

益母草抗结核分枝杆菌成分的跟踪分离

韩立芬,宋善敏,甘梦兰,王仁凤,杨再昌*

贵州大学药学院,贵阳 550025

摘要:结核病分为肺结核和肺外结核,其中子宫结核属于肺外结核,是造成不孕的主要原因。益母草是我国传统中药,常用于妇科疾病的治疗。在筛选中发现,益母草乙醇提取物具有抗结核分枝杆菌活性,经活性跟踪分离,从益母草乙酸乙酯萃取部位中分离得到具有抑制结核分枝杆菌的单体化合物1,鉴定为益母草碱,抗结核杆菌的MIC值为80 μg/mL。这一发现为治疗子宫结核提供了新的线索。

关键词:益母草;益母草碱;结核分枝杆菌;活性成分

中图分类号:R284.1;R93

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.018

Isolation and Identification of Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Components from *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F

HAN Li-fen, SONG Shan-min, GAN Meng-lan, WANG Ren-feng, YANG Zai-chang*

Pharmacy College of Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Tuberculosis is classified as pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis. The endometrial tuberculosis belongs to extrapulmonary tuberculosis, which is the main cause of infertility. *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F is a traditional Chinese medicine, commonly used in the treatment of gynecologic diseases. In screening, it was found that the ethanol extract of *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F had anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. Based on bioassay-guided isolation, compound 1 with the activity of inhibiting *Mycobacterium tuberculosis* was separated from the ethyl acetate extracts of *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F. It was identified as leonurine, and with MIC value of 80 μg/mL for against tubercle bacillus. This discovery might provide a new clue for the treatment of uterine tuberculosis.

Key words: *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F; leonurine; *mycobacterium tuberculosis*; active component

结核(tuberculosis, TB)是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的可侵犯全身各器官的一种慢性传染病。结核分为肺结核和肺外结核,其中女性盆腔结核近年来有增长的趋势^[1,2]。女性盆腔结核是指女性盆腔包括盆腔生殖器官(卵巢、输卵管、子宫)及盆腔腹膜与子宫周围的结缔组织的炎症。患者可出现消瘦、疲劳、发烧、出汗、乏力等症状,常伴随盆腔痛、月经异常、痛经、闭经、月经量少等症状,是导致女性不孕的重要原因^[3-6]。目前,主要使用抗痨药物对女性盆腔结核实施治疗,一线抗结核药物缺乏子宫靶向性,必须长期服药,由于这类药物肝毒性明显,患者往往不能坚持服药,导致治疗失败。因此,研发子宫靶向性的抗结核新药对

盆腔结核的治疗具有重要意义。

益母草是唇形科益母草属植物益母草(*Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F)的新鲜或者干燥地上部分。古代文献将益母草的功效归属于治疗妇产科疾病,比如:《本草衍义补遗》说“益母草治产前产后诸疾”、《本草纲目》说“益母草治妇人胎产诸病”、《本草蒙筌》说“益母草总调胎产诸证”、《本草求真》说“益母草消水行血,去瘀生新,调经解毒,为胎前胎后要剂”。在现代医学实践中,益母草被制成“益母草膏”、“益母草颗粒”、“益母草注射液”等剂型,用于治疗痛经、闭经、子宫阴道出血,具有促进产后子宫复旧及清理产后子宫残留物等功效^[7-14]。可见,益母草对子宫及其附件的多种病理过程具有明显的干预作用,那么,益母草是否具有子宫靶向性、是否具有抗子宫结核的作用?迄今少见相关的文献报道。

为发现具有子宫靶向性的抗结核药物,我们对

收稿日期:2017-12-01 接受日期:2018-03-13

基金项目:国家自然科学基金(81460531,81760629,81160390);黔科合人才团队[2015]4026号

*通信作者 Tel:86-85186848659;E-mail:yangzaichangzm@163.com

20 多种具有治疗女性盆腔类疾病的中草药进行了抗结核杆菌体外试验,部分品种显示出抗结核杆菌活性,其中益母草乙醇提取物在改良罗氏培养基中能抑制结核分枝杆菌生长。对益母草进行抗结核分枝杆菌活性跟踪分离,得到活性单体 YMC04,报道如下。

1 材料与方法

1.1 药材

益母草(2700 g)购自贵阳市和平药房,为除根外的细叶益母草全株。

1.2 仪器与试剂

核磁共振数据用 INOVA400 MHz 型超导核磁共振仪测定,TMS 作内标;质谱数据用 HP-5973 型质谱仪测定;柱色谱用硅胶(200~300 目)、硅胶 H 和薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ 均为青岛海洋化工产品;改良罗氏培养基基础(上海博微生物科技有限公司),7H9 肉汤(Difco),其余试剂均为国产分析纯。

1.3 益母草的提取与活性跟踪分离

1.3.1 益母草的提取与分段

益母草样品 2700 g 用 80% 的乙醇加热回流提取三次,每次一小时,合并提取液,过滤,置于 70℃ 水浴蒸干,得乙醇提取物浸膏 140 g。浸膏用 10% 乙醇水溶液溶解,再依次用石油醚、乙酸乙酯和二氯甲烷萃取,得到石油醚部位(45 g)、乙酸乙酯部位(40 g)、二氯甲烷部位(8 g)、剩余物(49 g),不同萃取部位用改良罗氏培养基绝对浓度法进行活性跟踪,发现乙酸乙酯、二氯甲烷萃取部位能抑制结核杆菌,乙酸乙酯萃取部位活性更强,因此将乙酸乙酯萃取部位视为有效部位。

1.3.2 益母草乙酸乙酯萃取部位的活性跟踪与分离

乙酸乙酯萃取部位用硅胶柱色谱(200~300 目)分离,干法装柱,洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯(4:1~3:2)进行梯度洗脱,最后甲醇冲柱,经 TLC 检测,合并相似成分,得到六个组分(Fr. A、Fr. B、Fr. C、Fr. D、Fr. E、Fr. F)(图 1)。利用改良罗氏培养基进行活性跟踪,发现有效组分为 Fr. C(22-33)。



图 1 益母草乙酸乙酯萃取部位的分离

Fig. 1 Separation of ethyl acetate extract from *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F

1.3.3 Fr. C 的活性跟踪与分离

Fr. C 进行硅胶柱色谱(200~300 目)分离,用二氯甲烷:甲醇(20:1~15:1)作洗脱剂进行梯度洗脱,得到四个组分(Fr. 1、Fr. 2、Fr. 3、Fr. 4)(图 2)。

利用改良罗氏培养基进行活性跟踪,有效组分为 Fr. 2。Fr. 2 经硅胶柱色谱多次纯化,得到单体 YMC04(化合物 1,400 mg)。

1.4 抗结核分枝杆菌测试绝对浓度法

改良罗氏培养基 40.84 g,加入 12 mL 的甘油,

加蒸馏水 600 mL 煮沸 5~10 min,115℃ 灭菌 20 min,待冷至 55℃ 左右时以无菌操作加入 1000 mL 无菌搅匀的全蛋液,混匀,分装在 15 mm × 150 mm 的试管,每管 5 mL^[15]。称取样本,用二甲基亚枫(DMSO)溶解,分别加入到含有改良罗氏培养基试管中,根据预实验确定浓度,每个浓度做 3 管,平行做 2 次,阳性对照为异烟肼(2 μg/mL),阴性对照为含 5% DMSO 的无药培养基,放置成斜面,80℃ 下加热灭菌 1 h,隔夜后相同条件下加热灭菌 1 h,冷却

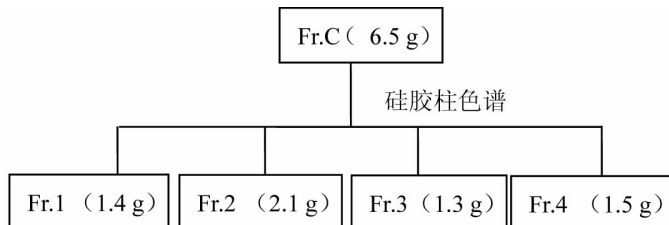


图 2 Fr. C 的分离

Fig. 2 Separation of Fr. C

后接种 H37Rv 菌悬液(10^8 CFU/mL) 20 μ L,使菌液由上往下分布在培养基斜面上,置 37 $^{\circ}$ C 的电热恒温培养箱中培养 20 天。在培养期间,每天观察记录一次。结果判断:菌落数低于 5 个(含 5 个)视为有效,其中菌落 0~1 个记“+++”,2~4 个记“++”,5 个记“+”,菌落数在 6 个以上(含 6 个)视为无效,记“-”。

表 1 益母草不同萃取部位的活性跟踪

Table 1 Bioassay of different extraction parts of *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F

| 组别 Group | 跟踪结果 Tracking results | | | |
|---|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| | 0.375 mg/mL | 0.75 mg/mL | 1.5 mg/mL | 3.0 mg/mL |
| 乙醇提取物 Ethanol extract | - | - | + | +++ |
| 石油醚萃取物 Petroleum ether extract | - | - | - | - |
| 乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract | - | +++ | +++ | +++ |
| 二氯甲烷萃取物 Dichloromethane extract | - | + | +++ | +++ |
| 萃取后剩余物 Residue | - | - | - | - |
| 阴性对照(5% DMSO) Negative control | | | - | |
| 阳性对照(异烟肼 2 μ g/mL) Positive control | | | +++ | |

乙酸乙酯萃取部位经硅胶柱色谱分离,得到六个组分(Fr. A、Fr. B、Fr. C、Fr. D、Fr. E、Fr. F),采用

改良罗氏培养基进行活性跟踪,确定 Fr. C 为活性部位(表 2),其抑制结核杆菌的 MIC 值为 0.4 mg/mL。

表 2 益母草乙酸乙酯部位的活性跟踪

Table 2 Bioassay of ethyl acetate fraction in *Leonurus artemisia* (Laur.) S. Y. Hu F

| 组别 Group | 跟踪结果 Tracking results | | |
|---|-----------------------|-----------|-----------|
| | 0.2 mg/mL | 0.4 mg/mL | 0.8 mg/mL |
| Fr. A | - | - | - |
| Fr. B | - | - | - |
| Fr. C | + | +++ | +++ |
| Fr. D | - | - | - |
| Fr. E | - | - | - |
| Fr. F | - | - | - |
| 阴性对照(5% DMSO) Negative control | | - | |
| 阳性对照(异烟肼 2 μ g/mL) Positive control | | +++ | |

Fr. C 进一步进行硅胶柱色谱分离得到活性组分 Fr. 2, Fr. 2 再经硅胶柱色谱反复纯化,得到活性单体化合物 1,经改良罗氏培养基进行活性测试,化合物 1 的 MIC 值为 80 μ g/mL。

2.2 结构鉴定

化合物 1 白色针晶(MeOH); mp. 195~196 $^{\circ}$ C。 1 H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 7.26 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.33 (t, J = 12 Hz, 4 Hz, 2H), 3.83 (s, 6H), 3.49 (s, 1H), 3.38 (dt, J = 6 Hz, 4 Hz, 2H), 3.31 (p, J = 4 Hz, 2H), 3.29 (s,

1H), 3.27 (s, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.76 (m, 2H)。ESI-MS: m/z 312 [$M + H$] $^+$ 。经薄层层析,用改良的碘化铋钾显色呈砖红色。与益母草碱对照品经 TLC 检测,其 R_f 值一致,氢谱、质谱数据与文献^[16]对照基本一致,确定化合物 1 为益母草碱(图 3)。

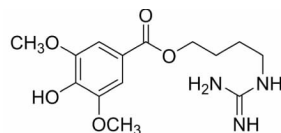


图 3 益母草碱结构式

Fig. 3 Structural formula of leonurine

3 讨论

益母草常用于月经不调,痛经闭经,恶露不尽,疮疡肿毒等症,是妇科疾病的常用药。益母草的化学成分主要有生物碱(益母草碱、水苏碱、益母草啉、益母草宁)、黄酮类、二萜类、环形多肽、阿魏酸等小分子化合物^[17]。益母草碱的药理作用较多,具有舒张冠脉、抑制 ATP 的合成、抑制炎症因子的信号通路、抑制糖异生、促进子宫收缩等作用^[18]。目前未见益母草碱抗结核杆菌活性的报道。

从结构上看,益母草碱(3,5-二甲氧基-4-羟基-苯甲酸(4-胍基)-1-丁酯)属于有机胺类生物碱,含有三个 N 原子,与一线抗结核药物异烟肼类似,异烟肼同样含有 3 个 N 原子,一个 N 组成吡啶环,另外两个 N 原子形成胍基,而在益母草碱中,三个 N 原子以胍基的形式存在,由此我们推测,益母草碱抗结核杆菌机制可能与异烟肼类似。

在我们的初步试验(尚未报道)中发现,益母草碱在大鼠子宫及其附件中的分布大于异烟肼,这一结果有待扩大样本量进一步证实。同时我们拟对益母草碱进行结构修饰,提高其抗结核杆菌活性并增加其在子宫中的分布,为治疗子宫结核提供新的线索。

参考文献

- Rong K(荣昆). Progress in diagnosis of female pelvic tuberculosis[J]. *Mod Diagn Treat*(现代诊断与治疗),2015,9:2132-2133.
- Xie X(谢幸),Gou WL(苟文丽). Obstetrics and gynecology(妇产科学)[M]. Beijing: People's Health Publishing House 2013:265.
- Su L(苏莉). Diagnosis and treatment of female mass with pelvic tuberculosis[J]. *Chin J Nosocomiol*(中华医院感染学杂志),2013,23:4858-4859.
- Xin YL(辛亚兰),You RF(游润芳),Qin Q(秦琦),et al. Incidence analysis of pelvic tuberculosis in patients with infertility at different centers[J]. *Anhui Med Pharm J*(安徽医药),2014,11:2094-2097.
- Huang Y(黄瑜),Zhou Y(周莹),Chen R(陈蓉),et al. Pelvic tuberculosis in 69 women[J]. *J Reprod Med*(生殖医学杂志),2013,22:819-823.
- Chen H(陈慧). The relationship between female pelvic tuberculosis and infertility and diagnosis and treatment[J]. *Chin & Fgn Med Treat*(中外医疗),2013,48:68-70.

- Liang WY(梁文郁),Zhang XZ(张学智),Bai WP(白文佩),et al. Clinical observation on treating 105 cases of primary dysmenorrhea with compound motherwort ointment[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*(北京中医药),2006,25:510-511.
- Cao RZ(曹瑞珍). Clinical observation of motherwort ointment in the treatment of irregular vaginal bleeding in gynecology department[J]. *Chin J of Clinical Rational Drug Use*(临床合理用药),2012,5:78-79.
- Huang LG(黄列国),Zhong XL(钟贤莲). Clinical application of *Extractum Leonuri Inspissatum* ointment to reduce bleeding after drug abortion[J]. *J Hengyang Med Coll*(衡阳医学院学报),1996,24:326-327.
- Qian K(钱坤),Zhang W(张伟),Jiang HY(姜海英). Effect comparison of compound motherwort oral solution and motherwort granule in the treatment of colporrhagia after drug abortion[J]. *China Pharm*(中国药师),2016,19:94-95.
- Huang HY(黄惠莹),Dai YL(戴玉兰),Huang QZ(黄巧珍). Clinical observation of uterine muscle injection of motherwort injection in myomectomy[J]. *J Guangxi Univ Tradit Chin Med*(广西中医药大学学报),2016,19:35-36.
- Su GY(苏冠月),Yu JJ(喻佳洁),Li YP(李幼平). Effect of motherwort injection in promoting postpartum involution of uterus: a meta-analysis[J]. *Chin j of EBM*(中国循证医学杂志),2016,16:1313-1321.
- Ou DL(欧弟灵),Qiu JC(丘峻朝). Effects of Leonurus japonicus injection combined with oxytocin on preventing postpartum hemorrhage and promoting uterine involution[J]. *Med J Chin Peop's Heal*(中国民康医学),2017,29:17-18.
- Gao SF(高山凤),Jia HM(贾红梅). Clinical study of motherwort injection promoting uterine involution after cesarean section[J]. *Cap Med*(首都医药),2010,17:44.
- Han LF(韩立芬),Song SM(宋善敏),Deng W(邓伟),et al. *In vitro* evaluation of the potential anti Mycobacterium tuberculosis activity of 29 Chinese traditional medicinal plants[J]. *Pharm Chem*(药物化学),2017,5:41-43.
- Yeung HW,Kong YC,Lay WP,et al. The structure and biological effect of leonurine[J]. *Planta Medica*,1977,31:51-56.
- Li JF(李建芳). Advances in the pharmaceutical research of Leonurus Leonuri[J]. *Intern Med China*(内科),2013,8:533-536.
- Liang BZ(梁博志),Luo JH(罗建华),Yang DH(杨东花),et al. Progress in the study of the effect and mechanism of Leonurine[J]. *J Guiyang Coll Tradit Chin Med*(贵阳医学院学报),2017,39:93-95.