硅胶板 (GF₂₅₄, 青岛海洋化工有限公司); 正相硅胶 (100~200、200~300 目, 青岛海洋化工有限公司); 反相硅胶 (RP-18, 德国 Merck 公司); 碱性氧化铝硅胶 (100~200、200~300 目, 国药集团化学试剂有限公司); 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20 gel, 美国 GE 公司); 紫杉醇 (PTX, 购自 Sigma 公司)。

植物样品于 2018 年 8 月采自云南省文山州, 由

昆明植分生物技术有限公司张君高级工程师鉴定为夹竹桃科山橙属植物茶藤 *M. magnificus* Tsiang 枝叶, 标本 (LMMM1808) 保存在西南民族大学药学院。

2 提取与分离

茶藤枝叶干质量 50 kg, 粉碎后, 选用 100 L 工业级甲醇 60 °C 提取 3 次, 每次 3 h, 将提取液进行合并和滤过, 并减压浓缩直至无醇后得到醇提物。醇提物经 10 L 反渗透水稀释后, 用 5% HCl 将 pH 值调至 1~2, 并使用等体积的醋酸乙酯萃取 3 次, 水层用 NaOH 将 pH 值调至 9~10, 并使用等体积的氯仿连续萃取 4 次, 减压浓缩氯仿层, 得到总生

物碱 53 g。

称取总生物碱约 50 g, 通过 200~300 目碱性氧化铝硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (100:0~0:100) 梯度洗脱, 合并称取总生物碱约 50 g, 通过 200~300 目碱性氧化铝硅胶柱, 用氯仿-甲醇 (100:0~0:100) 梯度洗脱, 合并相同组分后分为 3 个组分 Fr. 1~3。组分 Fr. 1 (21.7 g) 以甲醇-水 (10%~60%) 进行反相柱色谱梯度洗脱, 10%~20% 甲醇部分记为 Fr. 1.1 (3.0 g), 30% 甲醇部分记为 Fr. 1.2 (1.8 g), 40% 甲醇部分记为 Fr. 1.3 (1.4 g), 50%~60% 甲醇部分记为 Fr. 1.4 (7.0 g)。Fr. 1.1 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 柱色谱, 得到化合物 4 (20 mg)。Fr. 1.2 经过醋酸乙酯-甲醇 (5:1~1:1) 正相硅胶柱分离得到化合物 9 (394 mg)。Fr. 1.3 经过醋酸乙酯-甲醇 (50:1~1:1) 正相硅胶柱得到化合物 1 (196 mg)、6 和 7 (27 mg)。Fr. 1.4 利用石油醚-丙酮 (4:1~1:2) 正相硅胶柱分离得到 Fr. 1.4.1 (20 mg) 和 Fr. 1.4.2 (20 mg) 2 个部分。Fr. 1.4.1 采用氯仿-甲醇 (10:1) 制备薄层色谱法得到化合物 3 (12 mg), Fr. 1.4.2 采用醋酸乙酯-甲醇 (10:1) 制备薄层色谱法得到生物碱类化合物 2 (10 mg)。组分 Fr. 2 (4.0 g) 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 柱色谱得到 Fr. 2.1 (2.8 g) 和 Fr. 2.2 (1.0 g)。Fr. 2.1 经过醋酸乙酯-甲醇 (100:0~50:1) 硅胶柱色谱, 得到化合物 10 (100 mg)。Fr. 2.2 经过制备薄层色谱 [醋酸乙酯-甲醇 (10:1)] 得到化合物 8 (134 mg)。组分 Fr. 3 (8.0 g) 先经过正相硅胶柱 (石油醚-醋酸乙酯 (15:1~1:1)), 接着采用制备薄层色谱法 [氯仿-甲醇 (10:1)] 得到化合物 5 (12 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铋钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 323 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{20}H_{22}N_2O_2$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.54 (3H, dd, $J = 7.0, 2.3$ Hz, H-18), 1.73 (1H, dd, $J = 13.8, 2.6$ Hz, H-6b), 2.01 (1H, dd, $J = 14.7, 4.8$ Hz, H-14b), 2.07 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-16), 2.57 (1H, m, H-14a), 2.64~2.76 (3H, m, H-5, 6a), 3.11 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-21b), 3.71 (1H, m, H-15), 3.73 (3H, s, 22-OMe), 4.05 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-21a), 4.68 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-3), 5.51 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-19), 7.16 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, H-10), 7.33 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 7.42 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-12), 7.62 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) 数据见表 1。上述结果与文献报道数据基本一致^[3-4], 故鉴定化合物 1 为 strictamine。

化合物 2: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铋钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 353 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{21}H_{24}N_2O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.62 (3H, dd, $J = 7.1, 2.2$ Hz, H-18), 1.88 (1H, dd, $J = 14.4, 4.4$ Hz, H-14b), 2.02 (1H, dd, $J = 14.7, 3.9$ Hz, H-5b), 2.41 (1H, ddd, $J = 14.4, 4.8, 2.5$ Hz, H-14a), 2.66 (2H, ddd, $J = 17.8, 14.2, 5.1$ Hz, H-6), 2.86, 2.98 (各 1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-17), 3.11 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-21b), 3.63 (1H, m, H-15), 3.66 (1H, m, H-5a), 3.82 (3H, s,

mg)。Fr. 1.3 经过醋酸乙酯-甲醇 (50:1~1:1) 正相硅胶柱得到化合物 1 (196 mg)、6 和 7 (27 mg)。Fr. 1.4 利用石油醚-丙酮 (4:1~1:2) 正相硅胶柱分离得到 Fr. 1.4.1 (20 mg) 和 Fr. 1.4.2 (20 mg) 2 个部分。Fr. 1.4.1 采用氯仿-甲醇 (10:1) 制备薄层色谱法得到化合物 3 (12 mg), Fr. 1.4.2 采用醋酸乙酯-甲醇 (10:1) 制备薄层色谱法得到生物碱类化合物 2 (10 mg)。组分 Fr. 2 (4.0 g) 经过 Sephadex LH-20 (甲醇) 柱色谱得到 Fr. 2.1 (2.8 g) 和 Fr. 2.2 (1.0 g)。Fr. 2.1 经过醋酸乙酯-甲醇 (100:0~50:1) 硅胶柱色谱, 得到化合物 10 (100 mg)。Fr. 2.2 经过制备薄层色谱 [醋酸乙酯-甲醇 (10:1)] 得到化合物 8 (134 mg)。组分 Fr. 3 (8.0 g) 先经过正相硅胶柱 (石油醚-醋酸乙酯 (15:1~1:1)), 接着采用制备薄层色谱法 [氯仿-甲醇 (10:1)] 得到化合物 5 (12 mg)。

化合物 3: 白色无定形粉末, 不溶于三氯甲烷, 易溶于甲醇; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铋钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 353 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{21}H_{24}N_2O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ : 1.68 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-18), 1.90 (1H, t, $J = 11.6$ Hz, H-14b), 2.69 (1H, dd, $J = 11.6, 2.4$ Hz, H-14a), 2.80 (1H, brs, H-5), 2.81 (1H, m, H-6a), 2.94 (3H, s, 22-OMe), 3.31 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-15), 3.40 (1H, m, H-6b), 3.51 (1H, d, $J = 16.9$ Hz, H-21b), 3.60 (1H, m, H-21a), 3.66 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-17b), 3.78 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-17a), 4.22 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-3), 5.45 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, H-19), 6.96 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-10), 7.04 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11), 7.27 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.37 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4) 数据见表 1。上述结果与文献数据基本一致^[6], 故鉴定化合物 3 为 19-(Z)-akuammidine。

化合物 4: 白色无定形粉末; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铋钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 353 $[M+H]^+$, 分子式 $C_{21}H_{24}N_2O_3$ 。 1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.92 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18), 1.52 (1H, dq, $J = 14.7, 7.4$ Hz, H-19b), 1.84 (1H, dq, $J = 14.7, 7.4$ Hz, H-19a), 2.15 (1H, d, $J = 14.2$ Hz,

表 1 化合物 1~3、5~10 的 ^{13}C -NMR 波谱数据

Table 1 ^{13}C -NMR data of compounds 1—3, 5—10

碳位	1	2	3	5	6	7	8	9	10
2	190.9	190.6	138.6	132.7	169.5	170.8	214.6	111.9	109.6
3	55.0	54.6	51.9	43.8	45.0	44.6	61.2	82.5	58.0
5	51.9	53.9	59.0	49.7	53.2	53.2	51.7	65.3	47.9
6	36.0	37.9	25.0	16.6	43.9	43.0	32.2	25.9	20.8
7	56.1	58.7	106.1	106.3	54.7	54.6	53.2	57.5	49.1
8	137.8	139.5	128.0	128.9	135.8	136.1	128.3	126.3	125.6
9	123.5	125.9	119.7	118.0	120.0	120.5	128.4	124.5	127.3
10	125.6	128.5	118.6	120.2	121.3	121.3	128.0	119.7	122.7
11	128.2	124.7	122.0	121.6	127.6	127.4	128.9	128.4	128.7
12	120.0	121.4	112.0	112.7	109.9	109.8	120.8	116.3	115.9
13	155.4	155.7	138.0	136.7	143.8	143.5	142.1	144.2	142.2
14	33.4	30.5	30.1	125.8	27.3	27.8	30.4	21.8	26.4
15	32.4	34.6	30.3	126.7	27.5	28.8	37.4	35.7	35.8
16	55.3	60.5	52.7	83.9	96.5	95.6	58.2	49.1	56.7
17		64.1	68.9	45.9			160.7	86.4	84.9
18	13.0	13.4	13.3	8.4	16.5	16.1	13.1	13.5	12.9
19	121.0	119.6	118.2	35.3	74.8	75.5	125.1	129.5	119.5
20	146.2	144.3	138.4	38.4	46.2	45.4	137.5	132.0	133.9
21	53.5	52.1	56.1	57.0	62.1	61.5	53.1	73.1	53.3
22	171.7	173.6	174.8	172.1	168.9	168.3	168.5	171.0	170.3
22-OMe	51.6	52.0	51.6	52.7	51.2	51.3	52.2	52.5	52.1
19-OMe					56.5	55.6			

H-17b), 2.36 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-17a), 2.44 (1H, dd, $J = 15.8, 5.2$ Hz, H-6b), 2.84 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-3b), 2.95 (1H, m, H-3a), 3.02 (1H, m, H-6a), 3.25 (2H, m, H-5), 3.72 (3H, s, 22-OMe), 3.97 (1H, s, H-21), 5.38 (1H, dt, $J = 10.3, 2.8$ Hz, H-14), 5.67 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-15), 6.56 (1H, s, OH), 6.97~7.04 (3H, m, H-10~12), 7.37 (1H, m, H-9); 以上数据与文献数据基本一致^[7], 故鉴定化合物 **4** 为 14,15-didehydrovincamine。

化合物 **5**: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 353 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.93 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-18), 1.44 (1H, dd, $J = 13.7, 7.3$ Hz, H-19a), 1.78 (1H, dd, $J = 13.7, 7.3$ Hz, H-19b), 2.01 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-17a), 2.50 (1H, m, H-6a), 2.60 (1H, m, H-17b), 3.01 (1H, m, H-3a), 3.04 (1H, m, H-6b), 3.17 (1H, m, H-3b), 3.24 (1H, m, H-5a), 3.38

(1H, dd, $J = 13.8, 6.9$ Hz, H-5b), 3.47 (3H, s, 22-OMe), 3.77 (1H, s, H-21), 5.24 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-15), 5.46 (1H, dt, $J = 10.2, 3.0$ Hz, H-14), 7.07 (1H, m, H-10), 7.13 (1H, m, H-11), 7.39 (1H, m, H-9), 7.50 (1H, m, H-12); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献数据基本一致^[8], 故鉴定化合物 **5** 为 14,15-didehydro-16-*epi*-vincamine。

化合物 **6**: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 355 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.94 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-18), 1.80 (2H, m, H-14), 1.89 (1H, m, H-6a), 2.04 (1H, m, H-20), 2.50 (2H, m, H-3a, 19), 2.86 (2H, m, H-5b, 6b), 2.99 (3H, s, 19-OMe), 3.08 (2H, m, H-3b, 5a), 3.46 (1H, brs, H-15), 3.85 (3H, s, 22-OMe), 3.96 (1H, brs, H-21), 6.81 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-12), 6.89 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10), 7.10 (1H, m, H-11), 7.16 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-9), 8.93 (1H, s,

NH); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[9], 故鉴定化合物 **6** 为 19-(*S*)-methoxytubotaiwine。

化合物 **7**: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 355 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.89 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, H-18), 1.80 (2H, m, H-14), 1.89 (1H, m, H-6a), 2.04 (1H, m, H-20), 2.40 (1H, m, H-19), 2.50 (1H, m, H-3a), 2.65 (3H, s, 19-OMe), 2.86 (2H, m, H-5b, 6b), 3.07 (1H, brs, H-15), 3.08 (2H, m, H-3b, 5a), 3.85 (3H, s, 22-OMe), 4.37 (1H, brs, H-21), 6.81 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-12), 6.89 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-10), 7.10 (1H, m, H-11), 7.22 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-9), 8.82 (1H, s, NH); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 见表 1。化合物 **7** 与 **6** 的核磁数据相似, 推测其互为差向异构体, 且与文献数据基本一致^[9], 故鉴定化合物 **7** 为 19-(*R*)-methoxytubotaiwine。

化合物 **8**: 白色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z : 351 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.58 (3H, dd, $J = 7.1, 2.3$ Hz, H-18), 2.10 (1H, d, $J = 14.9$ Hz, H-14b), 2.48 (1H, ddd, $J = 14.9, 5.4, 2.7$ Hz, H-14a), 2.80 (1H, dd, $J = 15.7, 3.2$ Hz, H-5b), 2.94~3.12 (2H, m, H-6), 3.24 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-21b), 3.52 (3H, s, 22-OMe), 3.76 (1H, m, H-15), 3.77 (1H, m, H-5a), 3.90 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-3), 4.11 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-21a), 5.57 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-19), 7.32~7.43 (4H, m, H-9-12), 7.70 (1H, s, H-17); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献报道基本一致^[3-4], 故鉴定化合物 **8** 为 rhazimine。

化合物 **9**: 黄色无定形粉末, 易溶于甲醇; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 385 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) δ : 1.57 (3H, dd, $J = 7.0, 2.3$ Hz, H-18), 2.37 (1H, d, $J = 14.6$ Hz, H-6a), 2.64 (2H, m, H-6b, 14a), 3.00 (1H, m, H-14b), 3.48 (1H, dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz, H-5a), 3.58 (3H, s, 22-OMe), 3.77 (1H, m, H-15), 3.83 (1H, m, H-3), 4.05 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-5b), 4.20 (1H, t, $J = 14.5$ Hz, H-21a), 4.30 (1H, d, $J = 14.5$ Hz, H-21b), 5.06 (1H, s, H-17), 5.67 (1H, q, $J = 6.7$ Hz, H-19), 6.57 (1H, m, H-10), 6.79

(1H, m, H-11), 7.07 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-12), 7.28 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 见表 1。以上数据与文献基本一致^[10], 故鉴定化合物 **9** 为 rhazicine N^4 -oxide。

化合物 **10**: 黄色无定形粉末, 易溶于三氯甲烷; 在紫外波长 254 nm 下观察到暗斑, 碘化铯钾反应呈阳性。ESI-MS m/z 369 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.48 (3H, m, H-18), 1.95 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-14a), 2.40 (2H, m, H-6b, 14b), 2.92 (1H, d, $J = 11.9$ Hz, H-6a), 2.97 (1H, m, H-5b), 3.15 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-21a), 3.53 (3H, s, 22-OMe), 3.63 (2H, m, H-5a, 15), 3.71 (1H, m, H-3), 4.04 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-21b), 4.91 (1H, s, H-17), 5.47 (1H, m, H-19), 6.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-12), 6.79 (1H, m, H-10), 7.07 (1H, m, H-11), 7.19 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-9); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) 数据见表 1。以上数据与文献基本一致^[3-4], 故鉴定化合物 **10** 为 rhazicine。

4 抗肿瘤活性

4.1 肿瘤细胞毒活性筛选

用胰酶消化对数生长期的细胞, 离心收集细胞 (离心条件是 5 min、800 r/min), 弃去上清液, 稀释细胞悬液 25 倍, 并计数, 于 96 孔培养板中以 5×10^3 个/孔的细胞密度接种, 每孔的体积为 200 μL 。在培养箱中放置接种好的 96 孔培养板并培养 24 h, 加入 PBS 进行清洗, 更换为含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基并加入待测化合物。实验组化合物和阳性对照药物紫杉醇 (PTX, 购自 Sigma 公司) 的浓度设置为 31.25、62.50、125.00、250.00、1 000.00 nmol/L, 对照组加等体积的空白培养基, 并设置空白组以扣除背景影响, 重复实验 3 次, 各组分别设定 6 个复孔。

按上述实验分组处理培养 48 h, 紧接着每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10 μL , 用手振荡 30 s, 然后转入培养箱中继续培养 4 h, 缓慢的吸去培养液中的上清液, 并向 96 孔培养板中每孔加入 100 μL 的 DMSO, 常温避光振摇 5 min, 等甲臞结晶完全溶解后, 用酶标仪在 490 nm/570 nm 处检测吸光度 (A) 值。根据检测到的 A 值计算细胞存活率, 最后利用细胞存活率作为纵坐标 (Y), 浓度的对数值作为横坐标 (X), 作回归曲线, 计算 IC_{50} 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

实验结果显示, 化合物 **1** 和 **9** 对 A549 和 HepG2

细胞有显著的抑制作用, 化合物 4 对 MCF7 细胞有显著的抑制作用, 化合物 5 对 A549 和 MCF7 细胞有明显的抗增殖活性, 化合物 6 和 7 对 A549 细胞有明显的抗增殖活性, 化合物 8 对 A549、HepG2 和 MCF7 细胞有明显的抗增殖活性。其中化合物 8 对 MCF7 细胞的细胞毒活性最强, IC_{50} 值为 $0.40 \mu\text{mol/L}$ 。如表 2 所示, 以上对肿瘤细胞有抑制作用的化合物的 IC_{50} 值均小于阳性对照 PTX。其他化合物没有抑制肿瘤细胞增殖活性 ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$)。

表 2 生物碱化合物肿瘤细胞毒活性结果 ($n = 3$)

Table 2 Cytotoxicity results of compounds against tumor cells ($n = 3$)

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HepG2	MCF-7	A549
1	1.62 ± 0.76	> 50	0.67 ± 0.36
2	> 50	> 50	> 50
3	> 50	> 50	> 50
4	> 50	1.86 ± 0.51	> 50
5	> 50	0.44 ± 0.70	0.50 ± 0.34
6、7	> 50	> 50	1.67 ± 0.44
8	1.27 ± 0.63	0.40 ± 0.57	0.75 ± 0.38
9	2.23 ± 0.84	> 50	1.54 ± 0.43
10	> 50	> 50	> 50
PTX	17.62 ± 0.30	15.98 ± 0.36	27.76 ± 0.35

4.2 抗肿瘤潜在靶点和通路

4.2.1 网络药理学分析 将化合物导入 Pharmmaper 网站进行反向找靶的初步筛选, 紧接着使用 String 数据库进行靶标蛋白相互作用网络也就是 PPI 网络的构建, 接着利用 Metascape 网站进行 GO 分析和 KEGG 通路富集, 然后采用 Cytoscape 软件进行网络拓扑参数分析以及构建“化合物-靶点-通路”网络并对结果进行分析^[11-13]。

4.2.2 分子对接 利用 AutoDock Vina 进行分子对接模拟, 并采用 PyMol 制作化合物 4 与蛋白 RXRA 的结合模式图^[11,14]。

4.2.3 化合物-靶点-通路网络构建图 “化合物-靶点-通路”网络图中节点颜色由绿到红表示 Degree 逐步升高, Degree 越高说明该靶点蛋白在网络中占有较大比例, 分别调控多条癌症通路^[13]。根据网络分析可知靶点蛋白 RXRA (degree=8)、SRC (degree=7)、MAPK1 (degree=6) 和 PIK3R1 (degree=6) 是该网络中占主要地位的靶点蛋白, 是化合物发挥抗肿瘤作用的最关键靶点蛋白 (图 2)。

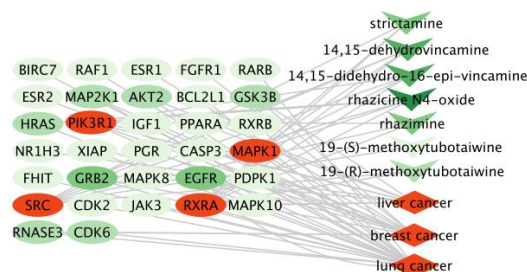


图 2 化合物 1、4~9 的化合物-靶点-通路网络图

Fig. 2 Compound-target-pathway network of compounds 1 and 4—9

4.2.4 分子对接结果 分子对接结果显示, 在化合物和蛋白质对接过程中均进入活性位点, 并且形成 1~3 个氢键。化合物 1、4~9 分别对蛋白 RXRA、SRC、MAPK1、PIK3R1 均具有较好的结合能力, 表明化合物可能通过作用于这 4 个蛋白发挥抗肿瘤作用。其中化合物 4 与蛋白 RXRA 的结合能最低, 结合能为 -46.75 kJ/mol , 表明化合物 4 与蛋白 RXRA 的结合能力最强。

利用 PyMol 制作化合物 4 与蛋白 RXRA 的结合模式图, 见图 3。灰色部分是蛋白 RXRA, 黄色部分是化合物 4。蛋白 RXRA 与化合物 4 通过氢键结合, 分析表明化合物与 RXRA 共形成 2 个氢键: RXRA 蛋白上 LYS-175 的羧基和化合物 4 上的羟基形

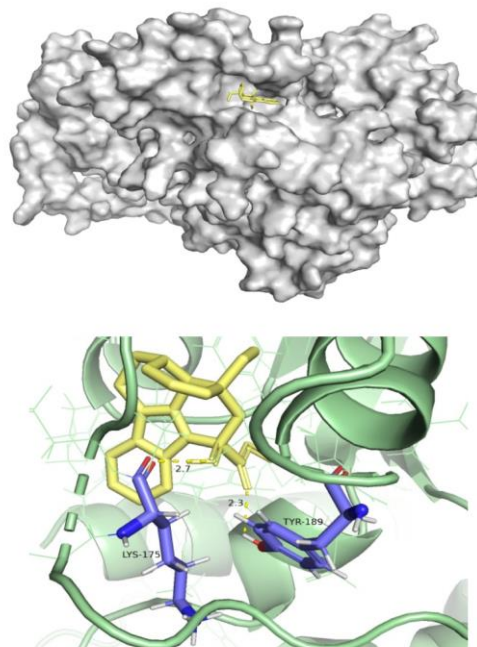


图 3 化合物 4 和蛋白 RXRA 分子对接结果

Fig. 3 Molecular docking results of compound 4 and RXRA

成 1 个氢键, 键长为 0.27 nm; TYR-189 的羟基与化合物 4 上的羰基形成 1 个氢键, 键长为 0.23 nm。

5 讨论

本研究通过常规天然药物化学方法从茶藤中分离鉴定 10 个生物碱化合物, 并且通过 MTT 法和网络药理学方法筛选出 7 个具有抗肿瘤活性的生物碱化合物。“化合物-靶点-通路”网络结果显示化合物 1 和化合物 4~9 主要通过基因 *RXRA*、*SRC*、*MAPK1* 和 *PIK3R1* 作用于非小细胞肺癌、肝癌和乳腺癌 3 条肿瘤通路。*RXRA*、*SRC*、*MAPK1* 和 *PIK3R1* 蛋白都能够参与细胞的分化、生长与发育等许多关键的生理过程, 从而调控肿瘤的发生与发展^[15-18]。

吲哚环结构可能是茶藤生物碱化合物发挥抗肿瘤活性的必要结构, 不同类型的取代基可能会对吲哚环发挥体外抗肿瘤活性产生不同的影响^[19-20]。给电子基, 如羟基、甲氧基等, 减弱化合物对肿瘤细胞的抗增殖活性; 吸电子基, 如羰基、酯基等, 增强化合物对肿瘤细胞的抗增殖活性^[21]。化合物 4 由于具有吸电子作用的酯基和平面的五元环结构使得抗肿瘤活性增强, 且与蛋白质结合的能量最低, 是最具有潜在抗肿瘤活性的化合物。

本研究中所有单萜吲哚生物碱成分均为首次从茶藤中分离得到, 丰富了该植物化学成分多样性。另外, 从细胞水平和网络药理学层面初步探讨了这些生物碱化合物的抗肿瘤活性, 研究结果为茶藤中抗肿瘤活性成分发现奠定了基础。后续将在此基础上进行更深入的体外、体内作用机制研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 63 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 25.
- [2] 王世平, 李玲, 徐冉, 等. 茶藤中生物碱成分的研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(19): 1766-1768.
- [3] 张东博, 杨勇, 宋忠兴, 等. 海南狗牙花的生物碱化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1286-1291.
- [4] Ahmed A, Li W, Chen F F, *et al.* Monoterpene indole alkaloids from *Rhazya stricta* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 128: 1-6.
- [5] Kan C, Deverre J R, Sevenet T, *et al.* Indole alkaloids from *Kopsia deverei* [J]. *Nat Prod Lett*, 1995, 7(4): 275-281.
- [6] 张秋萍, 张彬峰, 俞桂新, 等. 钩吻地上部分的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1305-1310.
- [7] 杨怡昱, 林铭滔, 杨丽, 等. 伞房狗牙花枝干化学成分的研究 [J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2019, 32(2): 119-123.
- [8] 程春雷, 袁孟菲, 谢静, 等. 药用狗牙花的单萜吲哚生物碱类成分 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2019, 40(4): 288-294.
- [9] Lim K H, Hiraku O, Komiyama K, *et al.* Biologically active indole alkaloids from *Kopsia arborea* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(8): 1302-1307.
- [10] 杨寒冰. 仔榄树枝叶的生物碱类成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [11] 许洪彬, 綦向军, 方彩珊, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨穿心莲内酯抗肿瘤机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(12): 1312-1319.
- [12] 赵松峰, 张晓坚. 基于反向分子对接和网络药理学的臭椿酮抗肿瘤作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4085-4092.
- [13] 陈兴, 张璐, 吴诗华, 等. 基于网络药理学探究人参治疗心肌缺血的作用机制 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(1): 9-13.
- [14] 李洋, 夏厚林, 周厚琴, 等. 基于分子对接技术预测人面子叶中黄酮成分抗菌作用靶点 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(10): 1303-1307.
- [15] 种姝伊. 新型舒林酸衍生物抗肿瘤作用及机制研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [16] 王登嵘, 刘显, 肖健. Src 蛋白激酶在疾病中的功能及研究现状 [J]. 医学与哲学: B, 2018, 39(1): 58-60.
- [17] 赵建, 刘建亮. miR-183 及 MAPK1 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其意义 [J]. 解剖学研究, 2014, 36(5): 325-327.
- [18] 郑建清, 廖小文, 苏菁菁, 等. PIK3R1 基因对乳腺癌侵袭转移及预后的影响机制初探 [J]. 吉林医学, 2019, 40(12): 2765-2766.
- [19] 胡诗寒, 贺超, 金枝, 等. 吲哚衍生物生物活性研究进展 [J]. 当代化工, 2022, 51(3): 718-722.
- [20] 汤晟, 孙鑫, 陈铮, 等. 吲哚类抗癌药物的研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20(1): 121-128.
- [21] 张浩然, 叶安琪, 张跃伟, 等. 人参皂苷衍生化及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4554-4567.

[责任编辑 王文倩]