

垫状卷柏中 1 个新骨架的炔酚类化合物

吴永平^{1,2}, 段金威³, 曹 园^{1,3*}

1. 南京中医药大学附属医院江苏省中医院, 江苏 南京 210029

2. 江苏省药物研究所, 江苏 南京 210009

3. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究垫状卷柏 *Selaginella pulvinata* 全草的化学成分。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20 等多种柱色谱方法进行分离纯化, 应用理化方法和波谱分析进行结构鉴定; 采用 MTT 法测定化合物对人非小细胞肺癌 A549 细胞的抑制活性。结果 从垫状卷柏全草的 95%乙醇提取物的醋酸乙酯部位分离得到 1 个新骨架类型的炔酚类化合物, 鉴定为 9-羟基-3,4,13-三(4-羟基苯基)-7H-二苯并[gh,pqr]四苯基-7-酮 (1); 化合物 1 对 A549 细胞显示出较强的抑制活性, 其半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 (16.29±1.44) μg/mL。结论 化合物 1 为新化合物, 命名为卷柏新酮, 具有选择性细胞毒活性。

关键词: 垫状卷柏; 炔酚类化合物; 卷柏新酮; 结构鉴定; 肿瘤细胞毒活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0039-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.005

A selaginellin derivative with novel skeleton from *Selaginella pulvinata*

WU Yongping^{1,2}, DUAN Jinao³, CAO Yuan^{1,3}

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of the whole plants of *Selaginella pulvinata*. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by silica gel and Sephadex LH-20 column chromatography. The structures of the isolated compounds were identified based on physicochemical properties and spectroscopic data, and the cytotoxic activities against tested human cancer cell lines were evaluated by MTT method. **Results** A novel selaginellin derivative was isolated from the whole plants of *S. pulvinata*, which was identified as 9-hydroxy-3,4,13-tris(4-hydroxyphenyl)-7H-dibenzo[gh,pqr]tetraphen-7-one (1). Compound 1 showed potent inhibitory activity against human non-small cell lung cancer A549 cell with its half maximal inhibitory concentration of (16.29 ± 1.44) μg/mL. **Conclusion** Compound 1 is a novel compound, named selaginbenzopyrene A, which shows selective cytotoxic activity.

Key words: *Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim.; selaginellin derivative; selaginbenzopyrene A; structure elucidation; tumor cytotoxicity

垫状卷柏为卷柏科 (Selaginellaceae) 卷柏属植物垫状卷柏 *Selaginella pulvinata* (Hook. et Grev.)

Maxim. 的干燥全草, 为中药卷柏的来源之一, 其性平、味辛, 具有活血通经之功效, 用于经闭痛经、

收稿日期: 2024-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82073983)

作者简介: 吴永平 (1973—), 男, 副研究员, 研究方向为天然药物化学。E-mail: wuyinfo@126.com

*通信作者: 曹 园, 女, 硕士生导师, 研究员, 研究方向为中药药效物质与质量标准。E-mail: yfy0012@njutcm.edu.cn

癰疽痞塊、跌扑损伤；炒炭后可化瘀止血，用于吐血、崩漏、便血、脱肛。在我国四川、云南、西藏、广西、广东等地的少数民族地区，垫状卷柏常作为中草药或民族药使用。现代药理研究表明，垫状卷柏不仅具有传统的消炎解毒、活血止血的功效，同时还具有防癌抗癌、抗菌、抗病毒、抗氧化、神经保护、降血糖等作用^[1-3]。其中的双黄酮类成分被认为是主要的活性部位之一；而结构新颖的炔酚类成分一经发现即引起了关注^[4]，新结构和新活性相继被报道。迄今为止，已从垫状卷柏中发现了 37 个炔酚类成分，分为 4 种类型^[5]，分别为含有亚甲基苯醌、联苯骨架、炔基苯酚的 A 型；由 A 型的 E 环和 C-9 碳正离子之间的芳香亲电取代反应形成 9H-芴环的 B 型；较 A 型缺少 C 或/和 D 环的 C 型，是类型 A 生源合成过程中的中间体；D 型是 A 型的简化结构，没有炔基苯酚官能团。本课题组相继从垫状卷柏中分离得到系列具有抗肿瘤和抗菌活性的炔酚类成分，多以外消旋的阻转异构体形式存在，以 A 型为主，包括 2 个首次从卷柏属植物中发现的 C-O-C 连接的二聚体 diselaginellin A 和 B，diselaginellin B 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration, IC₅₀）为 9.0 μmol/L^[6-9]。尹胜课题组从垫状卷柏中分离得到骨架重排、结构中含有 9H-芴的炔酚类成分，属于 B 型；对中枢神经系统炎症和呼吸系统疾病的重要靶标磷酸二酯酶-4（PDE4）具有很好的抑制作用^[10-12]。王世盛团队合成的联苯芳基乙炔类似物为 C 型炔酚类化合物，具有较强的 HIF-1 抑制作用，体内外研究证明其具有较好抗肿瘤活性^[13-14]。由此可见，卷柏中的炔酚类化合物结构新颖，类型多样，且具有丰富的药理活性，极有可能成为新药开发的潜在宝库，值得深入研究。

本研究继续垫状卷柏炔多酚类成分化学多样性的研究，综合应用硅胶柱、Sephadex LH-20 等柱色谱方法对垫状卷柏 95%乙醇提取物的醋酸乙酯部分进行分离，应用红外、高分辨质谱、核磁共振等谱学技术鉴定，得到了 1 个新骨架类型的炔酚类成分，命名为卷柏新酮（selaginbenzopyrene A），结构见图 1；并采用 MTT 法测定了化合物 1 对人非小细胞肺癌 A549 细胞的抑制活性。

1 仪器与材料

X-4 型双目镜显微熔点测定仪（温度未校正，北京泰克仪器有限公司）；Shimadzu UV-2501PC 型

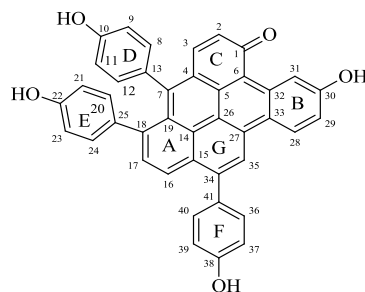


图 1 化合物 1 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of compound 1

可见-紫外分光光度计（日本岛津公司）；Bruker Tensor 27FT-IR 红外光谱仪（KBr 压片，德国 Bruker 公司）；LTQ Orbitrap XL 型质谱仪（美国 Thermo Scientific 公司）；Bruker AV-500/600 型核磁共振仪测定（TMS 为内标，德国 Bruker 公司）；薄层色谱硅胶 H、薄层色谱硅胶 GF₂₅₄、柱色谱硅胶（100~200、200~300 目，青岛海洋化工厂）；Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（瑞典 Pharmacia 公司）。细胞株由南京凯基生物科技发展有限公司提供；10% 胎牛血清培养液（GIBCO RPMI-1640，美国 Themro Fisher 公司）；二苯基四氮唑溴盐（MTT，美国 Sigma 公司）；阳性对照品紫杉醇（太极集团四川太极制药有限公司，批号 11120046）；酶标仪（美国 BioTek 公司）。

垫状卷柏采自云南省曲靖市，植物标本由昆明植分生物技术有限公司张红林工程师鉴定，南京中医药大学附属医院江苏省中医院药学部曹园研究员核实为卷柏科卷柏属植物垫状卷柏 *S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim.，标本（DZJB008）存放于江苏省中医院中药鉴定室。

2 方法

2.1 提取与分离

干燥垫状卷柏全草 5 kg，适当粉碎后用 10 倍量 95%乙醇水溶液加热提取 3 次，每次 4 h，合并提取液，减压浓缩至干，得到乙醇提取物。乙醇提取物加 3 L 热水悬浮，然后用石油醚萃取 3 次，回收溶剂后得到石油醚部位 13 g，然后用醋酸乙酯萃取 3 次，回收溶剂后，得醋酸乙酯部分 48 g，最后再用水饱和正丁醇萃取 3 次，减压回收溶剂得正丁醇部分 35 g。

醋酸乙酯部分（40 g）用 40 g 硅胶（100~200 目）拌样，0.5 kg（100~200 目）进行硅胶柱色谱，氯仿-甲醇（1:0~1:1）梯度洗脱，TLC 检测合并相同流分，得到 5 个流分（I~V），流分 III（氯仿-

甲醇 90 : 10) 约 6 g, 用 5 g 硅胶 (100~200 目) 拌样, 20 g (200~300 目) 进行硅胶柱色谱, 氯仿-甲醇 (1 : 0~1 : 1) 梯度洗脱, TLC 检测合并相同流分, 得到 5 个流分 (I~V), 流分 III (氯仿-甲醇 90 : 10) 约 0.5 g, 经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱, 甲醇洗脱, 得到化合物 **1** (3 mg)。

2.2 肿瘤细胞毒活性检测

以 10% 胎牛血清培养液 (RMPI 1640) 配成单个细胞悬液, 按每孔约 3×10^4 个细胞、100 μ L 添加到 96 孔板, 培养 24 h; 化合物 **1** 用 DMSO 溶解, 以 40 μ mol/L 浓度初筛, 并以 40、8、1.6、0.32、0.064 μ mol/L 浓度复筛, 以紫杉醇作为阳性对照, 设 3 个重复, 每孔终体积为 200 μ L; 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后, 贴壁细胞弃孔内培养液, 每孔加 20 μ L 的 MTS 溶液和 100 μ L 的培养液; 继续孵育 2~4 h, 待反应充分后, 利用多功能酶标仪测定各孔在 492 nm 处的吸光度 (*A*) 值。以浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线图, 应用两点法 (Reed and Muench 法) 计算化合物的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 值。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 粉红色油状物, 易溶于甲醇。TLC 254 nm 下呈暗斑, 10% H_2SO_4 -乙醇即显蓝紫色。UV λ_{max}^{MeOH} (nm): 243, 262, 355, 为含有芳环的共轭系统。红外光谱显示有酚羟基 (3421 cm^{-1})、对亚甲基苯醌的羰基 (1625 cm^{-1})、苯环 ($1610, 1498, 1512\text{ cm}^{-1}$)。高分辨质谱 HR-ESI-MS m/z 597.1693 [$M+H$]⁺ (计算值 597.68801) 得出其分子式为 $C_{41}H_{24}O_5$; 不饱和度为 29, 高于文献报道的炔酚类化合物。

由 1H -NMR (表 1) 并结合 1H - 1H COSY (图 2) 观察到 3 个 AA'XX' 自旋系统和 2 对相邻芳氢信号。3 个 AA'XX' 自旋系统: 6.52 (2H, d, $J = 8.1\text{ Hz}$, H-9, 11), 6.86 (2H, d, $J = 8.1\text{ Hz}$, H-8, 12); 6.49 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-21, 23), 6.78 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-20, 24); 7.63 (2H, d, $J = 8.1\text{ Hz}$, H-36, 40), 7.07 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-37, 39)。据此推测分子中有 3 个 1,4-二取代苯环 (D、E、F 环)。1 对相邻芳氢信号 δ_H 6.79 (1H, d, $J = 9.1\text{ Hz}$, H-2), 7.68 (1H, d, $J = 9.1\text{ Hz}$, H-3), 并由 HMBC 谱中 H-2 和碳信号 (δ_C 126.26, C-4; δ_C

表 1 化合物 **1** 的 1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150MHz, DMSO- d_6)
Table 1 1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound **1** (600/150MHz, DMSO- d_6)

碳位	δ_H	δ_C	碳位	δ_H	δ_C
1		186.63	22		156.40
2	6.79 (d, $J = 9.1\text{ Hz}$)	130.38	23	6.49 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$)	114.71
3	7.68 (d, $J = 9.1\text{ Hz}$)	136.85	24	6.78 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$)	131.40
4		126.26	25		134.79
5		128.66	26		118.97
6		119.08	27		132.88
7		149.62	28	9.24 (d, $J = 9.5\text{ Hz}$)	126.59
8	6.86 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	133.24	29	7.46 (dd, $J = 9.0, 1.6\text{ Hz}$)	118.81
9	6.52 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	114.30	30		159.67
10		156.75	31	9.86 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$)	109.94
11	6.52 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	114.30	32		133.24
12	6.86 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	133.24	33		123.04
13		129.74	34		143.33
14		126.37	35	9.08 (s)	122.60
15		127.61	36	7.63 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	132.22
16	8.43 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	129.44	37	7.07 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	115.93
17	7.82 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	132.33	38		158.13
18		146.97	39	7.07 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	115.93
19		128.16	40	7.63 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$)	132.22
20	6.78 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$)	131.40	41		130.57
21	6.49 (d, $J = 8.4\text{ Hz}$)	114.71			

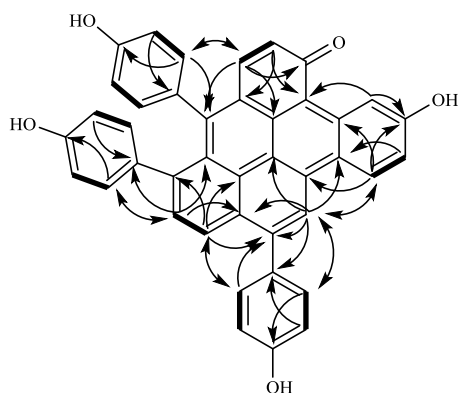


图 2 化合物 1 的主要 ^1H - ^1H COSY (—)、HMBC (---) 和 ROESY (↔) 相关

Fig. 2 Key ^1H - ^1H COSY (—), HMBC (---) and ROESY (↔) correlations of compound 1

119.08, C-6), 以及 H-3 和碳信号 (δ_{C} 186.63, C-1; δ_{C} 128.66, C-5; δ_{C} 149.62, C-7) 的相关峰, 推测为四取代醌环 (C 环) 相邻的氢; 并由 HMBC 谱中 H-3 和碳信号 (δ_{C} 149.62, C-7), 以及 H-8/12 和碳信号 (δ_{C} 149.62, C-7) 的相关峰推测 C 环与 D 环联于 C7。另一对相邻芳氢信号: δ_{H} 8.43 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-16), 7.82 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-17), 并由 HMBC 谱中 H-16 和碳信号 (δ_{C} 126.37, C-14; δ_{C} 146.97, C-18; δ_{C} 143.33, C-34), 以及 H-17 和碳信号 (δ_{C} 127.61, C-15; δ_{C} 128.16, C-19; δ_{C} 134.79, C-25) 的相关峰, 推测为四取代 A 环相邻的氢; HMBC 谱中 H-17 和 C-25 (δ_{C} 134.79), H-21/24 和 C-18 (δ_{C} 146.97) 的相关峰, 以及 ROESY 谱中 H-17 和 H-24 的相关峰, 说明 A 环和 E 环通过 C18-C25 键相连。同时还观察到 1 个 AMX 自旋系统: 9.24 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-28), 7.46 (1H, dd, $J = 9.0, 1.6$ Hz, H-29), 9.86 (1H,

d, $J = 2.0$ Hz, H-31), 并由 HMBC 谱中 H-31 和 C-6 (δ_{C} 119.08)、H-29 和 C-33 (δ_{C} 123.04) 以及 H-28 和 C-27 (δ_{C} 132.88)、C-32 (δ_{C} 133.24) 的相关峰推测 B 环与 C 环通过 C6-C32 键相拼接。1 个低场芳氢信号 δ_{H} 9.08 (1H, s, H-35) 在 HMBC 谱中和碳信号 (δ_{C} 118.97, C-26; δ_{C} 127.61, C-15; δ_{C} 132.88, C-27; δ_{C} 143.33, C-34; δ_{C} 123.04, C-33) 的相关峰说明五取代的芳环 G 和 A 环耦合, 并与 B 环通过 C27-C33 键相联, H-29 和 C-33 (δ_{C} 123.04), 以及 H-28 与 C-27 (δ_{C} 132.88)、C-32 (δ_{C} 133.24) 的相关峰也支持 B 和 G 环通过 C27-C33 键相联。F 环的 H-36/40 和 C-34 (δ_{C} 143.33) 的相关峰, 以及 ROESY 谱中 H-36 和 H-35, 以及 H-40 和 H-16 的相关峰说明 F 环连于 C-34。C 环的 C-5 为季碳, 应该与 C-26 连接, 此时的不饱和度刚好满足 29。

由此, 化合物 1 的结构鉴定为 9-羟基-3,4,13-三(4-羟基苯基)-7H-二苯并[gh,pqr]四苯基-7-酮; 经 SciFinder Scholar 检索为新化合物, 命名为卷柏新酮。其结构中多个苯环耦合, 为新型的炔酚骨架, 其生源途径可能由 A 型炔酚, 如 selaginellin C^[15] 的炔键和 B 环、C 环的烯键相互作用, 通过电子重排、环加成反应等反应, C5-C26、C6-C33、C35-C27 分别成键环合生成 (图 3)。

3.2 肿瘤细胞毒性

选用 3 株人类肿瘤细胞 (人胃癌细胞 BGC-823、人肝癌细胞 SMMC-7721、人非小细胞肺癌细胞 A549) 来研究化合物 1 的肿瘤细胞毒性, 以紫杉醇为阳性对照。结果表明, 化合物 1 具有较好的抑制 A549 细胞体外肿瘤生长的活性, 其 IC_{50} 值为 $(16.29 \pm 1.44) \mu\text{mol/L}$ 。

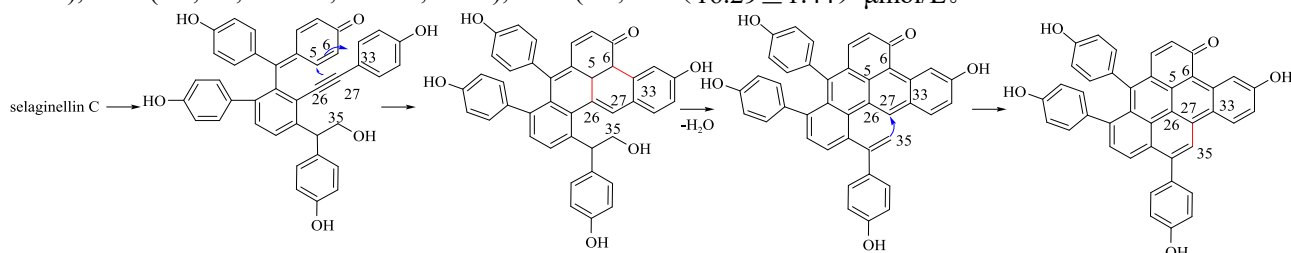


图 3 化合物 1 可能的生源合成途径

Fig. 3 Proposed biosynthetic pathway for compound 1

4 讨论

长久以来一直认为双黄酮类化合物是卷柏主要活性成分, 新近发现的炔酚类化合物迄今尚未经深入研究, 极具开发价值。本研究从垫状卷柏 95% 乙醇提取物的醋酸乙酯部位中发现 1 个新骨架类型

的炔酚化合物, 表现出良好的抗 A549 细胞增殖的活性。另外, 本研究同时发现了 2 个 A 型炔酚化合物, selaginellin O 和 Q 也表现出良好的抑制 A549 细胞增殖的活性, IC_{50} 值分别为 (45.51 ± 1.31) 、 $(28.22 \pm 4.28) \mu\text{mol/L}$ ^[7]。本研究的结果将为垫状卷

柏开开发成抗肿瘤产品及临床应用提供理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙允红, 王晓晴, 赵方舒, 等. 垫状卷柏的化学成分、药理作用现代研究及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(11): 115-121.
- [2] Wang C G, Yao W N, Zhang B, *et al.* Lung cancer and matrix metalloproteinases inhibitors of polyphenols from *Selaginella tamariscina* with suppression activity of migration [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(14): 2413-2417.
- [3] Woo S, Kang K B, Kim J, *et al.* Molecular networking reveals the chemical diversity of selaginellin derivatives, natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Selaginella tamariscina* [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82(7): 1820-1830.
- [4] Zhang L P, Liang Y M, Wei X C, *et al.* A new unusual natural pigment from *Selaginella sinensis* and its noticeable physicochemical properties [J]. *J Org Chem*, 2007, 72(10): 3921-3924.
- [5] Li W, Tang G H, Yin S. Selaginellins from the genus *Selaginella*: Isolation, structure, biological activity, and synthesis [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(4): 822-842.
- [6] Cao Y, Chen J J, Tan N H, *et al.* Antimicrobial selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(8): 2456-2460.
- [7] Cao Y, Yao Y, Huang X J, *et al.* Four new selaginellin derivatives from *Selaginella pulvinata*: Mechanism of racemization process in selaginellins with quinone methide [J]. *Tetrahedron*, 2015, 71(10): 1581-1587.
- [8] Cao Y, Wu Y P, Duan J A. A new selaginellin derivative from *Selaginella pulvinata* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(2): 199-202.
- [9] Cao Y, Zhao M, Zhu Y, *et al.* Diselaginellin B, an unusual dimeric molecule from *Selaginella pulvinata*, inhibited metastasis and induced apoptosis of SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80(12): 3151-3158.
- [10] Liu X, Luo H B, Huang Y Y, *et al.* Selaginpulvilins A-D, new phosphodiesterase-4 inhibitors with an unprecedented skeleton from *Selaginella pulvinata* [J]. *Org Lett*, 2014, 16(1): 282-285.
- [11] Huang Y Y, Liu X, Wu D Y, *et al.* The discovery, complex crystal structure, and recognition mechanism of a novel natural PDE4 inhibitor from *Selaginella pulvinata* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 130: 51-59.
- [12] Zhang J S, Liu X, Weng J, *et al.* Natural diarylfluorene derivatives: Isolation, total synthesis, and phosphodiesterase-4 inhibition [J]. *Org Chem Front*, 2017, 4(2): 170-177.
- [13] Wang S S, Wang X, Shao Y J, *et al.* Synthesis and evaluation of 3-(phenylethynyl)-1, 1'-biphenyl-2-carboxylate derivatives as new HIF-1 inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 116: 105298.
- [14] Wang S S, Liu L Q, Guo X H, *et al.* Synthesis of novel natural product-like diaryl acetylenes as hypoxia inducible factor-1 inhibitors and antiproliferative agents [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(24): 13878-13886.
- [15] Tan G S, Xu K P, Li F S, *et al.* Selaginellin C, a new natural pigment from *Selaginella pulvinata* Maxim (Hook et Grev.) [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(12): 1001-1004.

[责任编辑 王文倩]