

田基黄体外抗乙型肝炎病毒活性成分的研究

郑超¹, 刘敏^{2*}, 李健²

¹汕头大学理学院生物系, 汕头 515063; ²中国人民解放军防化学院, 北京 102205

摘要: 为了研究田基黄抗 HBV 活性成分, 采用硅胶、Sephadex LH-20 及薄层色谱等方法从田基黄 60% 乙醇提取物中筛选、分离纯化抗乙型肝炎病毒的活性成分, 通过波谱解析和理化鉴别进行结构鉴定。以 HepG 22. 2. 15 细胞株为筛选工具, 用 MTT 法检测药物的细胞毒性; 以酶联免疫法 (ELISA) 检测细胞培养上清液的乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 和乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 的滴度。从乙酸乙酯的活性部位分离得到槲皮素-7-O 鼠李糖苷 (**1**)、(2R,3R) 双氢槲皮素-7-O- α -L 鼠李糖苷 (**2**)、槲皮苷 (**3**) 和 1,3,6,7-四羟基咕吨酮 (**4**) 4 种化合物, 其中化合物 **4** 是体外抗乙型肝炎病毒活性最高的化合物, 其对 HepG22. 2. 15 细胞 HBeAg 分泌的抑制率最高, 为 67. 66%, IC₅₀ 值为 40. 25 μ g/mL, 治疗指数 TI > 2。

关键词: 田基黄; 乙型肝炎病毒; e 抗原; 治疗指数

中图分类号: R93

文献标识码: A

Study on Anti-HBV Active Ingredient of *Hypericum japonicum*

ZHENG Chao¹, LIU Min^{2*}, LI Jian²

¹Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China;

²Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China

Abstract: In this study, silicagel, Sephadex LH-20 and thin layer chromatography were used to screen and isolate active anti-hepatitis B virus compounds from *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray extracted with 60% ethanol. Four compounds were isolated from the ethyl acetate extract of *H. japonicum* and their structures were characterized by spectral, chemical and structural analyses. In addition, using HepG22. 2. 15 cell line, the cytotoxicity and inhibitory effect on secretion of HBeAg and HBsAg of the 4 isolated compounds were examined by MTT and enzyme-linked immunosorbent assays. The 4 isolated compounds were determined to be vincetoxicocside (**1**), (2R,3R) double hydrogen quercetin-7-O- α -L-rhamnoside (**2**), quercitrin (**3**), and 1,3,6,7-tetrahydroxyflavone (**4**). Among these 4 compounds, compound **4** exhibited highest activity in inhibiting secretion of HBeAg in HepG 22. 2. 15 cells, with inhibition rate of 67. 66%, IC₅₀ of 40. 25 μ g/mL and therapeutic index TI > 2.

Key words: *Hypericum japonicum*; HBV; HBeAg; TI

乙型肝炎病毒 (HBV) 属于嗜肝 DNA 病毒, 全球大约有 3.5 亿人长期携带 HBV 病毒^[1]。大约 80% 的乙型肝炎病毒携带者有不同程度的肝损伤, 这可能发展成肝硬化和肝癌^[2]。临床研究表明, 大多数抗 HBV 药物如 IFN-a 和核苷类药物等只能暂时维持免疫抑制或者控制病毒的繁殖且停药后复发率较高, 易产生副作用及耐药突变。我国天然产物资源丰富, 许多天然产物被作为治疗乙型肝炎的药物, 且高效低毒, 所以从天然产物中分离提取治疗乙型肝炎病毒

的活性成分成为目前新型抗乙肝药物研发的热点之一。

田基黄为藤黄科金丝桃属植物地耳草 (*Hypericum japonicum* Thunb.) 的全草, 广泛用于治疗细菌性疾病、传染性肝炎、急性和慢性肝炎、肠胃失调、止血、抗病毒和抗肿瘤的药用植物^[3]。目前关于田基黄在保肝、治疗乙型肝炎方面有一定研究, 但其作用机理不明, 其活性成分也不清楚, 本实验追踪田基黄抗 HBV 的活性部位, 进一步分离纯化, 从田基黄乙酸乙酯活性部位中分离纯化得到体外抗乙型肝炎病毒活性最高的化合物 **4**, 其对 HepG22. 2. 15 细胞 HBeAg 分泌的抑制率最高, 为 67. 66%, IC₅₀ 值为 40. 25 μ g/mL, 治疗指数 TI > 2。

1 仪器与材料

CO₂ 培养箱(MCO-175, SANYO); 倒置显微镜(XDS-1B, 重庆光电仪器有限公司); 超净工作台(FLC-3, 北京德天佑科技公司); 立式压力蒸汽灭菌锅(LS-B75-L, 江阴滨江医疗设备厂), 酶标仪(Model-680, BIO-RAD); 电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9240A, 上海一恒科技有限公司); 旋转蒸发器(RE52CS, 上海亚荣生化仪器厂); 薄层色谱硅胶(GF₂₅₄)和柱层析色谱硅胶(200~300目)(青岛海洋化工厂); 硅胶层析中压制备仪(Agela, GP200A); Sephadex LH-20(Pharmacia 公司); UM-ECA-400 超导核磁共振仪(日本电子株式会社, TMS 为内标)。

21 种中药材购买于安国市冷背药材有限公司。HepG2 2.2.15 细胞株购自美国 MountSinai 医学中心, 自行传代培养。

DMEM 培养液、胎牛血清(Hyclone 公司); 青霉素-链霉素-胰蛋白酶(GIBCO 公司); G-418、DMSO(Amresco 公司); MTT(Sigma 公司); HBeAg、HBsAg ELISA 检测试剂盒(北京科卫临床诊断试剂有限公司)。工业乙醇、工业甲醇、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇。

2 实验方法

2.1 田基黄细胞毒性检测

以购自美国 MountSinai 医学中心的 HepG2 2.2.15 细胞株为体外筛选模型。用含 100 μg/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、380 μg/mL G418 的 10% 胎牛血清培养液在 37 ℃, 5% CO₂ 条件下进行传代培养^[9]。DMSO 溶解药物和阳性对照拉米夫定并用培养液连续稀释到相应的浓度, 加入到每孔含有 100 μL 细胞密度为 3 × 10⁴ 的 96 孔板中, 在 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d 后换相同浓度药物再培养 3 d, 取出培养上清, 每孔加入 10 μL 5 mol/mL 的 MTT 及 100 μL 培养液, 继续培养 4h, 弃去上清后加 150 mL DMSO 振荡至甲瓚蓝完全溶解, 用酶标仪检测 490 nm 波长下各孔 OD 值来计算细胞存活率判断药物对细胞的毒性。

细胞存活率(%) = (加药组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (DMSO 组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%

当细胞存活率 ≥ 95% 时, 药物对此浓度下对细胞无毒性, 为药物的安全浓度^[4]。用酶联免疫法检

测上清中 HBsAg 及 HBeAg, 酶标仪 450 nm 波长测细胞存活率 ≥ 95% 的各孔的 OD 值。

抑制率(%) = (DMSO 组 OD 值 - 加药组 OD 值) / (DMSO 组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%

2.2 田基黄的提取、分离和各部位体外抗 HBV 活性的检测

田基黄全草 15 kg, 粉碎, 60% 工业乙醇在 60 ℃ 回流提取 3 次, 每次 2 h。减压浓缩得到乙醇浸膏, 超声下用水(*m/v* = 1:10)分散, 依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取。HepG2 2.2.15 细胞检测其四部位体外抗 HBV 活性, 得知乙酸乙酯活性最好, 取乙酸乙酯萃取部位浸膏 100 g, 经正相硅胶柱层析, 以氯仿-甲醇梯度洗脱, 经薄层色谱 TLC 分析, 得到 3 个部位: YZ₁-YZ₃, 经 HepG2 2.2.15 细胞检测其活性, YZ₂ 为活性最高部位, YZ₂ 部位再反复用 Sephadex LH-20 柱层析纯化及重结晶精制得到化合物 1~4, 对四个化合物进行结构鉴定并检测其体外抗 HBV 活性。

2.3 统计学分析

所有数据均采用 SPSS19.0 软件进行分析, 数据以表示, 每个浓度设置 3 个复孔, 组间比较采用 one-way ANOVA 检验, 当方差齐性时采用 LSD 检测, 当方差不齐时采用 Tamhane 检测。

3 实验结果

3.1 田基黄醇提物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的影响

用 ELISA 方法检测田基黄醇提物、拉米夫定、苦参素对 HepG2 2.2.15 细胞 HBsAg、HBeAg 分泌的抑制率, 结果见表 1。结果表明, 田基黄醇提物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBsAg 分泌无抑制作用, 而对 HBeAg 分泌的抑制呈明显的剂量依赖关系, 最大无毒浓度时的抑制率为 69.06%, 高于苦参素对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的抑制率 37.40%, IC₅₀ 值为 14.27 μg/mL, 治疗指数(TI) > 2(见表 5), 有进一步研究价值。

HBeAg 的滴度是反映 HBV 复制强弱及传染性大小的可靠指标, HBeAg 与 HBV DNA 几乎同时出现于血液中且具有良好的相关性, 是目前临床上评价 HBV 复制较为敏感、稳定、可靠的指标。所以我们以药物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的抑制为活性成分筛选分离的指标进一步分离纯化。

表1 田基黄、拉米夫定和苦参素对 HepG2 2.2.15 细胞的 HBsAg 和 HBeAg 的分泌的抑制作用 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 1 The inhibitory effects *H. japonicum*, 3-TC and Kushenin on HBsAg and HBeAg secretion in HepG2 2.2.15 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

药物名称 Dug names	浓度 Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ₄₅₀ 抑制率 Inhibition rate(%)				细胞存活率 Cell viability (%)
		HBeAg		HBsAg		
田基黄醇提取物 <i>H. japonicum</i> methanol extract	40	0.538 ± 0.018 * *	69.06	2.443 ± 0.197	1.17	104.70 ± 0.253
	20	0.847 ± 0.123 * *	51.64	1.937 ± 0.211	0.73	111.91 ± 0.189
	10	0.917 ± 0.004 * *	47.28	1.941 ± 0.420	0.52	97.35 ± 0.218
	5	1.166 ± 0.241 * *	32.92	1.944 ± 0.006	0.34	101.20 ± 0.412
	2.5	1.421 ± 0.081 * *	18.27	1.954 ± 0.014	-0.13	95.05 ± 0.319
	1.25	1.532 ± 0.190 * *	11.89	1.959 ± 0.332	-0.43	98.07 ± 0.362
	0	1.739 ± 0.109	0	1.951 ± 0.042	0	100
拉米夫定 3-TC	80	1.330 ± 0.060	0.58	1.234 ± 0.040 * *	43.33	103.47 ± 0.114
	40	1.278 ± 0.050	4.47	1.320 ± 0.140 * *	39.30	106.43 ± 0.067
	20	1.375 ± 0.140	-2.82	1.638 ± 0.090 * *	24.65	105.18 ± 0.312
	0	1.338 ± 0.090	0	2.174 ± 0.100	0	100
苦参素 Kushenin	3000	1.352 ± 0.090 * *	37.40	0.883 ± 0.110 * *	64.99	108.3 ± 0.215
	1500	1.748 ± 0.110 * *	19.06	1.321 ± 0.330 * *	47.66	96.7 ± 0.163
	7500	1.878 ± 0.160 * *	13.04	1.888 ± 0.180 * *	25.17	101.4 ± 0.068
	0	2.159 ± 0.070	0	2.523 ± 0.070	0	100

注:田基黄、拉米夫定和苦参素用培养液连续稀释到相应浓度培养 HepG2 2.2.15 细胞 7d,用酶联免疫法检测细胞培养上清中的 HBsAg 和 HBeAg。每个浓度设置三个复孔。* $P < 0.01$, * $P < 0.05$,与空白对照组比较。

Note: HepG2 2.2.15 cells were cultured in the presence of *H. japonicum*, 3-TC and Kushenin at various concentrations for 7 days. The HBsAg and HBeAg in the supernatants were quantified using specific ELISA kits. Data were presented as mean \pm S. D. of three experiments. * $P < 0.01$, * $P < 0.05$, as compared with the blank control group.

3.2 田基黄醇提物的各萃取部位对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的影响

田基黄醇提物的氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取部位对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的抑制率见表 2。乙酸乙酯部位对 HBeAg 的抑制率最高,最高抑

制率为 63.46%, IC₅₀ 为 111.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TI > 2 (表 5); 正丁醇部位次之,最大抑制率及 IC₅₀ 分别为 52.08%, 28.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氯仿部位对 HBeAg 也有显著的抑制效果,抑制率分别为 40.27%, 故选择活性最高的乙酸乙酯部位进一步筛选分离。

表2 田基黄醇提取物各萃取部位对 HepG2 2.2.15 细胞的 HBeAg 的分泌的抑制作用 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Table 2 The inhibitory effects of different fractions from *H. japonicum* on HBeAg secretion in HepG2 2.2.15 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

萃取部位 Fractions	浓度 Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ₄₅₀	抑制率 Inhibition rate (HBeAg, %)	细胞存活率 Cell viability (%)
氯仿部位 Chloroformfraction	40	-	-	55.30 ± 0.092
	20	0.726 ± 0.213 * *	40.27	95.00 ± 0.120
	10	0.768 ± 0.085 * *	39.66	98.00 ± 0.069
	5	0.810 ± 0.087 * *	36.36	103.90 ± 0.043
	2.5	0.949 ± 0.149 * *	25.47	103.81 ± 0.055
	0	1.216 ± 0.042	0	100
乙酸乙酯部位 Ethylacetatefraction	320	0.444 ± 0.138 * *	63.46	109.60 ± 0.145
	160	0.559 ± 0.079 * *	54.03	116.5 ± 0.080
	80	0.562 ± 0.167 * *	53.78	123.60 ± 0.095
	40	0.828 ± 0.105 * *	31.88	122.30 ± 0.124

	20	0.915 ± 0.07 ^{**}	24.72	107.60 ± 0.074
	10	0.978 ± 0.095 ^{**}	19.60	123.30 ± 0.170
	0	1.216 ± 0.042	0	100
正丁醇部位 n-Butanol fraction	40	0.842 ± 0.068 ^{**}	52.08	105.80 ± 0.145
	20	0.982 ± 0.011 ^{**}	44.09	122.90 ± 0.202
	10	1.109 ± 0.051 ^{**}	36.84	106.000.220
	5	1.270 ± 0.034 ^{**}	27.67	101.90 ± 0.103
	2.5	1.429 ± 0.096 ^{**}	18.64	99.20 ± 0.299
	1.25	1.436 ± 0.078 ^{**}	18.24	98.60 ± 0.182
	0	1.948 ± 0.063	0	100

注:“-”:对细胞毒性大没有检测,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$,与空白对照组比较。

Noted:“-”:toxic to cells and not tested,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$,as compared with blank control group.

3.3 乙酸乙酯各部位对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的影响

乙酸乙酯部位经过正相硅胶柱层析得到的 YZ₁、YZ₂、YZ₃ 三部位对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg

分泌抑制率见表 3,其中 YZ₂ 对细胞 HBeAg 分泌抑制率最高,为 71.57%,IC₅₀值为 85.21 μg/mL, TI > 2 (表 5)。所以对 YZ₂ 再反复用 Sephadex LH-20 柱层析纯化。

表 3 田基黄乙酸乙酯各部位对 HepG2 2.2.15 的 HBeAg 分泌的抑制作用 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The inhibitory effects of different parts of ethyl acetate fraction from *H. japonicum* on HBeAg secretion in HepG2 2.2.15 cells ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

乙酸乙酯部位 Different parts of ethyl acetate fraction	浓度 Concentrations (μg/mL)	OD ₄₅₀	抑制率 Inhibition rate (HBeAg, %)	细胞存活率 Cell viability (%)
部位 1YZ ₁	160	-	-	60.40 ± 0.151
	80	0.776 ± 0.028 ^{**}	44.90	103.30 ± 0.208
	40	1.029 ± 0.015 ^{**}	26.90	105.50 ± 0.012
	20	1.031 ± 0.039 ^{**}	26.70	98.40 ± 0.398
	10	1.134 ± 0.065 ^{**}	19.40	121.10 ± 0.359
	0	1.407 ± 0.009	0	100
部位 2YZ ₂	160	0.380 ± 0.080 ^{**}	71.57	95.60 ± 0.148
	80	0.818 ± 0.017 ^{**}	38.85	104.80 ± 0.262
	40	0.907 ± 0.045 ^{**}	32.20	108.90 ± 0.319
	20	1.061 ± 0.058 ^{**}	20.66	111.50 ± 0.217
	10	1.077 ± 0.069 ^{**}	19.51	103.10 ± 0.570
	0	1.338 ± 0.085	0	100
部位 3YZ ₃	160	-	-	40.00 ± 0.071
	80	-	-	78.70 ± 0.197
	40	0.798 ± 0.033 ^{**}	40.40	107.20 ± 0.117
	20	0.991 ± 0.042 ^{**}	25.90	107.50 ± 0.352
	10	1.034 ± 0.018 ^{**}	22.70	97.70 ± 0.059
	0	1.338 ± 0.085	0	100

注:“-”:对细胞毒性大没有检测,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$,与空白对照组比较。

Noted:“-”:toxic to cells and not tested,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$,as compared with blank control group.

3.4 乙酸乙酯活性部位 YZ₂ 分离得到的化合物对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌的影响

YZ₂ 经反复用 Sephadex LH-20 柱层析纯化及重结晶精制得到化合物 **1**、**2**、**3**、**4**, 对四个化合物进行结构鉴定并检测其体外抗 HBV 活性, 活性结果见表

表 4 从田基黄乙酸乙酯活性部位得到的 4 个单体对 HepG2 2.2.15 细胞的 HBeAg 的分泌的抑制作用 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 4 The inhibitory effects of four compounds isolated from the ethyl acetate fraction of *H. japonicum* on HBeAg secretion in HepG2 2.2.15 cells ($n=3, \bar{x} \pm s$)

乙酸乙酯部位 Different parts of ethyl acetate fraction	浓度 Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)	OD ₄₅₀	抑制率 Inhibition rate (HBeAg, %)	细胞存活率 Cell viability(%)
化合物 1 Compound 1	40	-	-	28.10 \pm 0.131
	20	-	-	35.80 \pm 0.151
	10	1.103 \pm 0.055	-0.094	100.10 \pm 0.145
	5	1.055 \pm 0.063	-0.046	109.30 \pm 0.020
	2.5	1.027 \pm 0.046	-0.018	101.90 \pm 0.395
	0	1.009 \pm 0.034	0	100
化合物 2 Compound 2	40	0.798 \pm 0.042 * *	22.60	119.40 \pm 0.076
	20	0.857 \pm 0.070 * *	17.00	100.40 \pm 0.111
	10	0.851 \pm 0.025 * *	17.50	114.90 \pm 0.242
	5	0.852 \pm 0.065 * *	17.40	122.70 \pm 0.019
	2.5	0.971 \pm 0.074 * *	5.80	108.60 \pm 0.542
	0	1.032 \pm 0.182	0	100
化合物 3 Compound 3	80	0.803 \pm 0.249 * *	22.10	95.80 \pm 0.086
	40	0.900 \pm 0.243 * *	12.80	103.40 \pm 0.137
	20	0.974 \pm 0.257 * *	5.60	101.50 \pm 0.035
	10	1.032 \pm 0.132	-0.012	105.60 \pm 0.149
	5	1.035 \pm 0.223	-0.321	105.50 \pm 0.157
	2.5	1.033 \pm 0.246	-0.145	111.80 \pm 0.140
化合物 4 Compound 4	80	0.334 \pm 0.057 * *	67.66	101.80 \pm 0.577
	40	0.571 \pm 0.101 * *	44.65	117.30 \pm 0.081
	20	0.682 \pm 0.171 * *	33.81	103.10 \pm 0.234
	10	0.853 \pm 0.098 * *	17.31	112.50 \pm 0.341
	5	0.960 \pm 0.161 * *	6.94	105.40 \pm 0.264
	2.5	1.019 \pm 0.042 * *	1.23	99.10 \pm 0.077
0	1.032 \pm 0.182	0	100	

注:“-”:对细胞毒性大没有检测, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

Noted:“-”:toxic to cells and not tested, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, as compared with blank control group.

3.5 结构鉴定

化合物 **1** 黄色粉末(甲醇), mp. 174 ~ 180 °C, ESI-MS m/s : 447 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DM-SO-*d*₆) δ : 1.14 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, rha-Me), 5.55 (1H, $J = 1.7$ Hz, rhaH-1), 6.41 (1H, m, H-6), 6.79

4. 化合物 **1** 对对 HepG2 2.2.15 细胞 HBeAg 分泌没有抑制作用, 化合物 **2** 和 **3** 对细胞 HBeAg 分泌的抑制率较低, 而化合物 **4** 对细胞 HBeAg 分泌的抑制率最高, 为 67.66%, IC₅₀ 值为 40.25 $\mu\text{g/mL}$, TI > 2 (表 5)。

(1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.90 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, H-6'), 7.72 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 18.0 (C-6''), 69.9 (C-5''), 70.0 (C-2''), 70.2 (C-3''), 71.6 (C-4''), 94.2 (C-8), 98.4 (C-6),

98.8 (C-1''), 104.6 (C-10), 115.2 (C-6'), 115.6 (C-5'), 120.1 (C-2'), 121.8 (C-1'), 136.1 (C-3), 145.1 (C-3'), 147.5 (C-4'), 147.9 (C-2), 155.7 (C-9), 160.4 (C-7), 161.4 (C-5), 176.0 (C-4)。以上数据波谱数据与文献^[5]报道的 Vincetoxicoside B 一致,故鉴定为槲皮素-7-O 鼠李糖苷。

化合物 2 黄绿色粉末(甲醇), mp. 198 ~ 200 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 6.76 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.75 (1H, dd, *J* = 1.0, 8.1 Hz, H-6'), 6.17 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-8), 6.12 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-6), 5.45 (1H, s, Rha-1), 1.10 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Rha-Me); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 17.9 (C-6''), 68.9 (C-5''), 69.8 (C-2''), 70.2 (C-3''), 71.5 (C-4''), 75.5 (C-3), 83.1 (C-2), 95.4 (C-8), 96.5 (C-6), 98.2 (C-1''), 102.0 (C-10), 115.1 (C-5'), 115.4 (C-2'), 119.4 (C-6'), 127.8 (C-1'), 145.0 (C-3'), 145.8 (C-4'), 162.3 (C-9), 162.8 (C-5), 164.1 (C-7), 198.6 (C-4)。以上波谱数据与文献^[5]报道的(2*R*,3*R*)双氢槲皮素-3-*O*-α-*L* 鼠李糖苷一致,故鉴定为(2*R*,3*R*)双氢槲皮素-7-*O*-α-*L* 鼠李糖苷。

化合物 3 黄色粉末(甲醇), mp. 180 ~ 181 °C, ESI-MS *m/z*: 447 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.30 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, *J* =

8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-1''), 3.97 (1H, brsH-2''), 3.51 (1H, dd, *J* = 9.5, 3.2 Hz, H-3''), 3.15 (1H, t, *J* = 10 Hz, H-4''), 3.22 (1H, dp, *J* = 9.5, 6.1 Hz, H-5''), 0.88 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6''); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 17.7 (C-6''), 70.0 (C-5''), 70.3 (C-2''), 70.6 (C-3''), 71.5 (C-4''), 101.1 (C-1''), 120 (C-6'), 115.5 (C-5'), 148.4 (C-4'), 145.2 (C-3'), 115.6 (C-2'), 121.1 (C-1'), 104.1 (C-10), 157.3 (C-9), 93.6 (C-8), 164.2 (C-7), 98.7 (C-6), 161.3 (C-5), 177.8 (C-4), 134.2 (C-3), 156.4 (C-2)。以上波谱数据与文献^[6]报道的 5,7,3',4'-四羟基黄酮-3-*O*-α-*L*-鼠李糖苷(槲皮苷)一致,故鉴定为槲皮苷。

化合物 4 黄色结晶, mp. >300 °C, ESI-MS *m/z*: 260 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.36 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-7), 6.54 (1H, d, *J* = 8 Hz, H-5), 6.32 (1H, s, H-4), 6.14 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 93.6 (C-4), 97.6 (C-2), 101.5 (C-9a), 102.5 (C-5), 107.8 (C-8), 111.5 (C-8a), 143.9 (C-7), 151.2 (C-4b), 154.7 (C-6), 157.3 (C-4a), 162.5 (C-1), 164.6 (C-3), 178.8 (C-9)。其光谱数据与文献^[7]一致,推断化合物为 1,3,6,7-四羟基咕吨酮,故鉴定化合物为 1,3,6,7-四羟基咕吨酮(1,3,6,7-tetrahydroxyxynahtnoni)。

表 5 田基黄有效部位和活性单体的药效评价

Table 5 Evaluation of anti-HBV efficacy of the active site and isolated compound of *H. japonicum*

部位 Extracts	半数抑制浓度 IC ₅₀ (μg/mL)	半数有毒浓度 TC ₅₀ (μg/mL)	治疗指数 TI
田基黄醇提物 <i>H. japonicum</i> methanol extract	14.27	>40	>2
乙酸乙酯部位 Ethylacetate extract	111.07	>320	>2
部位 2 YZ ₂	85.21	>180	>2
化合物 4 DT ₄	40.25	>100	>2

IC₅₀, 半数抑制率; TC₅₀, 半数有毒浓度; TI, 治疗指数(TI = TC₅₀/IC₅₀), 当 TI > 2.0 时, 有效低毒, 才有研究意义。

IC₅₀, 50% effect concentration; TC₅₀, 50% cytotoxicity concentration; TI, the therapeutic index (TI = TC₅₀/IC₅₀), when TI > 2.0, it is effective, safe and valuable for further research.

4 讨论

研究表明咕吨酮类化合物具有抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、抗疟疾、抗病毒、酶抑制、清除自由基及抗 HIV 等多种药理活性^[8,9]。咕吨酮的取代基在 C-5, 6, 7, 8 位上对活性影响不大, 当有羟基在 C-1, 3 位上时才有活性, 若 3-甲基-2-乙基取代基同时在咕

吨酮的 C-2, 4 位上, 活性会增强^[10]。

本研究中以 HepG22. 2. 15 细胞株为体外抗 HBV 筛选模型, 追踪田基黄抗 HBV 的活性部位, 采用硅胶、Sephadex LH-20 及薄层色谱等方法从田基黄乙酸乙酯活性部位中分离得到 4 个化合物, 通过波谱解析和理化鉴别进行结构鉴定为槲皮素-7-*O*-鼠李糖苷(1)、(2*R*,3*R*)双氢槲皮素-3-*O*-α-*L* 鼠李

糖苷(2)、槲皮苷(3)、1,3,6,7-四羟基咕吨酮(4)。其中,化合物1对HepG2.2.15细胞HBeAg分泌几乎无抑制作用,化合物2和3对HepG2.2.15细胞HBeAg分泌的抑制作用较弱,而化合物4对HepG2.2.15细胞HBeAg分泌的抑制率最高,为67.66%, IC_{50} 值为40.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,治疗指数 $TI > 2$ 。这是首次发现1,3,6,7-四羟基咕吨酮具有抗HBV活性,也为抗HBV新药的研发提供了新的途径。

本文中从田基黄乙酸乙酯活性部位分离得到体外具有较高抗HBV活性的1,3,6,7-四羟基咕吨酮。关于通过化学修饰进一步增强1,3,6,7-四羟基咕吨酮的抗HBV活性有待进一步研究。

参考文献

- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:215-229.
- Park NH, Song IH, Chung YH. Chronic hepatitis B in hepatocarcinogenesis. *Postgrad Med J*, 2006, 82:507-515.
- Wei WX, Yu M, Li WN, et al. A new phloroglucinoldiglycoside derivative from *Hypericum japonicum* Thunb. *Molecules*, 2008, 13:2796-2803.
- Yin HL, Li JH, Li J, et al. Four new coumarinolignoids from seeds of *Solanum indicum*. *Fitoterapia*, 2013, 84:360-365.
- Kyoko I, Hisae F, Masae Y, et al. A flavanonolrhannodide from *Hypericum japonicum*. *Photochemistry*, 1991, 30:3152-3153.
- Sun L(孙兰), Yu JG(余竞光), Zhou LD(周立东), et al. Flavonoid glycosides of traditional Chinese medicine (TCM) *Amomum villosum*. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2002, 27:36-38.
- Yu DQ, Yang JS. Handbook of Analysis Chemistry(分析化学手册). Beijing: Chemical Industry Press, 1999, Vol 7: 839-840.
- Kaur R, Kharb R. Anti-HIV potential of medicinally important plants. *Int J Pharm Biol Sci*, 2011, 2:387-398.
- Fouotsa H, Lannang AM, Mbazona CD, et al. Xanthones inhibitors of α -Glucosidase and glycation from *Garcinia nobilis*. *Phytochem Lett*, 2012, 5:236-239.
- Zhao XY(赵晓宇), Xu Z(徐增), Lan WJ(蓝文健), et al. Advances in studies on chemical constituents of *Garcinia mangostana* and pharmacological properties of xanthones. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 8:1052-1061.
- Takahashi H, Iuchi M, Fujita Y, et al. Coumaroyl triterpenes from *Casuarina equisetifolia*. *Phytochemistry*, 1999, 51:543-550.
- Zhang B(张博), Sun JM(孙佳明), Chang RL(常仁龙), et al. Studies on the chemical constituents of the root and rhizoma of *Ligusticum jeholense*. *Zhong Yao Cai*(中药材), 2009, 32:710-712.
- Ye G, Fan MS, Huang CG. Ellagic acid glycosides from the stem bark of *Aphananthe aspera*. *Chem Nat Compd*, 2007, 43:558-559.

(上接第1349页)