

白及中菲类成分及其对膀胱癌 5637 细胞增殖及侵袭的研究

陈小明^{1,2}, 邹 洵², 谢 夷¹, 杨绍昌¹, 张琳晗¹, 邵金华^{1*}

1. 湖南科技学院化学与工程学院, 湖南 永州 425199

2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541000

摘要: 目的 揭示白及 *Bletilla striata* 提取物抗肿瘤的有效成分和潜在分子机制。方法 首先通过生物活性追踪方法鉴定白及中抗肿瘤活性成分。采用 CCK-8 法检测化合物对膀胱癌 5637 细胞的毒性, 进一步筛选出最优化合物。激光共聚焦显微镜观察最优化合物对膀胱癌细胞凋亡诱导。Transwell 侵袭实验检验最优化合物对膀胱癌细胞侵袭的影响, Western blotting 检测细胞内上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙黏蛋白 (neural-cadherin, N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、桥粒斑蛋白 (desmoplakin, DSP)、胞质紧密粘连蛋白 1 (zona occludens 1, ZO-1)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化细胞外蛋白调节激酶 (phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK) 蛋白表达水平。**结果** 从白及干燥块茎中分离鉴定出 12 个菲类化合物, 分别为 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲 (1)、红门兰醇 (2)、次苦参素 (3)、2,7-二羟基-1-(对羟基苄基)-4-甲氧基-9,10-二氢菲 (4)、4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲 (5)、2,7-二羟基-4-甲氧基菲 (6)、2-羟基-4,7-二甲氧基菲 (7)、8-(4-(甲酰氧基)苄基)-7-甲氧基-9,10-二氢菲-2,5-二基二甲酸酯 (8)、白及联菲 A (9)、7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮 (10)、7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮 (11)、7-羟基-2-甲氧基-菲-1,4-二酮 (12)。化合物 1 在 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, 对膀胱癌细胞 5637 抑制率为 (53.25 \pm 1.35)%, 在 10、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度下, 侵袭细胞数量显著减少, 分别为 (21.31 \pm 5.61) %、(54.72 \pm 0.98) %和 (83.12 \pm 0.98) %。**结论** 化合物 8、10~12 为首次从该植物中分离得到。化合物 1 可抑制 ERK 信号通路的激活来阻止膀胱癌 5637 细胞的增殖, 诱导细胞的凋亡, 并通过 EMT 进程抑制人膀胱癌 5637 细胞的侵袭。

关键词: 白及; 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲; 7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮; 7-羟基-2-甲氧基-菲-1,4-二酮; 抗肿瘤活性; 膀胱癌; 上皮间质转化

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)05-1525-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.005

Study on phenanthrene in *Bletilla striata* on proliferation and invasion of bladder cancer 5637 cells

CHEN Xiaoming^{1,2}, ZOU Xun², XIE Yi¹, YANG Shaochang¹, ZHANG Linhan¹, SHAO Jinhua¹

1. College of Chemical and Biological Engineering, Hunan University of Science and Engineering, Yongzhou 425199, China

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd. Guilin 541000, China

Abstract: Objective To reveal the anti-tumor active components and molecular mechanisms of *Bletilla striata*. **Methods** The toxicity of the compound to bladder cancer cell line 5637 was detected by CCK-8 method. The apoptosis of bladder cancer cells induced by coelonin solution was observed. Transwell invasion assay was used to examine the effect of coelonin on the invasion of bladder cancer cells, and western blot assay was used to detect the expression levels of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, desmoplakin, Zona occludens 1, extracellular regulated protein kinases (ERK), phospho-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK) protein in cells. **Results** A total of 12 compounds were isolated from *B. striata* rhizome, respectively coelonin (1), orchinol (2), lusianthridin (3), shancidin (4), 4,7-dihydroxy-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene (5), flavanthrinin (6), 2-hydroxy-4,7-dimehoxy-phenanthrene (7), 8-(4-(formyloxy)benzyl)-7-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-2,5-diyl diformate (8), blestriarene A (9), ephemeranthequinone (10), ochrone A (11), densiflorol B (12). Compound 1 at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed a (53.25 \pm 1.35)% inhibition rate on bladder cancer cell line

收稿日期: 2024-08-15

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目 (23B0751); 湖南省区域联合基金项目 (2024JJ7198)

作者简介: 陈小明, 副教授, 主要从事天然产物研究。E-mail: chengxiaomin_good@163.com

*通信作者: 邵金华, 教授, 主要从事中药药理和天然产物研究。E-mail: 1242103496@qq.com

5637. At different concentrations (low, medium and high), the number of invasive cells decreased significantly, which were $(21.31 \pm 5.61)\%$, $(54.72 \pm 0.98)\%$ and $(83.12 \pm 0.98)\%$, respectively. **Conclusion** Compounds **8**, **10**—**12** are identified from *B. striata* genus for the first time. Coelonin can inhibit the activation of ERK signaling pathway to prevent the proliferation of bladder cancer 5637 cells, and inhibit the invasion of cells through EMT process. The antitumor activity of coelonin, as the main active ingredient of *B. striata*, is worthy of further study.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F.; Coelonin; ephemeranθοquinone; densiflorol B; anti-tumor; bladder cancer

膀胱癌是全球范围内排名第九的恶性肿瘤,据全球癌症统计数据,每年有数百万亿的新增癌症病例和死亡发生^[1]。大多数患者为非肌层浸润性膀胱癌,然而,有25%的肿瘤被归类为肌层浸润性,这与高死亡率有关^[2]。目前,膀胱癌患者主要采用化学治疗降低术后复发率^[3]。但化疗药物产生的恶心、呕吐、血细胞减少不良反应同样不能忽视,同时也容易出现耐药性^[4-5]。因此,寻找新的治疗膀胱癌药物对于防治该疾病尤为迫切。

中药具有多靶点、多层次的功能特点,在癌症防治领域受到越来越多的关注^[6]。白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. F. 作为一种传统中药,广泛用于治疗肺胃疾病,如气胃出血、矽肺病、肺结核和胃溃疡,与其他中药配合使用,也可用于杀菌抗癌^[7]。从白及中鉴定出许多化合物,如联苜、菲、二氢菲、菲醌、酚酸和多糖^[8-9]。当前关于白及抗癌作用的研究重点主要为体外对人乳腺癌 MCF-7 细胞、人结肠癌 HT-29 细胞) 和人非小细胞肺癌 A549 细胞的抗增殖毒性^[10-11]。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 等蛋白靶点以及增殖、侵袭等表型均是肿瘤研究中的常用指标^[12-13], 但白及中活性成分是否通过影响上述指标发挥治疗膀胱癌作用的研究较少,白及中活性成分对于膀胱癌的作用及具体分子机制尚未明确。本实验从白及干燥块茎中分离得到 12 个菲类化合物,分别鉴定为 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲 (coelonin, **1**)、红门兰醇 (orchinol, **2**)、次苦参素 (lusianthridin, **3**)、2,7-二羟基-1-(对羟基苜基)-4-甲氧基-9,10-二氢菲 (shancidin, **4**)、4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲 (4,7-dihydroxy-2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene, **5**)、2,7-二羟基-4-甲氧基菲 (flavanthrinin, **6**)、2-羟基-4,7-二甲氧基菲 (2-hydroxy-4,7-dimehoxy-phenanthrene, **7**)、8-(4-(甲酰氧基)苜基)-7-甲氧基-9,10-二氢菲-2,5-二基二甲酸酯 [8-(4-(formyloxy)benzyl)-7-methoxy-9,10-dihydro-

phenanthrene-2,5-diylldiformate, **8**]、白及联菲 A (blestriarene A, **9**)、7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮 (ephemeranthoquinone, **10**)、7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮 (ochrone A, **11**)、7-羟基-2-甲氧基-菲-1,4-二酮 (densiflorol B, **12**)。其中,化合物 **8**、**10**~**12** 为首次从该植物种中分离得到。化合物 **1** 在 40 $\mu\text{g/mL}$ 下,对膀胱癌细胞 5637 抑制率为 $(53.25 \pm 1.35)\%$,在 10、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 下,侵袭细胞数量显著减少,分别为 $(21.31 \pm 5.61)\%$ 、 $(54.72 \pm 0.98)\%$ 和 $(83.12 \pm 0.98)\%$ 。化合物 **1** 可抑制 ERK 信号通路的激活来阻止膀胱癌 5637 细胞的增殖,诱导细胞的凋亡,并通过 EMT 进程抑制人膀胱癌 5637 细胞的侵袭。本研究初步探究了白及活性成分抗增殖与侵袭的作用机制,为临床使用白及有效成分进行抗膀胱癌治疗提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Bruker AVANCE III 400 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); PROFIBLOT 48 全自动蛋白印迹分析仪 (美国通用电气公司); IC1000 型细胞计数仪 (美国 Countstar 公司); PuriSmart-200 型高效液相制备色谱仪 (上海科哲生化科技有限公司); OLS5100 型共聚焦激光扫描显微镜 (奥林巴斯中国有限公司); DG5033A 型酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司)。

1.2 材料

白及药材购买自贵州兴义,经桂林三金药业股份有限公司邹洵高级工程师鉴定为兰科植物白及 *B. striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,标本 (BS20221010) 存贮于桂林三金股份有限公司中药标本室。

膀胱癌 5637 细胞株 (上海雅吉科技有限公司); DMEM 高糖培养基 (中国北京诺博莱德公司,批号 D1207); RPMI 1640 培养基 (批号 R1001)、胎牛血清 (FBS, 批号 C1112-01) 均购自美国 Thermo 公司; 细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂 (DoJindo 公司,批号 CK105); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国

Thermo 公司, 批号 23215); RIPA 蛋白裂解试剂(美国 Thermo 公司, 批号 R0131); 蛋白酶抑制剂(美国 Thermo 公司, 批号 P02021); ECL 发光试剂盒(美国 Millipore 公司, 批号 E1013); 多聚甲醛和结晶紫染色液(北京诺布莱德科技有限公司, 批号分别为 P2321、J1028); 上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)、神经钙黏蛋白(neural-cadherin, N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、桥粒斑蛋白(desmoplakin, DSP)、胞质紧密黏连蛋白1(zona occludens 1, ZO-1)单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的兔抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号分别为 3341S、2225S、C53E1、S472、3451P2、7076-2); 泛蛋白激酶 B(AKT pan)、磷酸化蛋白激酶 B: 丝氨酸磷酸化位点 473(P-AKTS473)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化细胞外蛋白调节激酶单克隆抗体(phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK), 购自美国 Thermo 公司, 批号分别为 P0125、E6021、E153、E231P; β -肌动蛋白单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号 66011-3-Ig), PBS(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 821642)。吉利他滨购自上海源叶科技有限公司。

2 方法

2.1 提取与分离

取干燥的白及药材 0.6 kg, 粉碎后置于圆底烧瓶中, 加入 4.0 kg 乙醇(70%)回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液浓缩成浸膏 900.5 g。将浸膏混悬于水, 依次用石油醚、醋酸乙酯萃取, 浓缩萃取液后得到石油醚部位(70.2 g)和醋酸乙酯部位(314.4 g)。通过细胞活性筛选确定醋酸乙酯为有效部位, 将浸膏与硅胶拌样后, 采用硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(50:1~4:1)梯度洗脱得到 4 个流分(Fr. A~D)。Fr. A(36.9 g)经柱色谱纯化, 石油醚-丙酮(20:1~5:1)梯度洗脱, 得到化合物 1(56.1 mg)、2(51.5 mg)、3(321 mg)和 4(400 mg)。Fr. B(161.6 g)经薄层制备和半制备型 HPLC 纯化(甲醇-水 80%~20%)获得化合物 5(t_R =10.2 min, 193 mg)、6(t_R =18.4 min, 284 mg)和 7(t_R =20.5 min, 58.4 mg)。Fr. C(47.6 g)通过半制备型 HPLC(乙腈-水 55%~45%)纯化, 得到化合物 8(t_R =5.8 min, 19.3 mg)、9(t_R =12.1 min, 12.4 mg)、10(t_R =15.8 min, 11.7 mg)。Fr. D(31.9 g)经硅胶柱色谱

纯化, 石油醚-醋酸乙酯(20:1~5:1)梯度洗脱得到化合物 11(13.6 mg)和 12(15.8 mg)。

2.2 细胞的孵育培养

将膀胱癌 5637 细胞(BCa 5637)用含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 RPMI 1640 完全培养液, 培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 选择处于对数生长期的细胞进行实验。

2.3 细胞增殖实验(CCK-8)

按照试剂盒说明书用 CCK-8 试剂盒测定细胞增殖和活力。将制备好的细胞悬液 100 μ L 加入 96 孔板(每孔 5 000 个细胞)。每孔 100 μ L, 每组设 4 个平行孔, 每孔加入含 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养液 80 μ L 和 20 μ L 化合物, 终体积为 200 μ L, 使化合物终质量浓度分别为 5、10、20、40、80 μ g/mL, 空白组用 PBS 缓冲溶液代替药物, 阳性药为吉利他滨。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 分别培养 24、48、72 h。在培养结束前 2 h 加入 CCK-8 溶液 10 μ L(5 mg/mL)孵育至终点, 用酶标仪测定 450 nm 下每孔的吸光度(A), 再根据公式计算细胞存活率。每组重复测定 3 次。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}}/A_{\text{空白}}$$

2.4 细胞凋亡实验

使用膜联蛋白 V-FITC 检测化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞的凋亡诱导特性。据“2.3”项实验结果选取适宜测试浓度。将实验分为对照组和化合物 1 低、中、高剂量(10、40、80 μ g/mL)组。将膀胱癌 5637 细胞在 37 °C 下给药处理 24 h。孵育, 消化收集细胞, 并用 PBS 洗涤 2 次, 在室温下用 5 μ L 膜联蛋白 V-FITC 染色 10 min。然后, 用激光共聚焦显微镜观察拍照, ImageJ 软件测量图片平均荧光强度。

2.5 Transwell 细胞侵袭试验

参照“2.4”项方法, 用不同测试浓度的化合物 1 与膀胱癌 5637 细胞共孵育 24 h, 然后将孵育好的细胞取 200 μ L(浓度为 5×10^5 CFU/mL)加入 Transwell 室上层, 下层加入含有 10%胎牛血清的培养基。48 h 后, 用 4%多聚甲醛中固定细胞 15 min, 0.1%结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤 2 次, 倒置显微镜下计数进入滤片下表面的细胞数。

2.6 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达

向给药后的膀胱癌 5637 细胞中加入细胞裂解液, 4 °C 孵育 30 min, 6 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。BCA 法检测蛋白浓度后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳将 10 μ L 蛋白转移到膜上。5%脱脂奶粉室

温封闭 2 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。二抗室温孵育 2 h, 最后加入 ECL 发光液进行显影, 用 Image J 软件分析照片灰度值, 计算结果。

2.7 统计学分析

统计学数据分析使用 Origin 2020 软件进行, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过单因素方差分析各组间的显著差异。

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.24 (1H, s, 4-OH), 8.12 (1H, s, 12-OH), 8.04 (1H, s, H-14), 6.71 (1H, s, H-11), 6.67 (1H, s, H-13), 6.48 (1H, s, H-5), 6.39 (1H, s, H-3), 3.84 (3H, s, 2-OMe), 2.65~2.66 (4H, s, H-7, 8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 116.4 (C-1), 158.8 (C-2), 99.2 (C-3), 157.3 (C-4), 108.3 (C-5), 140.1 (C-6), 31.3 (C-7), 31.0 (C-8), 140.1 (C-9), 125.8 (C-10), 114.9 (C-11), 157.3 (C-12), 113.6 (C-13), 129.8 (C-14), 55.8 (2-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **1** 为 2,7-二羟基-4-甲氧基-9,10-二氢菲。

化合物 **2**: 白色粉末, 分子式为 $C_{16}H_{16}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.10~8.12 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14), 6.69~6.71 (2H, d, $J = 10.0$ Hz, H-11, 13), 6.44~6.46 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-5), 6.41 (1H, s, H-3), 3.86 (3H, s, 4-OMe), 3.85 (3H, s, 2-OMe), 2.72~2.74 (4H, d, $J = 5.0$ Hz, H-7, 8); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 116.5 (C-1), 161.1 (C-2), 97.8 (C-3), 157.8 (C-4), 104.7 (C-5), 140.7 (C-6), 30.7 (C-7), 29.8 (C-8), 140.2 (C-9), 126.3 (C-10), 115.0 (C-11), 151.8 (C-12), 113.3 (C-13), 129.8 (C-14), 55.6 (2-OMe), 55.4 (4-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **2** 为红门兰醇。

化合物 **3**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.57 (1H, s, 12-OH), 8.17 (1H, s, 2-OH), 8.15 (1H, s, H-14), 6.68 (1H, s, H-11), 6.66 (1H, s, H-13), 6.45 (1H, s, H-5), 6.39 (1H, s, H-3), 3.72 (3H, s, 4-OMe), 2.68~2.72 (4H, m, H-7, 8); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 114.3 (C-1), 155.4 (C-2), 100.8 (C-3), 158.2 (C-4), 105.2 (C-5), 138.9 (C-6), 29.9 (C-7), 30.7 (C-8), 140.7 (C-9), 124.5 (C-10), 115.0 (C-11), 155.1 (C-12), 112.7 (C-13), 129.3 (C-14), 54.5 (4-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[15], 故鉴定化合物 **3** 为次苦参素。

化合物 **4**: 灰色固体粉末, 分子式为 $C_{22}H_{22}O_4$ 。

1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.18 (1H, s, 12-OH), 8.06 (1H, s, 4-OH), 7.93 (1H, s, 4'-OH), 7.82 (1H, s, H-14), 6.79~6.81 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-2', 6'), 6.57 (1H, s, H-11), 6.54 (1H, s, H-13), 6.52~6.53 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3', 5'), 6.43 (1H, s, H-3), 3.80 (2H, s, H-7'), 3.64 (3H, s, 2-OMe), 2.48~2.52 (2H, m, H-8), 2.41~2.43 (2H, m, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 112.6 (C-1), 153.3 (C-2), 98.3 (C-3), 156.5 (C-4), 117.9 (C-5), 139.4 (C-6), 26.5 (C-7), 29.3 (C-8), 138.7 (C-9), 125.4 (C-10), 113.8 (C-11), 155.2 (C-12), 114.8 (C-13), 128.8 (C-14), 54.8 (2-OMe), 132.4 (C-1'), 129.4 (C-2', C-6'), 115.1 (C-3', C-5'), 155.1 (C-4'), 29.7 (C-7')。以上数据与文献报道基本一致^[16], 故鉴定化合物 **4** 为 2,7-二羟基-1-(对羟基苄基)-4-甲氧基-9,10-二氢菲。

化合物 **5**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.25~8.27 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14), 6.99~7.01 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-13), 6.94~6.96 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8), 6.68 (2H, H-3, 5), 3.88 (3H, s, 4-OMe), 2.58~2.77 (4H, dd, $J = 5.0, 10.0$ Hz, H-7); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 116.7 (C-1), 156.1 (C-2), 99.5 (C-3), 159.2 (C-4), 108.5 (C-5), 141.8 (C-6), 31.7 (C-7), 31.1 (C-8), 140.5 (C-9), 126.6 (C-10), 113.6 (C-11), 157.5 (C-12), 115.2 (C-13), 130.0 (C-14), 55.8 (4-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **5** 为 4,7-二羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲。

化合物 **6**: 白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.50 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14), 7.33~7.35 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8), 7.14~7.16 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 7.13 (1H, s, H-11), 7.09~7.11 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-13), 7.02~7.04 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3, 5), 3.81 (3H, s, 2-OMe); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 115.7 (C-1), 159.2 (C-2), 100.6 (C-3), 153.3 (C-4), 110.5 (C-5), 134.1 (C-6), 124.7 (C-7), 127.1 (C-8), 133.5 (C-9), 124.3 (C-10), 110.2 (C-11), 154.1 (C-12), 115.7 (C-13), 129.2 (C-14), 55.7 (2-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **6** 为 2,7-二羟基-4-甲氧基菲。

化合物 **7**: 灰白色粉末, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_3$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.45~8.47 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-14), 7.63~7.65 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8), 7.54 (1H, s, H-7), 7.33~7.35 (1H, d, $J = 10.0$ Hz,

H-11), 7.21 (1H, s, H-13), 6.89~7.01 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3, 5), 3.88 (3H, s, 12-OMe), 3.85 (3H, s, 2-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 114.7 (C-1), 159.3 (C-2), 99.8 (C-3), 155.7 (C-4), 108.5 (C-5), 134.8 (C-6), 127.7 (C-7), 129.1 (C-8), 134.5 (C-9), 124.6 (C-10), 110.0 (C-11), 156.9 (C-12), 116.2 (C-13), 129.0 (C-14), 55.8 (2-OMe), 54.9 (12-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **7** 为 2-羟基-4,7-二甲氧基菲。

化合物 **8**: 白色粉末, 分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{O}_7$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.13 (3H, s, 4, 14, 5'-COOH), 7.99~8.01 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 6.99~7.00 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3', 5'), 6.69~6.70 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-2', 4'), 6.66~6.67 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3, 5), 6.62 (1H, s, H-13), 3.98 (2H, s, H-7'), 3.81 (3H, s, 12-OMe), 2.52~2.61 (4H, m, H-7, 8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 125.0 (C-1), 129.2 (C-2), 113.6 (C-3), 155.1 (C-4), 112.5 (C-5), 139.5 (C-6), 29.6 (C-7), 26.2 (C-8), 138.9 (C-9), 116.1 (C-10), 117.2 (C-11), 155.8 (C-12), 98.1 (C-13), 154.4 (C-14), 54.8 (12-OMe), 29.8 (C-7'), 132.2 (C-1'), 128.9 (C-2', 6'), 114.9 (C-3', 5'), 155.2 (C-4'), 161.9 (4, 14, 5'-COOH)。以上数据与文献报道基本一致^[17], 故鉴定化合物 **8** 为 8-(4-(甲酰氧基)苜基)-7-甲氧基-9,10-二氢菲-2,5-二基二甲酸酯。

化合物 **9**: 灰白色粉末, 分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_6$; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.21 (2H, s, 12, 12'-OH), 8.07~8.09 (2H, d, $J = 10.0$ Hz, 3, 3'-OH), 7.47 (2H, s, H-1, 1'), 6.67~6.69 (4H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2, 2', 4, 4'), 6.59 (2H, s, H-13, 13'), 3.86 (6H, s, 14, 14'-OMe), 2.55~2.58 (4H, m, H-8, 8'), 2.30~2.33 (4H, m, H-7, 7'); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 129.3 (C-1, 1'), 112.6 (C-2, 2'), 155.3 (C-3, 3'), 113.7 (C-4, 4'), 140.4 (C-5, 5'), 128.3 (C-6, 6'), 27.0 (C-7, 7'), 29.7 (C-8, 8'), 139.4 (C-9, 9'), 113.9 (C-10, 10'), 116.2 (C-11, 11'), 154.7 (C-12, 12'), 98.2 (C-13, 13'), 157.4 (C-14, 14'), 54.8 (14, 14'-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[14], 故鉴定化合物 **9** 为白及联菲 A。

化合物 **10**: 橘黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 9.49~9.51 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 3-OH), 8.04 (1H, s, H-4), 7.38 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1), 7.32 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2), 6.21 (1H, s, H-13), 3.95 (3H, s, 12-OMe), 2.85 (4H, s, H-7,

8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 127.3 (C-1, 6), 122.0 (C-2), 157.6 (C-3), 110.9 (C-4), 130.2 (C-5), 29.2 (C-7), 29.3 (C-8), 139.4 (C-9), 132.3 (C-10), 180.7 (C-11), 158.1 (C-12), 109.9 (C-13), 180.3 (C-14), 55.8 (12-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **10** 为 7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮。

化合物 **11**: 橘黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 8.20 (1H, s, 12-OH), 7.81~7.83 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1), 6.69 (1H, H-2), 6.08 (1H, s, H-4), 5.75 (1H, s, H-13), 3.80 (3H, s, 3-OMe), 2.53~2.67 (4H, m, H-7, 8); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 132.2 (C-1), 115.4 (C-2), 159.3 (C-3), 114.1 (C-4), 141.7 (C-5), 120.7 (C-6), 20.3 (C-7), 27.3 (C-8), 136.3 (C-9), 136.1 (C-10), 181.2 (C-11), 158.7 (C-12), 108.0 (C-13), 187.8 (C-14), 56.7 (3-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 **11** 为 7-羟基-2-甲氧基-9,10-二氢菲-1,4-二酮。

化合物 **12**: 红色粉末, 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3COCD_3) δ : 9.35 (1H, s, 3-OH), 8.07~8.09 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1), 7.96~7.98 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7), 7.32~7.34 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-8), 7.23~7.25 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-4), 6.28 (1H, H-2), 5.75 (1H, s, H-13), 3.86 (3H, s, 12-OMe); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3COCD_3) δ : 122.3 (C-1), 123.0 (C-2), 158.2 (C-3), 111.6 (C-4), 139.4 (C-5), 123.8 (C-6), 132.8 (C-7), 130.2 (C-8), 128.7 (C-9), 127.3 (C-10), 180.8 (C-11), 158.8 (C-12), 110.2 (C-13), 188.9 (C-14), 56.8 (12-OMe)。以上数据与文献报道基本一致^[4], 故鉴定化合物 **12** 为 7-羟基-2-甲氧基-菲-1,4-二酮。

3.2 化合物 1~12 对膀胱癌 5637 细胞的生长抑制作用

在 80 $\mu\text{g/mL}$ 下, 考察了不同菲类化合物对膀胱癌 5637 细胞的增殖抑制效果。化合物 **1~12** 对膀胱癌 5637 细胞均有一定的抑制作用, 抑制率 47.99%~88.86%。其中化合物 **1** 在此浓度下抑制活性最强, 为 88.86%, 结果见图 1。

3.3 化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞增殖活性抑制的影响

与对照组比较, 随着给药组化合物 **1** 质量浓度增加, 吸光度 (A) 值逐渐降低, 化合物对膀胱癌细胞的抑制呈浓度相关性, 膀胱癌细胞存活率逐渐下降 ($P < 0.05$)。在 40 $\mu\text{g/mL}$ 下, 化合物 **1** 对膀胱癌细胞 5637 抑制率为 (53.25 \pm 1.35) %, 结果见图 2。

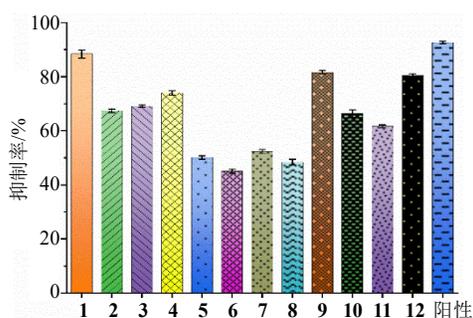
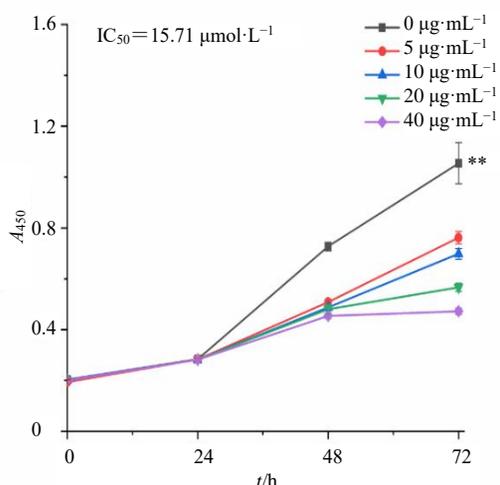


图1 化合物1~12的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Cytotoxicity of compounds 1—12 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below.

图2 化合物1对膀胱癌5637细胞增殖活性的抑制

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

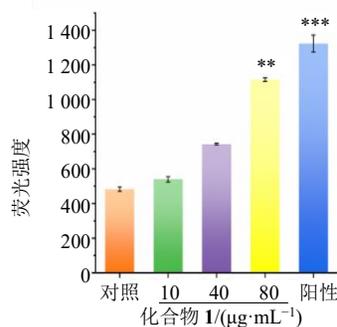
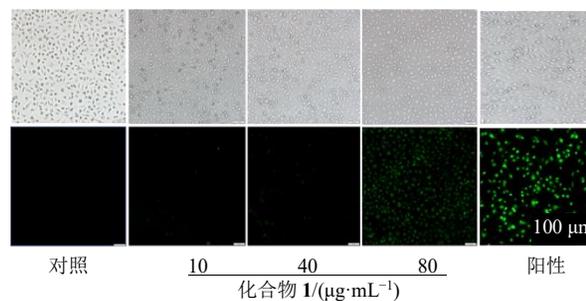
Fig. 2 Inhibitory effect of compound 1 on proliferation of bladder cancer cell line 5637 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 化合物1对膀胱癌5637细胞凋亡的影响

使用膜联蛋白 V-FITC 染色法,测定化合物1对膀胱癌5637细胞的凋亡诱导特性。由荧光显微图像(图3)可知,与对照组相比,化合物1低、中浓度有诱导细胞凋亡的作用,在80 µg/mL以上可以显著诱导细胞的凋亡($P < 0.01$),且具有浓度相关性。

3.5 细胞的侵袭实验

化合物1具有减少膀胱癌5637细胞侵袭的作用(图4)。与对照组相比,在低、中、高浓度(10、40、80 µg/mL)下,侵袭细胞数量显著减少($P < 0.01$ 、0.001),分别为(21.31 ± 5.61)%、(54.72 ± 0.98)%和(83.12 ± 0.98)%。这些发现也表明,化合物1可减少癌细胞的侵袭而抑制其增殖,并呈剂量相关性。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 下同。

*** $P < 0.001$ vs control group, same as below.

图3 V-FITC染色定性不同浓度化合物1对膀胱癌5637细胞的凋亡荧光显微图像(×100)

Fig. 3 Fluorescence microscopic images of apoptosis of bladder cancer 5637 cells stained with different concentrations of compound 1 using V-FITC (×100)

3.6 抑制癌细胞侵袭的机制

3.6.1 EMT蛋白的表达调控 EMT在肿瘤细胞中较为常见。EMT发生或肿瘤恶化时,间质表型标志物N-cadherin和Vimentin表达增加,E-cadherin表达会下降^[13]。由图5可见,与对照组相比,给药后不同质量浓度化合物1对应的N-cadherin和Vimentin蛋白表达出现了显著下降($P < 0.05$ 、0.01、0.001),E-cadherin蛋白均显著上调($P < 0.05$ 、0.01),均表现为抑制肿瘤细胞的间质转化,抑制肿瘤细胞的侵袭,且呈现浓度相关性。

3.6.2 紧密连接蛋白表达的调控 通过检测2种紧密连接蛋白ZO-1和DSP的表达含量来探究化合物1对细胞黏附的影响(图6)。结果表明,化合物1不仅可提高ZO-1的表达水平($P < 0.01$ 、0.001)还能提高DSP的表达水平($P < 0.05$ 、0.01),且同样呈现浓度相关性。这表明化合物1能增强细胞间黏附,从而阻碍癌细胞的侵袭,降低癌细胞的增殖。

3.7 通过MAPK途径抑制膀胱癌5637细胞增殖

有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中各成员蛋白Rat sarcoma-Raf protein kinase-mitogen-activated protein

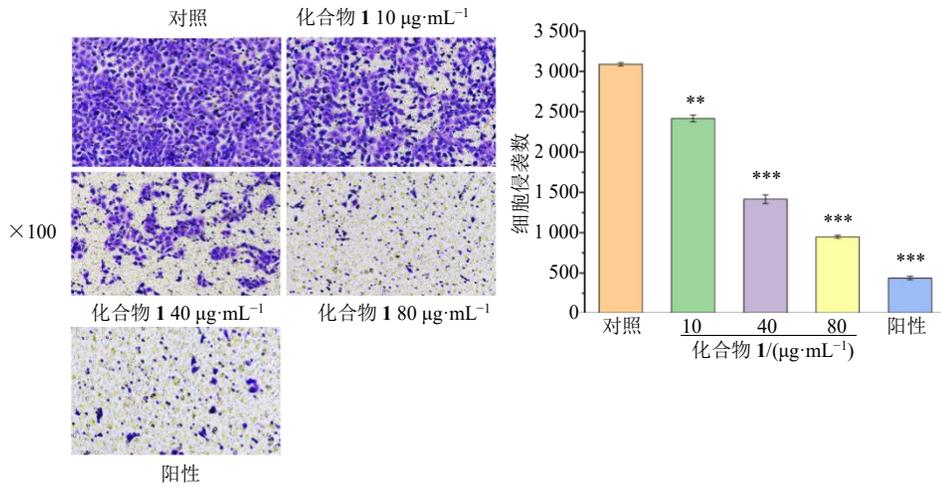


图 4 化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of compound 1 at different concentrations on invasion of bladder cancer 5637 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

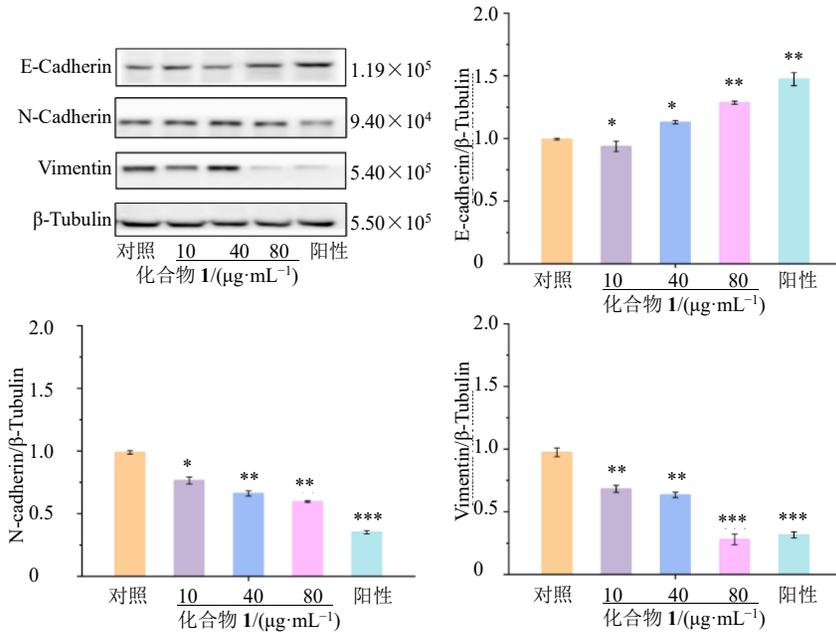


图 5 化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞上皮-间质转化蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of compound 1 on epithelial-mesenchymal transition proteins in bladder cancer 5637 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

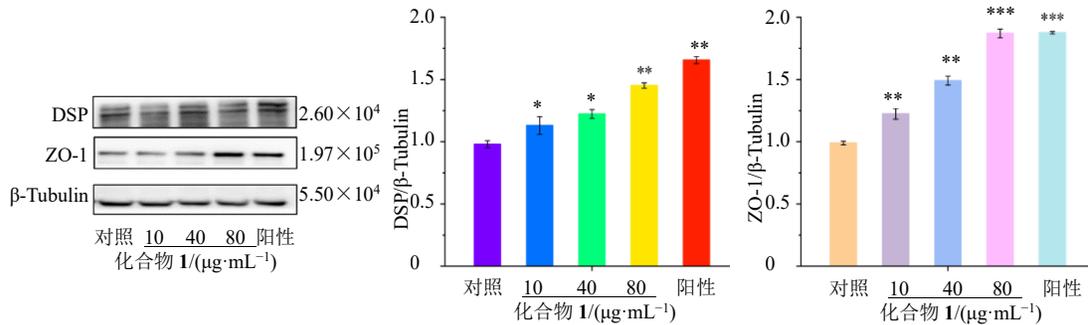


图 6 化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞紧密连接蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of compound 1 on tight junction protein in bladder cancer 5637 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

kinase kinase-extracellular regulated protein kinases (RAS-RAF-MEK-ERK) 的突变和异常表达在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。当信号通路未激活时, ERK 固定在胞浆中, 一旦有信号刺激 ERKs 磷酸化, 它将激活 ERKs 并将其转移到胞核或其它活

化位点, 再进一步磷酸化下游底物^[19]。如图 7 所示, 各给药组的对 ERK 蛋白的表达水平基本不受影响, 但 p-ERK 磷酸化水平均显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.05)。说明化合物 1 可以激活 ERK 下游转录蛋白参与 ERK 磷酸化, 从而抑制 ERK 活化后肿瘤细胞的增殖。

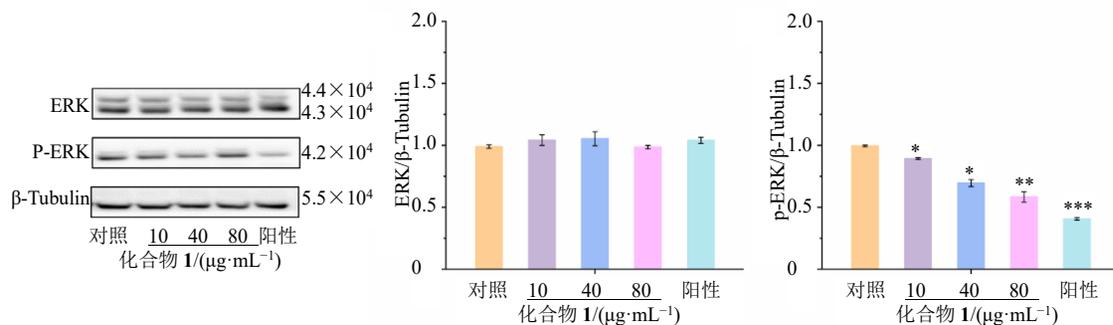


图 7 化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞 ERK 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of compound 1 on ERK protein in bladder cancer 5637 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

癌症的发生是多基因与多过程共同导致的结果。细胞通路信号因子的异常和 EMT 变化与膀胱癌进展密切相关。在这项研究中, 发现白及中 6 个结构相似的非类化合物对膀胱癌 5637 细胞具有中等到良好的抑制效果。此外, 经化合物 1 处理后细胞 EMT 相关蛋白标志物 E-cadherin 表达水平增加而 N-cadherin 和 Vimentin 表达水平减少, 与细胞相关的紧密连接蛋白 ZO-1 和 DSP 表达增加, 这表明化合物 1 可以通过抑制细胞 EMT 的变化来调控膀胱癌 5637 细胞的增殖和侵袭。当化合物 1 给药浓度越高时, ERK 磷酸化程度逐渐降低, 而 ZO-1 和 DSP 蛋白表达水平逐渐增高, 与此相关的间质表型标志物 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达出现了下降, E-cadherin 蛋白都出现了上调, 这表明 ERK 活性被抑制时, 化合物 1 对 5637 细胞增殖、侵袭和凋亡及其相关蛋白的影响之间是存在相关性的。

研究表明, 许多二氢菲衍生物通发挥抗肿瘤作用与酚羟基的存在显著相关^[20]。有趣的是, 化合物 1 有 2 个酚羟基, 这与它的抗增殖作用是一致的。同时通过分析化合物的结构, 发现取代基的类型与位置也与细胞的抑制活性存在关联, 对位存在羟基的化合物活性要强于其它衍生物结构。这提示在提高抑制活性时, 优先考虑 2、7 号位官能团的改造。

菲类衍生物是白及中提取的天然活性成分, 具有广谱的抗癌活性, 包括肝癌、胃癌、乳腺癌和消化道恶性肿瘤等, 其毒性水平低, 癌症患者耐受性

好^[21-22]。研究表明, MAPK 通路的 ERK 磷酸化降低可能参与膀胱癌细胞侵袭与增殖, 已成为治疗膀胱癌的有效靶点^[23]。因此, 本研究进行了实验来评估化合物对 MAPK 途径的抑制作用。蛋白质印迹分析显示, 化合物 1 显著降低了 ERK 蛋白磷酸化的表达, 但它对总 ERK 表达的调节却没有变化。这些结果支持了化合物 1 通过 MAPK 通路抑制癌症细胞的增殖与凋亡。有报道指出, 菲类衍生物 CTT 可通过抑制磷脂酰肌醇激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶 B/核转录因子-κB (phosphatidylinositol 3 kinase/protein-serine-threonine kinase/nuclear factorκB, PI3K/AKT/NF-κB) 信号通路诱导细胞凋亡^[24]。也有研究指出菲类化合物通过调节 PI3K/AKT/mTOR 途径抑制癌细胞的增殖、生长、侵袭^[25]。很明显, 虽然化合物 1 可以以剂量依赖的方式抑制膀胱癌 5637 细胞的增殖与 ERK 磷酸化, 但尚不清楚它是否通过 EMT 与 ERK 途径共同发挥作用, 还是由单一因素产生的增殖与侵袭。后续研究可进一步设计更科学合理的实验来阐明化合物 1 对膀胱癌 5637 细胞机制, 为今后分子机制的深入研究与临床试验提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu J W, Gao Y, Song C, *et al.* Immunotherapeutic prospects and progress in bladder cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(5): e18101.
- [2] Dyrskjot L, Hansel D E, Efstathiou J A, *et al.* Bladder cancer [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 58.

- [3] Iguchi N, Hecht S L, Gao D X, *et al.* Sexual dimorphic impacts of systemic vincristine on lower urinary tract function [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5113.
- [4] Cho C J, Yu C P, Wu C L, *et al.* Decreased drug resistance of bladder cancer using phytochemicals treatment [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(2): 128-135.
- [5] Al-Taher A Y, Morsy M A, Rifaai R A, *et al.* Paeonol attenuates methotrexate-induced cardiac toxicity in rats by inhibiting oxidative stress and suppressing TLR4-induced NF- κ B inflammatory pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 8641026.
- [6] Liu Z X, Lu T M, Qian R N, *et al.* Exploiting nanotechnology for drug delivery: Advancing the anti-cancer effects of autophagy-modulating compounds in traditional Chinese medicine [J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 2507-2528.
- [7] He X R, Wang X X, Fang J C, *et al.* *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38.
- [8] 俞杭苏, 代斌玲, 钱朝东, 等. 白及须根化学成分及其体外抗菌活性研究 [J]. *中草药*, 2016, 39(3): 544-547.
- [9] Chen B C, Lin C X, Chen N P, *et al.* Phenanthrene antibiotic targets bacterial membranes and kills *Staphylococcus aureus* with a low propensity for resistance development [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1593.
- [10] Lee J H, Kim M G, Lee S N, *et al.* Effects of *bletillae* rhizoma on the elastase, collagenase, and tyrosinase activities and the procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts [J]. *Korea J Herbology*, 2013, 28(1): 9-14.
- [11] Zhou M, Jiang S, Chen C F, *et al.* Bioactive bibenzyl enantiomers from the tubers of *Bletilla striata* [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 911201.
- [12] Gao X G, Shan W H, Liu X Y, *et al.* JNK1/2 and ERK1/2 provides vital clues about tumor recurrence and survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(24): 2471-2481.
- [13] Manfioletti G, Fedele M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11386.
- [14] 刘美凤, 丁怡, 张东明. 竹叶兰菲类化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(5): 353-356.
- [15] 罗芳, 俞映, 张琳晗, 等. 白及中的化学成分鉴定及对金葡菌的抑制机理研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(11): 1894-1901.
- [16] Yamaki M, Bai L, Inoue K, *et al.* Biphenanthrenes from *Bletilla striata* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3503-3505.
- [17] 周晓蓉, 杨梅君, 杨玥娜, 等. 独蒜兰的化学成分及其生物活性 [J]. *昆明医科大学学报*, 2023, 44(5): 1-5.
- [18] Bhaskar M U, Rao L J M, Prakasa Rao N S, *et al.* Ochrone A, a novel 9, 10-dihydro-1, 4-phenanthraquinone from *Coelogyne ochracea* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(2): 386-389.
- [19] Wang Y M, Gao C, Zhang Y F, *et al.* Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation *via* activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 143(1): 168-178.
- [20] Klongkumnuankarn P, Busaranon K, Chanvorachote P, *et al.* Cytotoxic and antimigratory activities of phenolic compounds from *Dendrobium brymerianum* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 350410.
- [21] Sanders M J, Ratinaud Y, Neopane K, *et al.* Natural (dihydro)phenanthrene plant compounds are direct activators of AMPK through its allosteric drug and metabolite-binding site [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(5): 101852.
- [22] 冯敢生, 李欣, 郑传胜, 等. 中药白芨提取物抑制肿瘤血管生成机制的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83(5): 63-67.
- [23] Apel C, Dumontet V, Lozach O, *et al.* Phenanthrene derivatives from *Appendicula reflexa* as new CDK1/cyclin B inhibitors [J]. *Phytochem Lett*, 2012, 5(4): 814-818.
- [24] Özler S, Pazarci P. Anti-tumoral effect of beta-blockers on prostate and bladder cancer cells *via* mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(4): 384-388.
- [25] Liu Y D, Lin F L, Chen Y D, *et al.* Cryptotanshinone inhibites bladder cancer cell proliferation and promotes apoptosis *via* the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *J Cancer*, 2020, 11(2): 488-499.

[责任编辑 王文倩]