

美洲大蠊愈创活性成分研究

晏永明^{1,2}, 朱宏杰¹, 向斌¹, 齐晶晶¹, 王心龙¹, 耿福能³, 程永现^{1,2*}¹中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201;²深圳大学医学部药学院, 深圳 518060; ³药用美洲大蠊四川省重点实验室, 成都 610000

摘要: 采用色谱分离手段从美洲大蠊中分离得到 17 个化合物, 利用波谱解析鉴定了它们的结构, 分别命名为环(酪氨酸-酪氨酸)(**1**)、环(酪氨酸-脯氨酸)(**2**)、环(缬氨酸-酪氨酸)(**3**)、环(甘氨酸-苯丙氨酸)(**4**)、环(甘氨酸-色氨酸)(**5**)、环(色氨酸-丝氨酸)(**6**)、环(色氨酸-天冬酰胺)(**7**)、ginsenoside(**8**)、6-羟基香豆素(**9**)、6-羟基色满-2-酮(**10**)、1-(3-乙基苯基)-1,2-乙二醇(**11**)、1-(4-乙基苯基)-1,2-乙二醇(**12**)、(*E*)-3,4-二羟基苯亚甲基丙酮(**13**)、2-羟基-3',4'-二羟基苯乙酮(**14**)、原儿茶酸(**15**)、对羟基苯甲酸甲酯(**16**)和丁香酸(**17**)。其中, 化合物**1~14**均为首次从美洲大蠊中分离得到。此外, 对化合物促进创面愈合作用进行了观察, 化合物**13**显示较强的抑制 NO 生成活性。

关键词: 药用昆虫; 美洲大蠊; 创面愈合

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.010

Chemical Constituents from *Periplaneta americana* and Their Effects on Wound Healing

YAN Yong-ming^{1,2}, ZHU Hong-jie¹, XIANG Bin¹, QI Jing-jing¹,
WANG Xin-long¹, GENG Fu-neng³, CHENG Yong-xian^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²School of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China; ³Sichuan Key Laboratory of Medical American cockroach, Chengdu 610000, China

Abstract: Seventeen compounds were isolated from *Periplaneta americana*. Their structures were identified as cyclo(*L*-Tyr-*L*-Tyr) (**1**), cyclo(*L*-Tyr-*L*-Pro) (**2**), cyclo(*L*-Val-*L*-Tyr) (**3**), cyclo(*Gly*-*L*-Phe) (**4**), cyclo(*Gly*-*L*-Trp) (**5**), cyclo(*L*-Trp-*L*-Ser) (**6**), cyclo(*L*-Trp-*L*-Asn) (**7**), ginsenoside (**8**), 6-hydroxycoumarin (**9**), 6-hydroxy-3,4-dihydrochromen-2-one (**10**), 1-(3-ethylphenyl)-1,2-ethanediol (**11**), 1-(4-ethylphenyl)-1,2-ethanediol (**12**), (*E*)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-en-2-one (**13**), 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-oxoethyl acetate (**14**), protocatechuic acid (**15**), methylparaben (**16**), and syringic acid (**17**), respectively, by spectroscopic methods. Compounds **1-14** were isolated from the title insect species for the first time. In addition, biological evaluation towards wound-healing activities was conducted. Compound **13** showed a strong activity of inhibiting NO production.

Key words: medicinal insect; *Periplaneta americana*; wound healing; cyclic dipeptides

美洲大蠊 (*Periplaneta americana*), 中医称之为“蜚蠊”, 是几百种已知蟑螂品种中唯一被记载可作为药用的品种, 《本草纲目》记载其可治疗瘀血、症坚、寒热、下气、利血脉。由于美洲大蠊的独特疗效, 后被制成康复新液, 目前被国内多家企业生产销售,

但面临的共同问题是药效物质不清楚, 质量控制困难, 临床和市场推广缺乏学术支撑。过去, 美洲大蠊的物质基础研究报道有限^[1-3], 因此, 我们从创面愈合相关活性出发, 继续深入地对美洲大蠊化学成分进行研究过程中, 再次从中分离并鉴定了 17 个化合物, 其中化合物**1~14**是首次被分离得到。继而对部分化合物采用抗 NO 生成抑制试验、促 HDFs 细胞增殖活性测试、促 HUVECs 血管生成和 HUVECs 迁移试验进行了促创面愈合功能研究。

收稿日期: 2017-08-09 接受日期: 2018-01-08

基金项目: 国家自然科学基金 (81773606); 深圳市科技计划 (JCY20170412110504956); 国家杰出青年科学基金 (81525026)

* 通信作者 Tel: 86-871-65223048; E-mail: yxcheng@mail.kib.ac.cn

1 仪器与材料

薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工厂); MCI gel CHP 20P (75 ~ 150 μm, 日本三菱公司产品); Sephadex LH-20 (25 ~ 100 μm, Pharmacia 公司); RP-18 (40 ~ 63 μm, 日本 Daiso); 北京创新通恒 LC3000 型 HPLC 和 Agilent 1200 型 HPLC, 半制备色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 9.4 mm i. d., 5 μm) 和 YMC-Pack-ODS-A (250 mm × 10 mm, i. d., 5 μm)。Bruker Avance III 400 MHz、500 MHz 和 Bruker Avance 600 MHz 核磁共振仪 (TMS 为内标, δ 为 ppm, J 为 Hz); Xevo TQ-S 超高压液相色谱三重四级杆串联质谱联用仪。

美洲大蠊提取物于 2015 年 9 月由四川好医生攀西药业有限责任公司提供, 美洲大蠊系该公司养殖。

2 实验方法

2.1 提取与分离

取美洲大蠊干燥虫体 25 kg, 粉碎后用热水回流提取 (3 × 2 h), 提取液减压回收溶剂得总提物 (约 2 kg)。总提物经 MCI gel CHP 20P 柱 (甲醇-水, 0% ~ 100%) 梯度洗脱得 11 个组分 (F1 ~ F11)。F9 (40 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶 (甲醇) 得 4 个组分 (F9.1 ~ F9.4)。F9.2 (14 g) 经 MCI gel CHP 20P 色谱柱 (甲醇-水, 10% ~ 100%) 梯度洗脱得 6 个组分 (F9.2.1 ~ F9.2.6)。F9.2.2 (3.5 g) 经 RP-18 柱 (甲醇-水, 0% ~ 50%) 得 5 个组分 (F9.2.2.1 ~ F9.2.2.5)。F9.2.2.2 (500 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶 (甲醇) 后再经半制备 HPLC (甲醇-水, 15%) 得化合物 **6** (2.0 mg, $t_R = 13.5$ min)、**7** (3.0 mg, $t_R = 16.5$ min) 和 **8** (1.5 mg, $t_R = 28.0$ min)。F9.2.2.3 (800 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶 (甲醇) 后再经半制备 HPLC (甲醇-水, 10%) 得化合物 **1** (3.0 mg, $t_R = 13.5$ min)、**2** (1.5 mg, $t_R = 16.5$ min) 和 **3** (4.8 mg, $t_R = 28.0$ min)。F9.2.2.4 (200 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 20%) 得化合物 **4** (2.6 mg, $t_R = 15.5$ min) 和 **5** (2.8 mg, $t_R = 18.0$ min)。F9.3 (5 g) 经 MCI gel CHP 20P 色谱柱 (甲醇-水, 10% ~ 100%) 梯度洗脱得 7 个组分 (F9.3.1 ~ F9.3.7)。F9.3.3 (1.5 g) 经 RP-18 柱 (甲醇-水, 10% ~ 50%) 得 5 个组分 (F9.3.3.1 ~ F9.3.3.5)。F9.3.3.3 (100 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 20%) 得化合物 **11** (11.0 mg, $t_R =$

13.5 min) 和 **12** (4.5 mg, $t_R = 15.5$ min)。F9.3.3.5 (80 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 30%) 得化合物 **9** (2.2 mg, $t_R = 13.8$ min) 和 **10** (3.6 mg, $t_R = 18.8$ min)。F9.3.4 (500 mg) 经 RP-18 柱 (甲醇-水, 15% ~ 50%) 得 5 个组分 (F9.3.4.1 ~ F9.3.4.5)。F9.3.4.2 (200 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 15%) 得化合物 **15** (14.0 mg, $t_R = 7.5$ min)、**16** (8.5 mg, $t_R = 25.3$ min) 和 **17** (2.8 mg, $t_R = 12.5$ min)。F9.3.4.4 (40 mg) 经半制备 HPLC (甲醇-水, 25%) 得化合物 **13** (10.0 mg, $t_R = 10.5$ min) 和 **14** (3.5 mg, $t_R = 18.1$ min)。

2.2 抗一氧化氮 (NO) 生成活性测试

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海细胞库, DMEM 培养基和胎牛血清购自 BI 公司。Griess Reagent、LPS (lipopolysaccharide) 及对照药物 L-NMMA (NG-monomethyl-L-arginine, monoacetate salt) 购自 Sigma 公司。具体实验方法按照以前文献报道进行^[4]。

2.3 促 HDFs 细胞增殖活性测试

人皮肤成纤维细胞 (HDFs) 购自美国模式菌种收集中心 (ATCC)。DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。将对数期 HDFs 细胞调整细胞悬液浓度约为 3×10^4 /mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的化合物溶液培养 100 μL, 空白对照组加入等量的新鲜培养基。各组设置 3 个平行孔, 置于培养箱中孵育 48 h 后, 每孔加入 20 μL 的 5 mg/mL MTT 溶液, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 4 h, 终止培养, 除去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 15 min, 待蓝紫色结晶充分溶解, 在酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度值, 每组取平均值, 重复三次实验^[5]。

细胞增殖率 (%) = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值 / 空白对照组 OD 值) × 100%

2.4 HUVECs 迁移实验

人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 来自深圳大学医学部, 由刘宝华教授研究组馈赠。M199 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。收集对数期 HUVECs 细胞, 接种于 24 孔培养板中, 每孔 14×10^4 个细胞。置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 待细胞贴壁后, 用 1 × PBS 清洗 3 次, 然后用含 0.5% FBS 的 M199 培养基饥饿 6 h。饥饿结束后, 用 P10 枪头进行划痕, 实验组加入溶有不同药物的 M199 培养基,

空白组加入新鲜的 M199 培养基,并进行拍照。在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 6 h 后,用 1 × PBS 清洗 3 次,加入新鲜的 M199 培养基,并进行拍照。划痕面积计算用 Image pro plus6 进行^[6]。

迁移面积% = (实验组 0 h 划痕面积 - 实验组 6 h 划痕面积 / 空白对照组 0 h 划痕面积 - 空白组 6 h 划痕面积) × 100%

2.5 促 HUVECs 血管生成活性测试

人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 来自深圳大学医学部,由刘宝华教授研究组馈赠;M199 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司;Matrigel 胶购自 Corning 公司。将 Matrigel 胶均匀铺于预冷的 96 孔板中,每孔 50 μL,37°C 孵育 40 min,待 Matrigel 胶凝固后,每孔加入 1 × 10⁴ HUVECs 细胞,实验组加入待测化合物 (终浓度 20 μM) 处理,对照组不含药物。具体实验方法按照以前文献报道进行^[4,7]。

3 结构鉴定

化合物 1 白色固体,ESI-MS m/z : 349 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 9.25 (2H, s, NH), 7.78 (2H, s, OH), 6.84 (4H, d, $J = 8.2$ Hz, H-9, H-9', H-13, H-13'), 6.68 (4H, d, $J = 8.2$ Hz, H-10, H-10', H-12, H-12'), 3.86 (2H, t-like, $J = 6.5$ Hz, H-3, H-6), 2.57 (2H, overlap, Ha-7, Ha-7'), 2.11 (2H, dd, $J = 13.7, 6.5$ Hz, Hb-7, Hb-7')。以上数据与文献[8]对照基本一致,故确定化合物 1 为环(酪氨酸-酪氨酸)。

化合物 2 白色固体,ESI-MS m/z : 283 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 7.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12, H-16), 6.76 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-13, H-15), 4.20 (1H, dd, $J = 11.5, 3.5$ Hz, H-3), 4.00 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-6), 3.62 (1H, m, Ha-9), 3.54 (1H, m, Hb-9), 2.78 (1H, dd, $J = 18.5, 12.0$ Hz, Ha-10), 2.29 (1H, m, Ha-7), 2.13 (1H, dd, $J = 18.5, 5.0$ Hz, Hb-10), 1.96 (1H, m, Hb-7), 1.85 (2H, m, H-8); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 169.7 (C-2), 165.3 (C-5), 155.9 (C-14), 129.9 (C-12, C-16), 126.7 (C-11), 116.1 (C-13, C-15), 58.9 (C-6), 56.3 (C-3), 45.4 (C-9), 35.9 (C-10), 28.3 (C-7), 22.4 (C-8)。以上数据和文献[9]对照基本一致,故确定化合物 2 为环(酪氨酸-脯氨酸)。

化合物 3 白色固体,ESI-MS m/z : 285 [M +

Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ_H: 7.02 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-12, H-16), 6.70 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-13, H-15), 4.23 (1H, t-like, $J = 4.6$ Hz, H-6), 3.63 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-3), 3.13 (1H, dd, $J = 13.9, 5.1$ Hz, Ha-10), 2.93 (1H, dd, $J = 13.9, 4.4$ Hz, Hb-10), 1.64 (1H, m, H-7), 0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-8), 0.49 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-9)。以上数据与文献[9]对照基本一致,故确定化合物 3 为环(缬氨酸-酪氨酸)。

化合物 4 黄色固体,ESI-MS m/z : 227 [M + Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 8.18 (1H, brs, NH), 7.91 (1H, brs, NH), 7.29 (3H, overlap, H-10, H-11, H-12), 7.17 (2H, brd, $J = 8.0$ Hz, H-9, H-13), 4.07 (1H, m, H-3), 3.36 (1H, dd, $J = 17.3, 2.6$ Hz, H-6a), 3.10 (1H, dd, $J = 13.9, 5.1$ Hz, Ha-7), 2.89 (1H, dd, $J = 13.5, 4.7$ Hz, Hb-7), 2.76 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, Hb-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 167.2 (C-2), 165.7 (C-5), 136.0 (C-8), 130.1 (C-9, C-13), 128.2 (C-10, C-12), 126.8 (C-11), 55.5 (C-3), 43.7 (C-6)。以上数据与文献[10]对照基本一致,故确定化合物 4 为环(甘氨酸-苯丙氨酸)。

化合物 5 淡黄色固体,ESI-MS m/z : 266 [M + Na]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 10.93 (1H, brs, 8-NH), 8.10 (1H, brs, NH), 7.76 (1H, brs, NH), 7.55 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-11), 7.33 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-14), 7.05 (1H, s, H-9), 7.04 (1H, t-like, $J = 7.5$ Hz, H-13), 6.96 (1H, t-like, $J = 7.5$ Hz, H-12), 4.02 (1H, m, H-3), 3.22 (2H, overlap, Ha-6, Ha-7), 3.03 (1H, dd, $J = 14.5, 4.7$ Hz, Hb-7), 2.79 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, Hb-6); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 168.0 (C-2), 165.7 (C-5), 136.0 (C-14a), 127.5 (C-10a), 124.6 (C-9), 120.9 (C-13), 118.7 (C-11), 118.5 (C-12), 111.2 (C-14), 108.4 (C-10), 55.5 (C-3), 43.9 (C-6), 29.2 (C-7)。以上数据和文献[11]对照基本一致,故确定化合物 5 为环(甘氨酸-色氨酸)。

化合物 6 淡黄色固体,ESI-MS m/z : 296 [M + Na]⁺; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 10.89 (1H, brs, 9-NH), 7.90 (1H, brs, NH), 7.89 (1H, brs, NH), 7.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-12), 7.33 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-15), 7.12 (1H, s, H-10), 7.05 (1H, t-like, $J = 7.5$ Hz, H-14), 6.96 (1H, t-

like, $J = 7.5$ Hz, H-13), 4.01 (1H, m, H-3), 3.68 (1H, m, H-6), 3.30 (2H, overlap, H-8), 3.20 (1H, m, Ha-7), 3.04 (1H, dd, $J = 11.0, 5.2$ Hz, Hb-7); 13 C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 167.3 (C-2), 165.8 (C-5), 136.0 (C-15a), 127.7 (C-11a), 124.6 (C-10), 120.8 (C-14), 118.6 (C-12), 118.3 (C-13), 111.2 (C-15), 109.1 (C-11), 63.0 (C-7), 55.5 (C-3), 57.3 (C-6), 30.4 (C-8)。以上数据和文献[11]对照基本一致,故确定化合物**6**为环(色氨酸-丝氨酸)。

化合物 7 淡黄色固体, ESI-MS m/z : 323 [M + Na] $^+$; 1 H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 10.90 (1H, brs, 10-NH), 7.94 (1H, brs, NH), 7.66 (1H, brs, NH), 7.54 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 7.34 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-16), 7.12 (1H, s, H-11), 7.06 (1H, t-like, $J = 7.5$ Hz, H-15), 6.96 (1H, t-like, $J = 7.5$ Hz, H-14), 6.91 (1H, brs, 8a-NH), 6.89 (1H, brs, 8b-NH), 4.13 (1H, m, H-3), 4.00 (1H, m, H-6), 3.21 (1H, dd, $J = 14.6, 5.4$ Hz, Hb-9), 3.11 (1H, dd, $J = 14.6, 4.9$ Hz, Hb-9), 2.17 (1H, dd, $J = 15.7, 4.3$ Hz, Hb-7), 1.48 (1H, dd, $J = 15.7, 8.3$ Hz, Hb-7); 13 C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ_C : 171.5 (C-8), 167.3 (C-2), 166.9 (C-5), 135.9 (C-16a), 127.7 (C-12a), 124.5 (C-11), 120.9 (C-15), 118.8 (C-13), 118.4 (C-14), 111.3 (C-16), 108.9 (C-12), 55.2 (C-3), 51.3 (C-6), 38.2 (C-7), 28.7 (C-9)。以上数据和文献[11]对照基本一致,故确定化合物**7**为环(色氨酸-天冬酰胺)。

化合物 8 白色固体, ESI-MS m/z : 253 [M + Na] $^+$; 1 H NMR (600 MHz, methanol- d_4) δ_H : 7.50 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-10), 7.36 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-13), 7.16 (1H, t-like, $J = 7.4$ Hz, H-12), 7.07 (1H, t-like, $J = 7.4$ Hz, H-11), 4.73 (1H, q, $J = 6.8$ Hz, H-3), 3.98 (1H, dd, $J = 12.1, 5.1$ Hz, H-6), 3.47 (1H, dd, $J = 16.1, 4.0$ Hz, Ha-7), 3.05 (1H, ddd, $J = 16.1, 12.2, 2.4$ Hz, Hb-7), 1.77 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-15); 13 C NMR (150 MHz, methanol- d_4) δ_C : 174.1 (C-5), 138.5 (C-14), 131.6 (C-2), 127.5 (C-9), 123.2 (C-12), 120.5 (C-11), 119.1 (C-10), 112.3 (C-13), 107.8 (C-8), 59.7 (C-6), 51.1 (C-3), 24.4 (C-7), 17.3 (C-15)。以上数据和文献[12]对照基本一致,故确定化合物**8**为 ginsenoside。

化合物 9 白色固体, ESI-MS: m/z 161 [M-

H] $^-$; 1 H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ_H : 7.77 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4), 7.16 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-8), 7.00 (1H, dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-7), 6.97 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-5), 6.43 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-3)。以上数据与文献[13]对照基本一致,故确定化合物**9**为6-羟基香豆素。

化合物 10 淡黄色固体, ESI-MS: m/z 163 [M-H] $^-$; 1 H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ_H : 6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 6.63 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 6.59 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-7), 2.86 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 2.51 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3); 13 C NMR (100 MHz, methanol- d_4) δ_C : 172.2 (C-2), 153.1 (C-6), 129.8 (C-10), 125.2 (C-9), 116.1 (C-8), 114.3 (C-5), 113.4 (C-7), 30.1 (C-3), 25.0 (C-4)。以上数据和文献[14]对照基本一致,故确定化合物**10**为6-羟基色满-2-酮。

化合物 11 淡黄色固体, ESI-MS: m/z 165 [M-H] $^-$; 1 H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ_H : 7.22 (1H, brt, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.21 (1H, brs, H-2), 7.16 (1H, brd, $J = 7.7$ Hz, H-6), 7.08 (1H, brd, $J = 7.7$ Hz, H-4), 4.67 (1H, dd, $J = 7.1, 4.9$ Hz, H-7), 3.60 (2H, m, H-8), 2.62 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.21 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10)。以上数据和文献[15]对照基本一致,故确定化合物**11**为1-(3-乙基苯基)-1,2-乙二醇。

化合物 12 淡黄色粉末, ESI-MS: m/z 165 [M-H] $^-$; 1 H NMR (400 MHz, methanol- d_4) δ_H : 7.28 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2, H-6), 7.17 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3, H-5), 4.67 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, H-7), 3.61 (2H, d, $J = 6.1$ Hz, H-8), 2.62 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-9), 1.20 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-10)。以上数据和文献[16]对照基本一致,故确定化合物**12**为1-(4-乙基苯基)-1,2-乙二醇。

化合物 13 淡黄色固体, ESI-MS m/z : 177 [M-H] $^-$; 1 H NMR (600 MHz, methanol- d_4) δ_H : 7.51 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7), 7.08 (1H, brs, H-2), 6.99 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-5), 6.54 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8), 2.33 (3H, s, H-10); 13 C NMR (150 MHz, methanol- d_4) δ_C : 201.6 (C-9), 150.0 (C-4), 146.9 (C-3), 146.9 (C-7), 127.7 (C-1), 124.7 (C-8), 123.6 (C-6), 116.5 (C-2), 115.3 (C-5), 27.0 (C-10)。以上数据和文献[17]对照基本一致,故确定化合物**13**为(*E*)-3,

4-二羟基苯亚甲基丙酮。

化合物 14 淡黄色固体,ESI-MS m/z :209 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ_{H} : 7.40 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz, H-6), 7.38 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 6.84 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 5.32 (2H, s, H-8), 2.16 (3H, s, H-OAc)。以上数据和文献[18]对照基本一致,故确定化合物 **14** 为 2-羟基-3',4'-二羟基苯乙酮。

化合物 15 淡黄色固体,ESI-MS: m/z 153 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ_{H} : 7.45 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2), 7.43 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz, H-6), 6.81 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5); ¹³C NMR (150 MHz, methanol-*d*₄) δ_{C} : 121.7 (C-1), 122.5 (C-2), 144.7 (C-3), 150.1 (C-4), 114.3 (C-5), 116.3 (C-6), 168.8 (C-7)。以上数据和文献[19]对照基本一致,故确定化合物 **15** 为原儿茶酸。

化合物 16 淡黄色固体,ESI-MS: m/z 151 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ_{H} : 7.09 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-2, H-6), 6.72 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-3, H-5), 3.47 (3H, s, OCH₃)。以上数据和文献[20]对照基本一致,故确定化合物 **16** 为对羟基苯甲酸甲酯。

化合物 17 棕色固体,ESI-MS: m/z 197 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄) δ_{H} : 7.33 (2H, s, H-2, H-6), 3.88 (6H, s, OCH₃)。以上数据和文献[20]对照基本一致,故确定化合物 **17** 为丁香酸。

4 活性结果

我们对除了化合物 **2** 和 **6** 外其他化合物进行了创伤修复相关活性研究,主要为抗 NO 生成抑制试验、促 HDFs 细胞增殖活性测试、促 HUVECs 迁移实验和 HUVECs 血管生成活性测试。

化合物抗 NO 生成抑制试验结果见表 1。由表 1 可知筛选的化合物中化合物 **13** 显示很强的抑制 NO 生成活性,在 25 μM 时,其抑制率达到了 84.39 \pm 4.99%,化合物 **14** 也具有抑制 NO 生成活性,抑制率为 24.20 \pm 0.53%。

同时对化合物进行了促 HDFs 细胞增殖活性测试(图 1)、促 HUVECs 迁移实验的研究(图 2)和 HUVECs 血管生成活性测试(图 3)。结果显示,化合物 **13** 显示强的促 HDFs 细胞增殖活性,化合物 **3**、**10** 和 **14** 表现出可促进 HUVECs 细胞迁移的活性,而化合物 **3** 则对 HUVECs 血管生成显示活性。

表 1 化合物抗 NO 生成抑制试验 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Biological evaluation towards nitric oxide (NO) production of the compounds ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

化合物编号 Number	浓度 Concentration (μM)	NO 生成抑制率 No Production inhibition rate (%)
1	25	5.63 \pm 0.89
3	25	1.86 \pm 2.86
4	25	3.40 \pm 0.65
5	25	6.62 \pm 2.67
7	25	2.82 \pm 0.84
8	25	6.93 \pm 1.42
9	25	5.60 \pm 0.56
10	25	2.07 \pm 1.07
11	25	6.56 \pm 1.38
12	25	17.08 \pm 4.30
13	25	84.39 \pm 4.99
14	25	24.20 \pm 0.53
15	25	-6.62 \pm 1.81
16	25	-3.66 \pm 2.13
17	25	7.87 \pm 0.49
L-NMMA	50	53.41 \pm 1.11

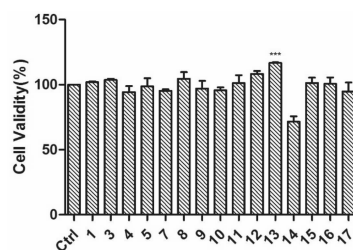


图 1 化合物促进 HDFs 细胞增殖活性 ($n = 3$)

Fig. 1 Cell proliferation activity of compounds in HDFs cells ($n = 3$)

Note: One-way ANOVA, *** $P < 0.001$

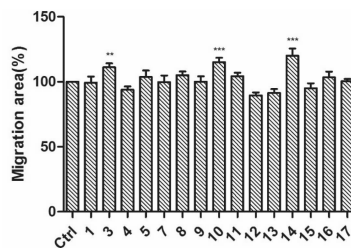


图 2 化合物促 HUVECs 细胞迁移活性 ($n = 3$)

Fig. 2 Cell migration activity of compounds in HDFs cells ($n = 3$)

Note: One-way ANOVA, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

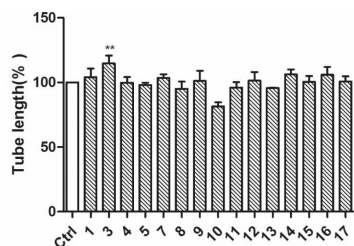


图3 化合物促 HUVECs 血管生成活性 (n=3)

Fig. 3 Angiogenesis activity of compounds in HDFs cells (n=3)

Note: One-way ANOVA, ** P < 0.05

5 结论与讨论

康复新液的唯一组成药味是美洲大蠊,其在临床上被使用广泛,但是美洲大蠊的物质基础研究一直很薄弱。本次研究我们共从中分离鉴定了17个化合物,其中化合物1~14为首次从美洲大蠊中分离得到,其进一步丰富了美洲大蠊的化学成分。对分离得到的大部分化合物进行了与创面修复相关的活性研究,部分化合物显示出强的活性,如化合物13显示很强的抑制NO生成活性,同时,该化合物也显示出较强的促HDFs细胞增殖活性,该研究有助于人们认识美洲大蠊愈创的物质基础。

参考文献

- Li Y (李咏), Wang F (王芳), Zhang PZ (张普照), et al. Chemical constituents from *Periplaneta americana* [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2015, 38: 2038-2041.
- Hu YF (胡艳芬), Lv XM (吕小满), Wang YM (王玉梅), et al. Research advance in medicinal value of *Periplaneta americana* [J]. *Med Recapitulate* (医学综述), 2008, 14: 2822-2824.
- He ZC (何正春), Peng F (彭芳), Song LY (宋丽艳), et al. Review on investigations related to chemical constituents and biological activities of *Periplaneta americana* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 2326-2331.
- Wang XL (王心龙), Xiang B (向斌), Li YM (李亚美), et al. Water soluble compounds from *Periplaneta americana* and their angiogenesis activity [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1335.Q.20170619.1329.006.html>.
- Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 110: 69-78.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 329-333.

- Arnaoutova I, Kleinman HK. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5: 628-35.
- Huang ZJ, Yang RY, Guo ZY, et al. A new naphtho- γ -pyrone from mangrove endophytic fungus ZSU-H26 [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46: 15-18.
- Timo S, Thomas H. Structures, Sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 7222-7231.
- Xu W (徐伟), Ding ZG (丁章贵), Li MG (李铭刚), et al. Study on secondary metabolites of *Nocardiopsis* sp. YIM 90087 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 1198-1201.
- Meng XP (孟旭鹏), Tian L (田黎), Lin WH (林文翰), et al. Studies on the chemical constituents of the fermentation liquid from marine bacteria *Roseobacter* sp. [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物杂志), 2009, 28: 6-10.
- Han MH, Yang XW, Jin YP. Novel triterpenoid acyl esters and alkaloids from *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Phytochem Anal*, 2008, 19: 438-443.
- Yang SZ (杨素珍), Jiang JQ (蒋建勤). Chemical constituents from rhizomes of *Paeonia sinjiangensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2014, 45: 760-764.
- Aguirrepranzoni C, Orden AA, Bisogno FR, et al. Coumarin metabolic routes in *Aspergillus* spp. [J]. *Fungal Biol*, 2011, 115: 245-252.
- Qiu YK (邱鹰昆), Dou DQ (窦德强), Xu BX (徐碧霞), et al. Studies on the constituents from the stems of *Opuntia dillenii* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2006, 23: 274-276, 279.
- Nurettin Y. Isolation and characterization of dibenzoated aromatic compounds [J]. *Turkish J Chem*, 1993, 17: 208-214.
- Wang YP, Xue XY, Xiao YS, et al. Purification and preparation of compounds from an extract of *Scutellaria barbata* D. Don using preparative parallel high performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31: 1669-1676.
- Andersen, SO; Roepstorff, P. Phenolic compounds released by mild acid hydrolysis from sclerotized cuticle: purification, structure, and possible origin from cross-links [J]. *Insect Biochem*, 1978, 8: 99-104.
- Shu YZ (舒永志), Cheng L (成亮), Cho JC (曹潜喆), et al. Chemical constituents in roots and vine stems of *Kadsura coccinea* [J]. *Chin Trad Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 428-431.
- Chang YC, Chang FR, Wu YC, et al. The constituents of *Lindera glauca* [J]. *J Chin Chem Soc*, 2000, 47: 373-380.