

黄杨木茎枝化学成分及体外抗肝癌活性研究

周子率^{1,2}, 吴桂莹², 陈明², 曹冲², 贾婵媛², 汤漩², 于海洋³, 袁振海², 王芳^{1,2*}, 张岱州^{1,2*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东省药学院中医药研究所, 山东 济南 250101

3. 天津中医药大学 现代中药创制全国重点实验室, 天津 301617

摘要: 目的 研究黄杨木 *Buxus microphylla* 茎枝中的化学成分及其体外抗肝癌活性。方法 利用硅胶、反相 C₁₈、羟丙基葡聚糖凝胶、高效液相、薄层色谱等方法系统分离纯化, 采用核磁共振、质谱等光谱、波谱技术鉴定结构, 使用 MTT 法评价化合物对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的细胞毒性, 同时采用流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响; Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达。结果 从黄杨木茎枝 70%乙醇提取物中分离到 18 个化合物, 分别鉴定为常春藤皂苷元 (1)、3-O-β-D-glucopyranosylspinasterol (2)、fagraeanolide (3)、*rel*-(2α,3β)-7-O-methylcedrusin (4)、caruilignan D (5)、(7'S,8R,8'S)-异落叶松素脂素 (6)、3-羟基-1,2-二甲氧基吡啶 (7)、1-甲氧基-2,3-亚甲二氧基吡啶 (8)、1,2,3-三甲氧基吡啶 (9)、丁香醛 (10)、丁香酸 (11)、香草酸 (12)、对羟基苯甲酸 (13)、远志糖醇 (14)、9-二十五烷酸 (15)、rhamnakoide B (16)、羽扇豆醇 (17) 和白桦脂醇 (18)。MTT 毒性测试表明, 化合物 2、3、16~18 对 HepG2 和 Hep3B 细胞显示出不同程度的细胞毒性, 化合物 2 具有明显的细胞毒性。初步作用机制研究表明, 在 10 μmol/L 浓度下化合物 2 显著增加凋亡细胞的比例, 并上调促凋亡蛋白 Bcl-2 关联 X 蛋白 (recombinant Bcl-2 associated x protein, Bax)、下调抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 的表达, 与对照组比较均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。结论 化合物 1、17~18 为三萜类化合物, 化合物 2 为甾体类化合物, 化合物 3~6 为木脂素类化合物, 化合物 7~9 为吡啶类化合物, 化合物 10~13 为酚酸类化合物, 化合物 14~16 为其他类化合物, 其中化合物 2~5、7~9 和 14~16 为首次从黄杨属植物中分离得到。体外抗肝癌活性表明, 化合物 2 具有明显的细胞毒活性, 其对 HepG2 细胞和 Hep3B 细胞的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 值分别为 5.87、6.42 μmol/L, 可以有效诱导 HepG2 细胞凋亡。

关键词: 黄杨木; 肝癌; 细胞毒活性; 凋亡; 3-O-β-D-glucopyranosylspinasterol; 3-羟基-1,2-二甲氧基吡啶; 远志糖醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)11-4103-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.11.003

Chemical constituents from stems and branches of *Buxus microphylla* and their anti-hepatocarcinoma activity

ZHOU Zishuai^{1,2}, WU Guiying², CHEN Ming², CAO Chong², JIA Chanyuan², TANG Xuan², YU Haiyang³, YUAN Zhenhai², WANG Fang^{1,2}, ZHANG Daizhou^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China

3. National Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Creation, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the chemical constituents of *Buxus microphylla* and their anti-hepatocarcinoma activity *in vitro*.

Methods The compounds were isolated and purified by column chromatography of silica gel, reversed-phase C₁₈, Sephadex LH-20, semi-preparative HPLC and preparative TLC. Their structures were elucidated by physicochemical properties and spectral analyses.

收稿日期: 2026-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274154); 山东省重点研发计划项目 (2021CXGC010508)

作者简介: 周子率, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: 1668632432@qq.com

*通信作者: 张岱州, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药活性成分发现与创新药物研发。E-mail: zhangdaizhou@sdaps.cn

王芳, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药药效物质与创新药物研发。E-mail: wangfang-zy@sdaps.cn

The cytotoxicity of the isolates against human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells was assessed using the MTT assay. Flow cytometry was employed to analyze cell apoptosis. Western blotting was used to detect the expression of proteins related to cell apoptosis. **Results** Eighteen compounds were isolated and identified from the 70% ethanol extract of *B. microphylla*, including hederagenin (1), 3-*O*- β -*D*-glucopyranosylspinasterol (2), fagraeanolide (3), *rel*-(2 α ,3 β)-7-*O*-methylcedrusin (4), caruilignan D (5), (7'*S*,8*R*,8'*S*)-isolariciresinol (6), 3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthrone (7), 1-methoxy-2,3-methylenedioxyanthrone (8), 1,2,3-trimethoxyanthrone (9), syringaldehyde (10), syringic acid (11), vanillic acid (12), *p*-hydroxybenzoic acid (13), polygital (14), 9-pentacosenoic acid (15), rhamnakoside B (16), lupeol (17), and betulin (18). The *in vitro* activity screening revealed that compounds 2, 3, 16—18 exhibited cytotoxicity in HepG2 and Hep3B cells, among which compound 2 was the most potent. compound 2 significantly increased the proportion of apoptotic cells and elevated the expression of apoptosis-related proteins such as Bax, decreased the expression of Bcl-2, all of which were statistically significant compared with control group ($P < 0.001$) at 10 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Compound 1 and 17—18 are triterpenoids; Compound 2 is a steroidal glycoside; compounds 3—6 are lignans, compounds 7—9 are anthrones, compounds 10—13 are phenolic acids, and compounds 14—16 are other types. Among them, compounds 2—5, 7—9, and 14—16 are isolated from the genus *Buxus* for the first time. In the anti-hepatocarcinoma activity assay, compound 2 demonstrated significant effects, with IC_{50} values of 5.87 $\mu\text{mol/L}$ and 6.42 $\mu\text{mol/L}$ against HepG2 and Hep3B cells, respectively. Moreover, it effectively induced apoptosis in HepG2 cells.

Key words: *Buxus microphylla* Siebold & Zucc.; hepatocellular carcinoma; cytotoxic activity; apoptosis; 3-*O*- β -*D*-glucopyranosylspinasterol; 3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthrone; polygital

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球发病率和死亡率均位居前列的恶性肿瘤, 预后差且治疗手段有限, 亟需开发新型药物^[1]。从天然产物中寻找先导化合物是药物研发的重要策略。黄杨木为黄杨科黄杨属小叶黄杨 *Buxus microphylla* Siebold & Zucc.的干燥茎枝, 现代药理研究表明, 黄杨木具有抗肿瘤、抗菌、调血脂等作用^[2], 其化学成分主要包括生物碱、黄酮和酚酸等^[3]。尽管有文献研究发现黄杨碱类成分具有抗肝癌活性, 但其代表性成分环维黄杨星 D (cyclovirobuxine D, CVB-D) 对 HepG2 细胞的抑制活性有限^[4], 且缺乏针对黄杨木中抗肝癌活性成分及作用机制的系统研究。

为阐明黄杨木治疗肝癌的药效物质基础, 本研究以其茎枝为对象, 系统开展其化学成分及体外抗肝癌活性研究。采用系统分离纯化技术, 综合运用多种色谱技术与波谱分析方法, 分离得到 18 个化合物, 分别鉴定为常春藤皂苷元 (hederagenin, 1)、3-*O*- β -*D*-glucopyranosylspinasterol (2)、fagraeanolide (3)、*rel*-(2 α ,3 β)-7-*O*-methylcedrusin (4)、caruilignan D (5)、(7'*S*,8*R*,8'*S*)-异落叶松素脂素 [(7'*S*,8*R*,8'*S*)-isolariciresinol, 6]、3-羟基-1,2-二甲氧基吡喃酮 (3-hydroxy-1,2-dimethoxyanthrone, 7)、1-甲氧基-2,3-二甲氧基吡喃酮 (1-methoxy-2,3-methylenedioxyanthrone, 8)、1,2,3-三甲氧基吡喃酮 (1,2,3-trimethoxyanthrone, 9)、丁香醛 (syringaldehyde, 10)、丁香酸 (syringic acid, 11)、香草酸 (vanillic acid, 12)、对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid,

13)、远志糖醇 (14)、9-二十五烷酸 (9-pentacosenoic acid, 15)、rhamnakoside B (16)、羽扇豆醇 (lupeol, 17) 和白桦脂醇 (betulin, 18)。其中, 化合物 2~5、7~9 和 14~16 均为首次从黄杨属中分离得到。进一步通过 MTT 实验评价了分离得到的化合物对于人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的增殖抑制作用。结果表明, 化合物 2、3、16~18 对 2 种细胞均表现出抑制活性, 其中化合物 2 的活性最强, 其半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 值分别为 5.87、6.42 $\mu\text{mol/L}$ 。为了研究化合物 2 的抗肝癌作用机制, 采用流式细胞术检测其对 HepG2 细胞凋亡的影响, 并通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 与 Bcl-2 关联 X 蛋白 (recombinant Bcl-2 associated X protein, Bax) 的表达水平。结果表明, 化合物 2 能够诱导 HepG2 细胞凋亡, 并上调促凋亡蛋白 Bax、下调抗凋亡蛋白的表达。本研究旨在阐明黄杨木中抗肝癌的关键物质基础, 并为抗肝癌药物的开发提供有潜力的先导化合物。

1 仪器与材料

1.1 药材与试剂

黄杨木茎枝于 2024 年 2 月购自河北省安国药材市场, 经山东省药学院中医药研究室郭琪主任药师鉴定为小叶黄杨 *B. microphylla* Siebold & Zucc.的茎枝。标本 (ZH240123) 存放于山东省药学院中医药研究所实验室。

羟丙基葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia

公司), 色谱用硅胶和硅胶预制板(青岛海洋化工集团公司); 二氯甲烷、甲醇、正丁醇等分析纯试剂(天津市富宇精细化工有限公司); 色谱纯试剂(甲醇、乙腈, 赛孚瑞化工邯郸有限公司); HepG2 细胞、Hep3B 细胞、LO2 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司); 胎牛血清(江苏四季青生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基、1×PBS 缓冲液、5%BSA 封闭液(北京索莱宝科技有限公司); 0.25%胰蛋白酶(江苏凯基生物技术股份有限公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western Blot 相关试剂(上海碧云天生物技术股份有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司); 抗体 Bax、Bcl-2(美国 CST 公司)和 GAPDH(美国圣克鲁斯公司); PVDF 膜(美国 Millipore 公司); 蛋白上样缓冲液(美国 Thermo 公司); 显影液(上海雅酶生物医药科技有限公司)。

1.2 仪器

TX100 型小型多功能提取、浓缩机组(武汉中大制药设备有限公司); Thermo Fisher Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪、Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Inova-600 型核磁共振光谱仪(美国 Varian 公司); Anton Paar MCP 300 型旋光仪(德国安东帕公司); Büchi Gradient Former B-687 型中压液相色谱仪(Pharmacia 公司); LC-10T 型高效液相色谱仪(SPD-10A 型紫外检测器, 日本岛津公司); SENCO 型旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司); YMC-Pack ODS-A 半制备色谱柱(250 mm×10 mm, 5 μm)(日本 YMC 公司); CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司); 电泳仪 PowerPac™ Basic(美国 BIO-RAD 公司); 化学发光分析仪 Spark(帝肯实验器材有限公司); HCP-168E 二氧化碳培养箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司); XDS200 型倒置生物显微镜(江西凤凰光学科技有限公司); 高速低温离心机(美国 Thermo 公司); TD5A-WS 型台式低速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); 调速多用振荡器(常州国宇仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 提取与分离

黄杨木茎枝粉碎(10 kg), 70%乙醇回流提取 3 次, 合并提取液减压浓缩, 得浸膏 560.2 g。浸膏加水悬浮, 依次用醋酸乙酯、正丁醇萃取, 分别得到醋酸乙酯部位(87.5 g)、正丁醇部位(60.3 g)、水部位(145.5 g)。

醋酸乙酯部位(87.5 g)经硅胶柱色谱(100~200 目), 用二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)梯度洗脱薄层板检测合并得 Fr. 1~7。Fr. 1(11.3 g)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(40:1→30:1)梯度洗脱合并得 Fr. 1-1~1-3。Fr. 1-2(1.2 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水 30:70)得化合物 **1**(8.5 mg, $t_R=17.36$ min); Fr. 3(10.6 g)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(20:1→15:1)梯度洗脱合并得 Fr. 3-1~3-4。Fr. 3-3(2.5 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、中压反相 C₁₈ 柱色谱(甲醇-水 30%~100%梯度洗脱)分离纯化过程中析出化合物 **3**(10.6 mg)、**4**(6.01 mg)和 **11**(13.2 mg)。Fr. 5(9.5 g)经硅胶柱色谱(200~300 目), 二氯甲烷-甲醇(10:1→8:1)梯度洗脱合并得 Fr. 5-1~5-2。Fr. 5-2(3.1 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 分离纯化(甲醇-水 50:50)得化合物 **5**(4.7 mg, $t_R=10.26$ min)、**7**(22.2 mg, $t_R=14.12$ min)、**8**(16.2 mg, $t_R=18.23$ min)和 **9**(16.0 mg, $t_R=21.16$ min); Fr. 6(800.3 mg)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(80:1→65:1)梯度洗脱合并得 Fr. 6-1~6-3。Fr. 6-2(124.5 mg)经中压反相 C₁₈ 柱色谱(甲醇-水 40%~100%梯度洗脱)分离纯化过程中析出化合物 **6**(10.2 mg)。

正丁醇部位(60.3 g)经硅胶柱色谱(100~200 目), 用二氯甲烷-甲醇(100:0→0:100)梯度洗脱薄层色谱检测合并得 Fr. 8~12。洗脱过程中析出化合物 **2**(205.7 mg)和 **10**(12.1 mg)。Fr. 8(12.2 g)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(100:1→80:1)梯度洗脱得化合物 **12**(18.4 mg)和 **14**(14.7 mg)。Fr. 9(6.5 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 分离纯化(乙腈-水 35:65)得化合物 **13**(22.2 mg, $t_R=19.36$ min)。Fr. 10(2.5 g)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(30:1→5:1)梯度洗脱得 Fr. 10-1~10-4。Fr. 10-1(623.3 mg)经半制备 HPLC 分离纯化(乙腈-水 50:50)得化合物 **15**(27.4 mg, $t_R=20.16$ min)。Fr. 11(540 mg)经硅胶柱色谱(200~300 目), 用二氯甲烷-甲醇(90:1→50:1)梯度洗脱, 洗脱过程中析出化合物 **16**(17.0 mg)、**17**(13.5 mg)和 **18**(14.0 mg)。

2.2 体外抗肝癌活性研究

2.2.1 细胞培养 HepG2、Hep3B 和 LO2 细胞用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培

培养基, 在 37 °C、5% CO₂的培养箱中培养, 1~2 d 换液, 3~4 d 进行传代, 所有实验均在细胞状态良好且处于对数生长期时进行。

2.2.2 MTT 法测定细胞增殖情况 将 HepG2、Hep3B 和 LO2 细胞以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板, 100 μL/孔, 每孔加入 100 μL 完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 待细胞完全贴壁且生长状态稳定后进行药物处理。设置空白对照组(仅含完全培养基, 无细胞)、阴性对照组(含细胞+不含药物的完全培养基)、药物处理组(含细胞+不同浓度梯度的药物培养基), 每组设置 6 个复孔。弃去 96 孔板原有培养基, 空白对照组与阴性对照组每孔加入 100 μL 不含药物的完全培养基, 药物处理组每孔分别加入 100 μL 浓度为 100、50、20、10、5 μmol/L 的含药培养基, 轻轻晃动 96 孔板使药物混匀, 继续置于培养箱中孵育 24 h 后, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 避光孵育 4 h。弃去上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 用酶标仪于 490 nm 波长下测定各孔的吸光度 (*A*) 值。按公式计算细胞存活率。

细胞存活率=(药物处理组平均 *A* 值-空白组平均 *A* 值)/(阴性对照组平均 *A* 值-空白组平均 *A* 值)

2.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡 将生长状态良好并且处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 3×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 设置空白对照组及不同浓度药物处理组(1、5、10 μmol/L), 每组 3 个复孔, 孵育 24 h。收集细胞, 用 PBS 洗涤, 加入 1×结合缓冲液重悬, 向细胞悬液中依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染色液, 混匀后室温避光孵育 10~15 min, 用流式细胞仪进行检测。

2.2.4 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达 将对数生长期的 HepG2 细胞以 1×10⁶ 个/孔接种于 6 孔板中, 加入不同浓度的待测化合物(终浓度分别为 25、10、5、1 μmol/L), 孵育 24 h 后, 收集细胞沉淀, 用 PBS 洗涤, 加入 100 μL IP 裂解液, 冰上裂解 1 h, 4 °C、10 000×*g* 离心 20 min, 取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品煮沸变性后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用封闭液室温封闭 2 h, 洗涤后加入一抗 4 °C 孵育过夜; 洗涤后, 室温孵育二抗 1 h, 洗涤后显影, 采用凝胶成像系统分析条带灰度值。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 白色无定型粉末。(+) -ESIMS *m/z*

473.4 [M+H]⁺, 分子式为 C₃₀H₄₈O₄。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 5.16 (1H, t, *J* = 4.2 Hz, H-12), 3.89 (1H, m, H-3), 3.87 (1H, d, *J* = 6.3 Hz, H-23a), 3.40 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-23b), 2.98 (1H, dd, *J* = 14.0, 4.6 Hz, H-18), 1.85 (1H, m, H-15a), 1.77 (1H, m, H-16a), 1.97 (1H, m, H-22a), 1.66 (1H, m, H-16b), 1.62 (1H, m, H-11a), 1.56 (1H, m, H-2a), 1.48 (1H, m, H-19a), 1.47 (1H, m, H-22b), 1.46 (1H, m, H-9), 1.36 (1H, m, H-6a), 1.30 (1H, m, H-7a), 1.24 (1H, m, H-1a), 1.22 (1H, m, H-5), 1.13 (1H, m, H-b), 1.11 (1H, m, H-21a), 0.97 (1H, m, H-19b), 0.96 (1H, m, H-7b), 0.92 (3H, s, Me-27), 0.88 (1H, m, H-21b), 0.84 (1H, m, H-15b), 0.78 (1H, dt, *J* = 7.6, 3.8 Hz, H-1b), 1.09 (3H, s, H-24), 0.87 (9H, s, H-25~27), 0.71 (3H, s, H-29), 0.53 (3H, s, H-30);

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 179.1 (C-28), 144.3 (C-13), 122.0 (C-12), 70.7 (C-3), 64.4 (C-23), 47.0 (C-5), 46.9 (C-9), 46.2 (C-17), 45.9 (C-19), 42.3 (C-4), 41.8 (C-14), 41.3 (C-18), 39.3 (C-8), 38.4 (C-1), 36.8 (C-10), 33.8 (C-21), 33.3 (C-22), 32.6 (C-29), 32.5 (C-7), 30.9 (C-20), 27.7 (C-15), 27.0 (C-2), 26.1 (C-27), 23.9 (C-30), 23.4 (C-11), 23.1 (C-16), 18.0 (C-6), 17.4 (C-26), 16.0 (C-25), 13.1 (C-24)。与文献报道 NMR 数据比较^[5], 确定化合物 **1** 为常春藤皂苷元。值得注意的是, 文献仅通过核磁分析推测了该成分的存在^[6], 而本研究首次从该属植物中分离得到其单体化合物。

化合物 **2**: 白色无定型粉末。[α]_D²⁵ -12.4 (c 0.18, CH₃OH); (+) -ESIMS *m/z* 575.2 [M+H]⁺, 分子式为 C₃₅H₅₈O₆。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 3.46 (1H, m, H-3), 5.20 (1H, m, H-7), 0.58 (3H, s, H-18), 0.71 (3H, s, H-19), 1.07 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, H-21), 5.16 (1H, dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, H-22), 4.99 (1H, dd, *J* = 16.0, 8.8 Hz, H-23), 0.84 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26), 0.90 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27), 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-29), 5.01 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'); ¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ: 139.3 (C-8), 138.5 (C-22), 129.4 (C-23), 117.6 (C-7), 102.0 (C-1'), 78.4 (C-5'), 78.3 (C-3'), 76.9 (C-3), 75.2 (C-2'), 71.6 (C-4'), 62.7 (C-6'), 55.8 (C-17), 55.1 (C-14), 51.2 (C-24), 49.4 (C-9), 43.2 (C-13), 41.0 (C-20), 40.9 (C-5), 39.4 (C-12), 37.1 (C-1), 34.5 (C-10), 34.3 (C-4), 32.0 (C-25), 29.8 (C-2, 6), 28.7 (C-16), 25.5 (C-28), 23.1 (C-15), 21.5 (C-11), 21.4 (C-21), 21.1 (C-27), 19.0 (C-26), 12.8 (C-19), 12.3 (C-29),

12.0 (C-18)。其中,甾醇侧链末端甲基的化学位移 [$H_3-26: \delta_H 0.84$ (d, $J = 6.6$ Hz), $H_3-27: \delta_H 0.90$ (d, $J = 6.6$ Hz)], $\delta_C 41.0$ (C-20) 与 20*R*,24*S*-构型的 3-*O*- β -*D*-glucopyranosylspinasterol^[7]特征数据吻合。故鉴定化合物 **2** 为 3-*O*- β -*D*-glucopyranosylspinasterol。

化合物 **3**: 黄色胶状物。(+) -ESIMS m/z 433.2 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{22}H_{24}O_9$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.69 (2H, s, H-2''), 6.63 (2H, s, H-2', 6'), 5.42 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-2), 5.15 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-6), 4.22 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-4a), 4.00 (1H, dd, $J = 4.2, 9.6$ Hz, H-4b), 3.78 (12H, s, 3', 5', 3'', 5''-OMe), 3.83 (1H, dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz, H-1); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 177.2 (C-8), 148.0 (C-3', 5'), 147.9 (C-3'', 5''), 135.7 (C-4'), 135.1 (C-4''), 130.2 (C-1''), 129.7 (C-1'), 103.8 (C-2'', 6''), 103.5 (C-2', 6'), 84.9 (C-6), 83.0 (C-2), 72.3 (C-4), 56.1 (3', 5'-OMe), 56.0 (3'', 5''-OMe), 52.3 (C-1), 48.6 (C-5)。以上数据与文献报道一致^[8], 故鉴定化合物 **3** 为 Fagraeanolide。

化合物 **4**: 白色无定型粉末。(+) -ESIMS m/z 361.3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{24}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.50 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-2), 3.47 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5a), 3.83 (1H, m, H-3a), 3.76 (1H, m, H-3a'), 6.74 (2H, brs, H-4,6), 2.62 (1H, td, $J = 6.2, 6.3$ Hz, H-3), 1.81 (1H, tt, $J = 6.5, 7.7$ Hz, H-5b), 3.58 (1H, t, $J = 6.5$ Hz, H-5c), 6.96 (1H, brs, H-2'), 6.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.77 (1H, brd, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 3.86 (3H, s, 7-OMe), 3.82 (3H, s, 3'-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 87.1 (C-2), 53.5 (C-3), 63.1 (C-3a/a'), 116.1 (C-4), 128.1 (C-4a), 135.0 (C-5), 31.0 (C-5a), 33.8 (C-5b), 60.4 (C-5c), 112.5 (C-6), 143.3 (C-7), 145.7 (C-7a), 133.0 (C-1'), 108.8 (C-2'), 147.2 (C-3'), 145.6 (C-4'), 114.3 (C-5'), 117.8 (C-6'), 55.0 (7-OMe), 54.5 (3'-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[9], 确定化合物 **4** 为 *rel*-(2 α ,3 β)-7-*O*-methylcedrusin。

化合物 **5**: 白色无定型粉末。(+) -ESIMS m/z 281.1 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{14}H_{16}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.64 (2H, s, H-2, 6), 4.64 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-7), 3.14 (2H, m, H-8, 8'), 3.59 (1H, dd, $J = 6.6, 9.5$ Hz, H-9 α), 4.36 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-9 β), 3.61 (1H, dd, $J = 3.9, 9.5$ Hz, H-9' α), 3.95 (1H, dd, $J = 9.5, 8.2$ Hz, H-9' β), 3.78 (6H, s, 3, 5-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 178.7 (C-7'), 147.9 (C-3,5), 135.1 (C-4), 129.9 (C-1), 103.6 (C-2), 85.6 (C-7), 70.1

(C-9), 69.4 (C-9'), 56.0 (3,5-OMe), 47.6 (C-8), 45.8 (C-8')。与文献 NMR 数据比较^[10], 确定化合物 **5** 为 caruilignan D。

化合物 **6**: 黄色油状物。(+) -ESIMS m/z 383.3 $[M+Na]^+$, 分子式为 $C_{20}H_{24}O_6$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.61 (1H, brs, H-2), 6.69 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 6.64 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.49 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 6.09 (1H, brs, H-5), 3.74 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-7'), 3.71 (3H, s, 3-OCH₃), 3.70 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.57 (2H, dd, $J = 10.6, 4.0$ Hz, H-9), 3.45 (2H, m, H-9'), 2.71 (2H, dd, $J = 12.7, 7.4$ Hz, H-7), 1.85 (1H, m, H-8'), 1.63 (1H, m, H-8); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 133.1 (C-1), 112.3 (C-2), 147.8 (C-3), 144.5 (C-4), 116.7 (C-5), 121.9 (C-6), 32.7 (C-7), 38.5 (C-8), 64.1 (C-9), 137.6 (C-1'), 113.7 (C-2'), 146.0 (C-3'), 145.0 (C-4'), 115.7 (C-5'), 127.7 (C-6'), 46.4 (C-7', 8'), 60.3 (C-9'), 56.0 (3-OMe), 56.1 (3'-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[11], 确定化合物 **6** 为 (7'*S*,8*R*,8'*S*)-异落叶松素脂素。

化合物 **7**: 黄色无定型粉末。EI-MS m/z 272 $[M]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.96 (1H, s, 3-OH), 8.11 (1H, dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-8), 7.77 (1H, td, $J = 7.8, 1.8$ Hz, H-6), 7.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.41 (2H, dt, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-7), 6.77 (1H, s, H-4), 3.87 (3H, s, 1-OMe), 3.80 (3H, s, 2-OMe); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.7 (C-9), 157.4 (C-4a), 154.5 (C-4b), 153.7 (C-3), 153.3 (C-1), 138.6 (C-2), 134.2 (C-6), 125.8 (C-8), 123.8 (C-7), 121.6 (C-8a), 117.2 (C-5), 109.1 (C-8b), 99.4 (C-4), 61.5 (1-OMe), 60.8 (2-OMe)。该化合物的结构及其 NMR 数据归属得到 2D NMR 图谱解析的进一步确证。将所有 NMR 数据与文献比较^[12], 确定化合物 **7** 为 3-羟基-1,2-二甲氧基吡酮。

化合物 **8**: 淡黄色无定型粉末。EI-MS m/z 270 $[M]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.76 (1H, dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz, H-8), 7.12 (1H, dt, $J = 1.8, 7.2$ Hz, H-7), 6.86 (1H, dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-5), 6.82 (1H, dt, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-6), 6.15 (1H, s, H-4), 5.55 (2H, s, -OCH₂-O-), 3.65 (3H, s, 1-OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 141.8 (C-1), 133.5 (C-2), 153.3 (C-3), 92.5 (C-4), 154.3 (C-4a), 154.4 (C-4b), 116.5 (C-5), 123.3 (C-6), 133.2 (C-7), 126.1 (C-8), 121.8 (C-8a), 110.1 (C-8b), 175.2 (C=O), 101.5 (-OCH₂-O-),

60.5 (1-OCH₃)。与文献 NMR 数据比较^[13], 确定化合物 **8** 为 1-甲氧基-2,3-亚甲二氧基吡啶。

化合物 **9**: 白色无定型粉末。EI-MS m/z 286 [M]⁺, 分子式为 C₁₆H₁₄O₅。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.20 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz, H-8), 7.75 (1H, m, H-6), 7.48 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, H-5), 7.33 (1H, m, H-7), 6.94 (1H, s, H-4), 4.01 (3H, s, 1-OMe), 3.98 (3H, s, 3-OMe), 3.87 (3H, s, 2-OMe); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 153.0 (C-1), 139.5 (C-2), 159.5 (C-3), 96.2 (C-4), 154.8 (C-4a), 155.3 (C-4b), 117.1 (C-5), 134.3 (C-6), 123.7 (C-7), 125.7 (C-8), 121.8 (C-8a), 109.8 (C-8b), 61.1 (1-OMe), 60.4 (2-OMe), 55.6 (3-OMe), 175.8 (C=O)。与文献 NMR 数据比较^[14], 确定化合物 **9** 为 1,2,3-三甲氧基吡啶。

化合物 **10**: 黄色无定型粉末。(+) -ESIMS m/z 183.1 [M+H]⁺, 分子式为 C₉H₁₀O₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 9.94 (1H, s, H-7), 7.42 (2H, s, H-2, 6), 4.12 (6H, s, 3, 5-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 191.0 (C-7), 147.7 (C-3, 5), 141.8 (C-4), 127.3 (C-1), 106.3 (C-2, 6), 54.9 (3,5-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[15], 确定化合物 **10** 为丁香醛。

化合物 **11**: 淡黄色无定型粉末。EI-MS m/z 198 [M]⁺, 分子式为 C₉H₁₀O₅。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.22 (2H, s, H-2, 6), 3.78 (6H, s, 3, 5-OMe); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 168.7 (-COOH), 147.4 (C-3, 5), 140.2 (C-4), 120.5 (C-1), 106.8 (C-2, 6), 55.4 (3,5-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[16], 确定化合物 **11** 为丁香酸。

化合物 **12**: 白色无定型粉末。EI-MS m/z 168 [M]⁺, 分子式为 C₈H₈O₄。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.55 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5, 6), 6.83 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-9), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 152.6 (C-4), 170.0 (C-7), 123.0 (C-2), 148.6 (C-3), 125.3 (C-6), 115.8 (C-5), 113.7 (C-1), 56.4 (3-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[17], 确定化合物 **12** 为香草酸。

化合物 **13**: 黄色油状物, (+) -ESIMS m/z 139.1 [M+H]⁺, 分子式为 C₇H₈O₃。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.08 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-2, 6), 7.02 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 120.8 (C-1), 131.1 (C-2, 6), 114.1 (C-3, 5), 161.4 (C-4), 168.1 (C-7)。与文献 NMR 数据比较^[18], 确定化合物 **13** 为对羟基苯甲酸。

化合物 **14**: 白色粉末。(+) -ESIMS m/z 187.3 [M+Na]⁺, 分子式为 C₆H₁₂O₅。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 4.38 (1H, dd, $J = 12.0, 4.8$ Hz, H-6a), 4.51 (1H, dd, $J = 12.0, 2.4$ Hz, H-6b), 3.68 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, H-1a), 4.30 (1H, dd, $J = 12.0, 5.4$ Hz, H-1b), 4.17 (1H, m, H-2), 4.12 (2H, dd, $J = 7.2, 2.4$ Hz, H-3, H-5), 3.83 (1H, brs, H-4); ¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 82.9 (C-5), 80.4 (C-3), 71.8 (C-4), 71.2 (C-2), 71.0 (C-1), 63.1 (C-6)。与文献 NMR 数据比较^[19], 确定化合物 **14** 为远志糖醇。

化合物 **15**: 白色无定型固体。EI-MS m/z 380 [M]⁺, 分子式为 C₂₅H₄₈O₂。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 1.83 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 1.09~1.14 (2H, m, H-3), 0.74~0.83 (8H, m, H-4~7), 1.48~1.51 (2H, m, H-8), 4.82~4.84 (2H, m, H-9,10), 1.48~1.51 (2H, m, H-11), 0.74~0.83 (26H, m, H-12~24), 0.37 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, H-25); ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 179.3 (C-1), 33.5 (C-2), 24.2 (C-3), 28.6 (C-4), 28.8 (C-5), 28.8 (C-6), 29.1 (C-7), 31.4 (C-8), 129.2 (C-9), 129.5 (C-10), 31.4 (C-11), 29.0 (C-12), 28.9 (C-13), 28.7 (C-14), 28.5 (C-15), 28.6 (C-16), 28.5 (C-17), 29.2 (C-18), 29.2 (C-19), 26.7 (C-20), 26.6 (C-21), 24.2 (C-22), 29.2 (C-23), 22.2 (C-24), 13.6 (C-25)。根据 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 中信号都位于高场推测该化合物为脂肪烃类化合物, 结合羰基信号 δ 179.3 (C-1) 及文献报道^[20]对比, 确定化合物 **15** 为 9-二十五烷酸。

化合物 **16**: 白色无定型粉末。(+) -ESIMS m/z 677.3 [M+H]⁺, 分子式为 C₂₈H₃₆O₁₇S。¹H-NMR (600 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 6.15 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1), 4.21 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, H-2), 4.39 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-3), 3.98 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4), 4.52 (1H, t, $J = 10.8$ Hz, H-5), 5.16 (1H, dd, $J = 11.2, 2.4$ Hz, H-6a), 4.54 (1H, t, $J = 10.8$ Hz, H-6b), 7.67 (1H, brs, H-2'), 7.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 7.44 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, H-6'), 5.63 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 4.39 (1H, t, $J = 8.4$ Hz, H-2''), 4.38 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-3''), 4.05 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4''), 4.42 (1H, t, $J = 8.8$ Hz, H-5''), 5.27 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6''a), 5.17 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, 6''b), 7.88 (1H, brs, H-2'''), 7.52 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6'''), 3.56 (3H, s, 3'-OMe), 3.91 (3H, s, 5'''-OMe), 3.47 (3H, s, COOMe); ¹³C-NMR (150 MHz, Pyridine-*d*₅) δ : 165.9 (C-1'), 165.7 (C-1'''), 155.0 (COOMe), 154.4 (C-3'), 153.0 (C-4'), 151.1 (C-5'''), 139.2 (C-4'''), 125.8 (C-

3'''), 122.9 (C-6'), 115.0 (C-5'), 112.7 (C-2'), 108.2 (C-2'''), 107.4 (C-6'''), 103.0 (C-1), 101.2 (C-1''), 78.6 (C-3), 78.4 (C-3''), 75.4 (C-5''), 75.2 (C-5), 74.9 (C-2), 74.3 (C-2''), 72.6 (C-4), 72.2 (C-4''), 66.0 (C-6), 65.3 (C-6''), 56.3 (3-OMe), 55.9 (COOMe), 55.3 (3-OMe)。与文献 NMR 数据比较^[21], 确定化合物 **16** 为 rhamnakoiside B。

化合物 **17**: 白色无定型粉末。EI-MS m/z 426 [M]⁺, 分子式为 C₃₀H₅₀O。¹H-NMR 谱低场区给出 1 个双键质子信号 δ 4.71 (1H, brs, H-30a), 4.59 (1H, brs, H-30b); 在高场区, 显示 7 个甲基质子信号 δ 1.27 (3H, s, H-23), 1.05 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, s, H-28), 0.96 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-27); 同时在 δ 1.05~2.04 显示部分重叠的多个亚甲基和(或)次甲基质子的多重峰信号。化合物 **17** 的 ¹³C-NMR 含有 1 组烯烃碳信号及 δ_c 150.1 (C-20), 109.4 (C-30), 且有较多信号落在 δ_c 14~60, 推测含有环烷烃结构。将所有 ¹³C-NMR 数据(表 1)与文献比较^[22], 最终鉴定化合物 **17** 为羽扇豆醇。

化合物 **18**: 白色无定型粉末。EI-MS m/z 442 [M]⁺, 分子式为 C₃₀H₅₀O₂。¹H NMR 谱低场区给出 1 个双键质子信号 δ 4.08 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-30a) 和 3.66 (1H, d, J = 10.8 Hz, H-30b); 在高场区, 显示 6 个甲基质子信号 δ 1.76 (3H, s, H-23), 1.22 (3H, s, H-29), 1.03 (3H, s, H-24, 26), 0.98 (3H, s, H-25), 0.84 (3H, s, H-27); 同时在 δ 1.05~2.04 显示部分重叠的多个亚甲基和(或)次甲基质子的多重峰信号。化合物 **18** 的 ¹³C-NMR 含有 1 组烯烃碳信号及 δ_c 151.0 (C-20), 109.7 (C-30), 且有较多信号落在 δ_c 14~60 范围内, 推测含有环烷烃结构。将所有 ¹³C-NMR 数据(表 1)与文献比较^[23], 最终鉴定化合物 **18** 为白桦脂醇。

3.2 黄杨木中化合物对细胞活性的影响

采用 MTT 法对分离得到的 18 种化合物进行 HepG2 细胞毒性实验。结果如表 2 所示, 化合物 **2**、**3**、**16**~**18** 对 HepG2 细胞显示出抑制活性, IC₅₀ 值为 5.87~47.29 $\mu\text{mol/L}$, 其余化合物活性较弱 (IC₅₀ > 50 $\mu\text{mol/L}$)。其中, 化合物 **2** 的抑制活性最强 (IC₅₀ = 5.87 $\mu\text{mol/L}$)。进一步选取活性较好的化合物 **2**、**3**、**16**~**18** 测试其对另一株人肝癌细胞 Hep3B 和人正常肝细胞 LO2 的抑制活性。结果显示, 这些化合物对 Hep3B 细胞亦具有抑制活性, IC₅₀ 值为 6.42~40.87 $\mu\text{mol/L}$, 而对 LO2 的 IC₅₀ 均大于 60 $\mu\text{mol/L}$,

表 1 化合物 **17**、**18** 的 ¹³C-NMR 数据 (150 MHz)

Table 1 ¹³C-NMR of compounds **17** and **18** (150 MHz)

碳位	17		碳位	18	
	(CDCl ₃)	(C ₅ D ₅ N)		(CDCl ₃)	(C ₅ D ₅ N)
1	38.7	39.0	16	35.6	30.0
2	28.0	28.4	17	43.0	48.1
3	79.0	77.9	18	48.0	48.3
4	38.9	39.3	19	48.3	48.9
5	55.3	55.6	20	151.0	151.0
6	18.3	18.8	21	29.7	30.2
7	34.3	34.9	22	40.0	34.4
8	40.8	41.0	23	15.4	15.3
9	50.4	50.5	24	29.7	29.9
10	37.2	37.4	25	16.1	16.2
11	20.9	21.1	26	16.0	18.5
12	25.1	25.8	27	14.6	14.7
13	38.1	37.2	28	18.0	59.2
14	42.8	42.8	29	19.7	20.8
15	27.5	28.1	30	109.4	109.7

表 2 化合物 **1**~**18** 的细胞毒性

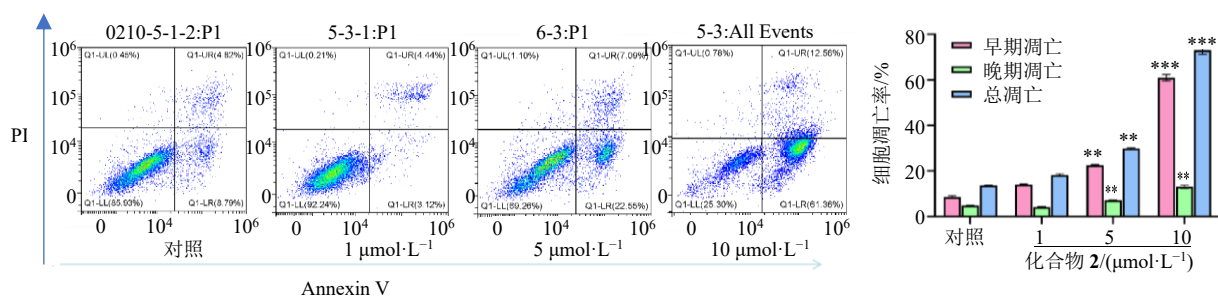
Table 2 Cytotoxicity of compounds **1**—**18**

化合物	IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	HepG2	Hep3B	LO2
2	5.87±0.47	6.42±0.32	>60
3	12.17±0.68	18.14±1.72	>60
16	32.84±1.21	28.82±1.56	>100
17	47.29±2.87	32.15±2.85	>100
18	41.23±1.36	40.87±1.54	>60
顺铂	3.74±0.36	4.88±0.25	35.19±2.43

表明其对正常肝细胞的毒性较低。阳性对照药顺铂对 Hep3B 细胞和 LO2 细胞的 IC₅₀ 分别为 (4.88±0.25)、(35.19±2.43) $\mu\text{mol/L}$ 。与测试化合物相比, 顺铂对正常肝细胞表现出更大的毒性。

3.3 化合物 **2** 诱导 HepG2 细胞凋亡

为进一步明确化合物 **2** 对细胞凋亡的调控效应, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术, 对 HepG2 细胞的早期凋亡与晚期凋亡水平进行定量检测。如图 1 所示, 与对照组比较, 化合物 **2** 可剂量相关性地诱导 HepG2 细胞发生凋亡; 随给药浓度升高, 细胞总凋亡率 (早期凋亡+晚期凋亡) 由 13.61%显著上升至 73.92% ($P<0.001$)。当化合物 **2** 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可分别诱导 61.36%的早期凋亡 ($P<0.001$) 与 12.56%的晚期凋亡 ($P<0.01$)。上述结果与前期研究趋势一致, 证实化合物 **2** 能够



与对照组同期凋亡比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group at the same period.

图 1 化合物 2 影响 HepG2 细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

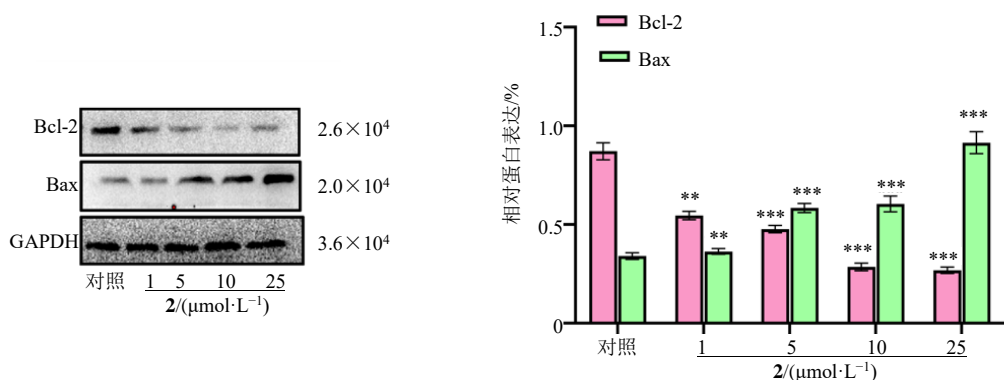
Fig. 1 Effects of compound 2 on apoptosis in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

显著诱导 HepG2 细胞凋亡。

3.4 化合物 2 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的调控作用

通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达。结果如图 2-A、B 所示, 与对照组比较, 经化合物 2 处理后, HepG2 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2

的表达下调, 而促凋亡蛋白 Bax 的表达上调, 且呈浓度相关性。在 25 μmol/L 浓度下, Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$), 而 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$)。结果表明, 化合物 2 可能通过上调 Bax 表达、下调 Bcl-2 表达来诱导细胞凋亡, 发挥抗肝癌活性。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 2 化合物 2 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of compound 2 on expression of apoptosis-related proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究对黄杨 70%乙醇提取物的醋酸乙酯和正丁醇部位的化学成分进行了系统研究, 从中分离了 18 个化合物。结合化合物的理化性质, 核磁共振谱、等结构鉴定的技术与方法, 鉴定了其结构。其中包括 3 个三萜类成分、1 个甾体类成分、4 个木脂素类成分、3 个吡啶酮类成分、4 个酚酸类成分以及 3 个其他类成分, 化合物 2~5、7~9 和 14~16 均为首次从黄杨属植物中分离鉴定。在活性测试方面, 采用 MTT 法评价了黄杨中分离得到的化合物对 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖抑制作用。结果显

示, 黄杨中的部分三萜和甾体类化合物具有显著的抗肿瘤活性, 木脂素类化合物未显示出抗肿瘤活性。其中化合物 2 可显著抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖, 其 IC₅₀ 值分别为 5.87、6.42 μmol/L。进一步作用机制研究表明化合物 2 可诱导肿瘤细胞 (HepG2) 凋亡, 调节凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2) 的表达。以上实验结果提示黄杨中的甾体皂苷类化合物 2 为其抗肿瘤活性成分。结合该化合物的化学结构及体外活性数据, 初步探讨了该类成分抗肿瘤活性的作用机制。上述研究结果丰富了黄杨的化学成分, 且揭示了黄杨中具有潜在抗肝癌作用的活性物质。

本研究目前主要集中在体外抗肝癌活性研究层面,虽初步明确了化合物**2**的抗肿瘤作用机制,但体外活性结果与体内实际抗肿瘤效果之间可能存在差异。因此,后续研究将进一步完善优势活性化合物**2**的体内外作用机制研究,如其是否诱导细胞周期阻滞或抑制肿瘤细胞转移等。同时,有必要开展药动学研究,阐明其体内吸收、分布、代谢和排泄过程,为后续剂型设计与临床前转化提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] McGuire S. World Cancer Report 2014 [J]. *Adv Nutr*, 2016, 7(2): 418-419.
- [2] 张颂军, 李晨阳. 黄杨科植物化学成分的研究进展 [J]. *当代医学*, 2012, 18(2): 25-26.
- [3] 张越浩, 关焕玉, 王永林, 等. 小叶黄杨非生物碱类成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(20): 114-117.
- [4] Jiang X R, Li H D, Liu Y. Cyclovirobuxine D inhibits hepatocellular carcinoma growth by inducing ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 96.
- [5] 薛俊娟, 叶国华, 魏国栋, 等. 芫花枝叶三萜类化学成分及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(8): 2524-2532.
- [6] Abreu A C, Paulet D, Coqueiro A, et al. Antibiotic adjuvants from *Buxus sempervirens* to promote effective treatment of drug-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(97): 95000-95009.
- [7] Lee T H, Lee S M, Lee D Y, et al. A glycosidic spinasterol from *Koreana Stewartia* promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in UVB-irradiated human dermal fibroblasts [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(5): 768-773.
- [8] Rattanaburi S, Kaikaew K, Watanapokasin R, et al. A new lignan from the stem bark of *Fagraea fragrans* Roxb [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(7): 1851-1856.
- [9] Seidel V, Bailleul F, Waterman P G. Novel oligorhamnosides from the stem bark of *Cleistopholis glauca* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(1): 6-11.
- [10] Ma C M, Nakamura N, Min B S, et al. Triterpenes and lignans from *Artemisia caruifolia* and their cytotoxic effects on meth-A and LLC tumor cell lines [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2001, 49(2): 183-190.
- [11] 包永睿, 阎新佳, 杨欣欣, 等. 白花败酱草的化学成分研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(2): 347-349.
- [12] 林黎琳, 黄锋, 陈四保, 等. 黄花倒水莲的化学成分及抗氧化活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(11): 827-830.
- [13] 常海涛, 牛锋, 温晶, 等. 小花远志中 酮类化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(21): 2259-2261.
- [14] 朱丹妮, 李丽, 朱瑶俊, 等. 黄花倒水莲化学成分研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(3): 222-224.
- [15] 陆孜霖, 黄婉凤, 何宇铭, 等. 葶澄茄化学成分及一对新的单萜对映异构体的鉴定和抗炎活性研究 [J]. *药学学报*, 2024, 59(5): 1348-1356.
- [16] Abbas F A, Al-Massarany S M, Khan S, et al. Phytochemical and biological studies on Saudi *Commiphora opobalsamum* L [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(5): 383-391.
- [17] 冯磊, 李飞, 于梦娟, 等. 荷青花全草有机成分的分离与鉴定 [J]. *特产研究*, 2019, 41(4): 72-74.
- [18] 李洪, 袁苑楠, 晏永明, 等. 宽跗陇马陆中 2 个新含氮化合物的分离鉴定 [J]. *药化学报*, 2025, 60(4): 1069-1073.
- [19] Le T T, Ha M T, Cao T Q, et al. 1, 5-Anhydro-D-glucitol derivative and galloylated flavonoids isolated from the leaves of *Acer ginnala* Maxim. as dual inhibitors of PTP1B and α -glucosidase enzymes: *In vitro* and *in silico* studies [J]. *Phytochemistry*, 2023, 213: 113769.
- [20] Deresa E M, Abdissa N, Abdissa D. Chemical constituents of the roots of *Kniphofia schimperi* and evaluation of their antimicrobial activity [J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): e28927.
- [21] Lu T M. Two novel carbonic acid esters conjugated with oligophenyl glucosides from *Rhamnus nakaharai* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2007, 48: 5415-5419.
- [22] Fotie J, Bohle D S, Leimanis M L, et al. Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda* [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(1): 62-67.
- [23] 吴洋洋, 李江龙, 白玉薇, 等. 红芪的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(19): 6482-6495.

[责任编辑 王文倩]