

土家药凹叶景天保肝作用及化学成分研究

徐冲¹, 白殊同², 冷静¹, 沈洁¹, 刘霞¹, 郭小红¹, 蒋伟^{3*}

¹重庆市中医研究院 古验方与中药制剂研究所; ²重庆市中医研究院 中医特色诊疗工程技术研究中心, 重庆 400021;

³江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004

摘要:以保肝活性为导向, 利用色谱分离技术, 从土家族还阳药凹叶景天乙醇提取物的乙酸乙酯部位中分离得到 9 个化合物, 根据波谱分析鉴定结构为: 二十七烷三醇(1)、(3*S*, 5*R*, 6*S*, 9*R*)-megastigmane-3, 9-diol(2)、槲柳素(3)、槲皮素(4)、木犀草素(5)、异鼠李素(6)、对香豆酸(7)、胡萝卜素(8)、谷甾醇(9)。化合物 1~7 为首次从该植物中分离得到。体外保肝活性实验显示, 化合物 4~7 在给药剂量的范围内均具有抑制 CCl₄ 造成的正常人肝细胞 L-02 氧化损伤作用, 并具有剂量依赖关系。由此可见, 凹叶景天的黄酮类成分是其保肝作用的主要物质基础, 其作用机制与抗脂质过氧化有关。

关键词:凹叶景天; 保肝; 抗氧化; 化学成分

中图分类号: R284; Q946

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.S.017

The Hepatoprotective Effect and Chemical Constituents of *Sedum emarginatum* Mig.

XU Chong¹, BAI Shu-tong², LENG Jing¹, SHEN Jie¹, LIU Xia¹, GUO Xiao-hong¹, JIANG Wei^{3*}

¹Institute of Ancient Prescription and Chinese Medicine Preparation, Chongqing Academy of Traditional Chinese Medicine; ²Engineering Technology Research Center of TCM

Characteristic Diagnosis and Treatment, Chongqing Academy of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; ³Research Center of Natural Resources of Chinese Medicinal Materials and National Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Guided by liver protective activity, chromatographic separation technology was applied to the ethyl acetate portion of ethanol extract of *Sedum emarginatum* Mig. Nine compounds were isolated and identified. heptacosane-triol (1), (3*S*, 5*R*, 6*S*, 9*R*)-megastigmane-3, 9-diol (2), tamarixetin (3), quercetin (4), luteolin (5), isorhamnetin (6), p-coumaric acid (7), β -carotene (8), β -sitosterol (9). Compounds 1-7 are isolated from this species for the first time. Compounds 4-7 all exhibited oxidative damage inhibitory activity which is induced by carbon tetrachloride in normal human hepatocyte L-02 with dose-dependent relationships. It follows that the main effective substances of *Sedum emarginatum* Mig are flavonoids, and the mechanisms of its hepto-protection effect is related to antioxidation.

Key words: *Sedum emarginatum* Mig.; hepto-protection; antioxidation; chemical constituents

凹叶景天为景天科景天属植物凹叶景天 *Sedum emarginatum* Mig. 的全草, 俗称“石雀还阳、石板还阳”, 属于三峡地区久负盛名的土家族“还阳药”, 在渝东南、鄂西等地区民间应用历史悠久, 功效清热解毒、凉血止痛、止血利湿, 用于痈疔疮、带状疱疹、瘰疬、咯血、吐血、痢疾、淋证、黄疸等^[1]。现代研究表明, 凹叶景天具抗氧化、抗肿瘤、保肝等活性^[2-4]。

本课题组以保肝作用为导向, 对凹叶景天乙酸乙酯部位的化学成分进行了系统研究, 分离得到了 9 个化合物, 通过 HR-MS、NMR 等技术确定了化学物结构, 分别是: 二十七烷三醇(1)、(3*S*, 5*R*, 6*S*, 9*R*)-megastigmane-3, 9-diol(2)、槲柳素(3)、槲皮素(4)、木犀草素(5)、异鼠李素(6)、对香豆酸(7)、 β -胡萝卜素(8)、 β -谷甾醇(9)。同时, 对化合物生物活性进行了测试, 初步明确了凹叶景天保肝作用可能的物质基础。

收稿日期: 2017-11-16

接受日期: 2018-03-14

基金项目: 重庆市科委基础科学与前沿技术研究项目 (cstc2014jcyjA10080)

* 通讯作者 Tel: 86-791-87119067; E-mail: dynastjw@126.com

1 仪器与材料

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图由 Bruker BioSpin GmbH 600 型超导核磁共振仪和 Bruker BioSpin GmbH 400 型超导核磁共振仪 (Bruker BioSpin 公司, 德国) 测定, TMS 为内标; HRMS 为 AB sciex Triple-TOF 5600 + 质谱仪 (AB sciex 公司, 美国); MCI GEL CHP20P (70-150 μm , 300A, 三菱化学公司, 日本); Sephadex LH-20 (Pharmacia 公司); 柱色谱硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工); 半制备液相色谱仪 (Shimadzu Lc-6AD, 岛津公司, 日本), 色谱柱 Shim-park RP-C₁₈ (20 × 200 mm, 10 μm); 分离用化学试剂为分析纯。

正常人肝细胞株 L-02 (博全生物技术有限公司); 二甲基亚砜 (碧云天生物技术有限公司); RP-MI-1640 培养基 (Hyclone 公司, 美国); 四氯化碳、MTT (Sigma 公司, 美国); 胎牛血清 (MRC 公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (Intrivogen 公司, 美国); 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (Elabscience 公司); 水飞蓟宾胶囊 (天津天士力圣特制药有限公司, 批号: 650709131)。生物安全柜、二氧化碳细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); 荧光显微镜 (Life 公司, 美国); 酶标仪 (bioteck 公司, 美国)。

凹叶景天药材于 2014 年 6~8 月采自重庆市南川区三泉镇, 由重庆市药物种植研究所林茂祥副研究员鉴定为景天科景天属植物凹叶景天 *Sedum emarginatum* Mig. 的全草。

2 实验方法

2.1 提取与分离

根据预实验结果, 凹叶景天保肝作用有效部位为乙酸乙酯部位, 故本研究针对此有效部位进行系统化学成分分离。凹叶景天干燥全草 3.2 kg, 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次半小时, 合并提取液, 减压浓缩至无醇味, 采用系统溶剂法得乙酸乙酯部位约 150 g。对其进行硅胶柱色谱分离, 以石油醚—乙酸乙酯体系 (20:1→0:1) 梯度洗脱, 得 4 个部分 (I-IV)。Ⅲ经 MCI 柱色谱 (甲醇-水 50:50→100:0) 洗脱, 得 5 个组分 (Fr. 1-5); Fr. 2 经反复硅胶柱色谱 (氯仿-甲醇 40:1→10:1), 得化合物 1 和 2。Fr. 3 经硅胶柱色谱氯仿-甲醇 40:1→0:1 及反复 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (甲醇) 及重结晶纯化, 得化合物

3~9。

2.2 化合物结构鉴定

分析核磁、质谱图谱, 并与相关文献报道数据进行比较, 确定化合物化学结构。

2.3 单体成分保肝活性测试

采用文献方法^[12]建立四氯化碳诱导的肝细胞损伤模型, 以 MDA、SOD 为四氯化碳致肝细胞损伤生化指标, 对分离得到的化合物 4~7 进行活性测试。

当细胞生长至最佳状态, 取对数生长期细胞用于本实验, 制备密度为 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液, 接种在 12 孔细胞培养板上, 每孔 1 mL, 静置培养细胞 24 h。设置空白对照、模型组、阳性对照组 (水飞蓟宾)、给药组, 每组设置 5 个复孔, 在同样条件下继续静置培养, 24 h 后加 60% 四氯化碳的培养基损伤 2 h, 收集细胞上清液, 备用, 再向每个孔加入 PBS 清洗 1 遍, 用 RIPA 细胞裂解液充分裂解, 显微镜下观察至全部破碎, 最后细胞刮收集细胞, 裂解后的细胞在 4℃、14000 g 条件下离心 5 min, 取上清液。按照试剂盒说明书进行 MDA 的含量测定和 SOD 的活力测定。

3 结果与分析

3.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色蜡状固体; 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{O}_3$; HR-ESI-MS m/z : 427. 4137 [$\text{M}-\text{H}$]⁻, 451. 4101 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺。+ TOF MS 图显示脱一系列亚甲基: 418. 7815、393. 2081、351. 2487、302. 1435、274. 2734、261. 1309、218. 2113, 呈现长链脂肪醇的裂解特征; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3. 88 (2H, m), 3. 61 (1H, s), 连氧次甲基; 1. 55-1. 62 (6H, m), 1. 36-1. 54 (12H, m), 1. 20-1. 35 (29H, m), 脂肪链亚甲基信号; 两个端甲基信号 0. 93 (3H, t, $J = 6. 9$ Hz), 0. 88 (3H, t, $J = 7. 0$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 73. 0 (C-OH × 2), 71. 9 (C-OH), 42. 9, 40. 5, 38. 0, 37. 6, 37. 2, 31. 9, 29. 7 ~ 29. 4, 25. 7, 22. 7, 21. 3, 18. 5, 14. 1, 14. 0。根据以上波谱分析及参考文献^[5]数据, 推断该化合物为二十七烷三醇。

化合物 2 浅黄色油状物; HR-ESI-MS m/z : 429. 3936 [$2\text{M} + \text{H}$]⁺; ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3. 75-3. 62 (2H, m, H-3, 9), 1. 89 (1H, d, $J = 12. 3$ Hz, H-4eq), 1. 69-1. 61 (1H, m, H-2eq), 1. 61 ~ 1. 32 (5H, m, H-5, 7, 8), 1. 22 (1H, m, H-4ax),

1.15 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-10), 1.13-0.86 (9H, m, H-2_{ax}, 11, 12), 0.84 (3H, s, H-13), 0.53 (1H, ddd, $J = 10.9, 4.8, 2.2$ Hz, H-6); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 69.1 (C-9), 67.3 (C-3), 54.1 (C-6), 51.8 (C-2), 46.5 (C-4), 42.6 (C-8), 36.7 (C-1), 35.0 (C-5), 31.3 (C-12), 26.3 (C-7), 23.5 (C-10), 21.5 (C-13), 21.4 (C-11)。以上信号与文献报道^[6,7]的波谱数据一致,故鉴定化合物**2**为(3*S*, 5*R*, 6*S*, 9*R*)-megastigmane-3, 9-diol。

化合物 3 黄色粉末; ESI-MS m/z : 317 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.45 (1H, s, 5-OH), 10.79 (1H, s, 3-OH), 9.45 (1H, s, 7-OH), 9.33 (1H, s, 3'-OH), 7.67 ~ 7.64 (2H, m, H-2', 6'), 7.07 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6)。以上信号与文献报道^[8]的波谱数据一致,故鉴定化合物**3**为怪柳素。

化合物 4 黄色针晶; HR-ESI-MS m/z : 303.0506 [M + H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 12.17 (1H, s, 5-OH), 7.83 (1H, d, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 7.70 (1H, dd, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.52 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-8), 6.26 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-6); ¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 176.6 (C-4), 165.0 (C-7), 162.4 (C-5), 157.8 (C-9), 148.4 (C-4'), 147.0 (C-2), 145.9 (C-3'), 136.8 (C-3), 123.8 (C-1'), 121.5 (C-6'), 116.3 (C-5'), 115.8 (C-2'), 104.2 (C-10), 99.2 (C-6), 94.5 (C-8)。以上信号与文献报道^[8]的波谱数据一致,故鉴定化合物**4**为槲皮素。

化合物 5 黄色粉末; HR-ESI-MS m/z : 285.0384 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 7.50 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.48 (1H, dd, $J = 2.2, 8.3$ Hz, H-6'), 7.00 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 显示 B 环为 ABX 自旋系统, 存在 3', 4'-二羟基; 6.52 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 6.25 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 示 A 环 5, 7-二取代; 6.58 (1H, s, H-3); ¹³C NMR (150 MHz, (CD₃)₂CO) δ : 183.0 (C-4), 165.1 (C-7), 164.0 (C-5), 163.3 (C-9), 158.7 (C-3'), 150.0 (C-2), 146.4 (C-4'), 123.7 (C-1'), 120.1 (C-6'), 116.6 (C-2'), 114.0 (C-5'), 105.3 (C-3), 104.2 (C-10), 99.6 (C-6), 94.6 (C-8)。以上信号与文献报道^[9]的波谱数据一致,故鉴定化合物**5**为木犀草素。

化合物 6 淡黄色针晶; HR-ESI-MS m/z : 315.0491 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.47 (1H, s, 5-OH), 10.77 (1H, s, 7-OH), 9.74 (1H, s, 4'-OH), 9.43 (1H, s, 3-OH), 7.76 (1H, d, $J = 2.0, 8.5$ Hz, H-2'), 7.69 (1H, dd, $J = 2.1, 8.5$ Hz, H-6'), 6.94 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, 3'-OCH₃)。以上信号与文献报道^[10]的波谱数据一致,故鉴定化合物**6**为异鼠李素。

化合物 7 白色粉末; HR-ESI-MS m/z : 163.0414 [M-H]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3), 7.45 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6, 8), 6.81 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5, 9), 6.28 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2)。以上信号与文献报道^[11]的波谱数据一致,故鉴定化合物**7**为对香豆酸。

化合物**8**、**9**分别为 β -胡萝卜素和 β -谷甾醇,通过与标准品薄层对照及质谱确定。

3.2 单体化合物体外保肝活性试验

采用 SPSS 19.0 软件对实验结果进行分析,结果以均数 \pm 标准差 ($X \pm s$) 表示。各组间比较采用单因素方差分析法 (One-Way ANOVA), 实验结果以 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

3.2.1 化合物**4**~**7**对 L-02 细胞的增值影响

随着各化合物浓度的增高, L-02 细胞增殖作用呈现先增强后下降的趋势, 当给药浓度达到一定值时, 化合物对细胞具有显著的抑制增殖作用, 表现出细胞毒性 (结果见表 1)。根据 MTT 结果, 化合物**4**~**7**分别采用 18、32、60、34 mg/L 浓度作为高剂量用于后续实验。

3.2.2 单体化合物对四氯化碳致肝细胞损伤 SOD、MDA 的影响

根据以上 MTT 实验结果, 选择化合物**4**~**7**的高浓度给药剂量分别为 18、32、60、34 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 中、低浓度分别依次减半。按 2.3 方法进行实验, 结果提示化合物**4**~**7**均能显著降低 MDA 含量, 增强 SOD 活性, 见表 2。

实验结果显示 (见表 1), 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 MDA 含量显著增高, 而 SOD 含量降低 (均 $P < 0.01$)。与模型组比较, 水飞蓟宾组、化合物**4**与化合物**5**高剂量组均可具有显著提高细胞上清液中 SOD 含量作用, 同时降低 MDA 的含量。上述实验结果显示, **4**~**7**号化合物在给药剂量范围内

表1 化合物4~7对L-02细胞的增值影响

Table 1 The effects of compounds 4~7 on the proliferation of L-02 cells

化合物4 Compound 4		化合物5 Compound 5		化合物6 Compound 6		化合物7 Compound 7	
组别 Group (mg/L)	OD值 OD value	组别 Group (mg/L)	OD值 OD value	组别 Group (mg/L)	OD值 OD value	组别 Group (mg/L)	OD值 OD value
Control	0.390 ± 0.051	Control	0.361 ± 0.021	Control	0.361 ± 0.021	Control	0.438 ± 0.009
73.500	0.311 ± 0.016 *	65.000	0.471 ± 0.008 *	60.000	0.539 ± 0.023 *	69.000	0.767 ± 0.014 *
36.750	0.353 ± 0.025	32.500	0.494 ± 0.012 *	30.000	0.424 ± 0.014 *	34.500	0.833 ± 0.017 *
18.375	0.568 ± 0.039 *	16.250	0.453 ± 0.018 *	15.000	0.387 ± 0.006	17.250	0.798 ± 0.017 *
9.186	0.519 ± 0.027 *	8.125	0.458 ± 0.012 *	8.625	0.342 ± 0.025	8.625	0.769 ± 0.020 *
4.594	0.429 ± 0.022	4.063	0.378 ± 0.025 *	4.313	0.345 ± 0.013	4.313	0.635 ± 0.041 *
2.297	0.380 ± 0.031	2.031	0.370 ± 0.016	2.156	0.348 ± 0.019	2.156	0.429 ± 0.024
1.148	0.385 ± 0.017	1.016	0.361 ± 0.019	1.078	0.349 ± 0.007	1.078	0.420 ± 0.036
0.574	0.355 ± 0.023	0.508	0.343 ± 0.019	0.539	0.357 ± 0.063	0.539	0.406 ± 0.013

注:与对照组比较: * $P < 0.05$ 。Note: Compare with control, * $P < 0.05$.表2 四种单体对四氯化碳致肝细胞损伤SOD、MDA的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of four compounds on SOD and MDA in carbon tetrachloride induced hepatocyte damage($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	给药浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Dosage	超氧化物歧化酶 SOD($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	丙二醛 MDA($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
阴性对照		0.664 ± 0.048 [#]	16.376 ± 1.122 [#]
CCl ₄ 对照组		0.264 ± 0.021 *	25.775 ± 1.081 *
水飞蓟宾	0.1	0.495 ± 0.077 * [#]	23.115 ± 1.388 * [#]
	18	0.483 ± 0.025 * [#]	20.776 ± 0.597 * [#]
化合物4	9	0.305 ± 0.046 *	18.048 ± 1.029 [#]
	4.5	0.258 ± 0.026 *	25.749 ± 1.001 *
	32	0.402 ± 0.029 * [#]	21.694 ± 0.349 * [#]
化合物5	16	0.314 ± 0.029 *	23.072 ± 1.769 * [#]
	8	0.279 ± 0.013 *	25.858 ± 1.469 *
	60	0.355 ± 0.016 * [#]	20.938 ± 0.839 * [#]
化合物6	30	0.296 ± 0.030 *	22.415 ± 1.335 * [#]
	15	0.238 ± 0.039 *	23.675 ± 1.045 * [#]
	34	0.479 ± 0.019 * [#]	18.025 ± 1.034 [#]
化合物7	17	0.418 ± 0.015 * [#]	18.657 ± 0.222 * [#]
	8.5	0.318 ± 0.032 * [#]	23.287 ± 1.045 * [#]

注:与空白对照组比较 * $P < 0.05$; 与模型组比较[#] $P < 0.05$ 。Note: Compare with control, * $P < 0.05$; Compare with model, [#] $P < 0.05$.

均具有抑制 CCl₄ 造成的 L02 细胞氧化损伤作用,并具有剂量依赖关系。由此可见,凹叶景天的黄酮类成分是其保护肝作用的主要物质基础,其作用机制与抗脂质过氧化有关。

4 讨论

凹叶景天为常用中药垂盆草同属近缘种植物药,民间也常用来清热解毒、止血、促进伤口愈合,广泛用于多种炎症、各种出血、烧烫伤、疮痍疗毒等的治疗,土家族地区还普遍用于治疗癌症。该植物资源丰富,在渝东南、鄂西、湘西分布较多,有一定的开

发前景。本研究对凹叶景天的活性部位开展化学成分研究,并初步明确了保肝活性的物质基础及可能的作用机制,为后续开发利用该植物资源,挖掘民族药物价值,提供了参考依据。

参考文献

- 1 Yu GL (余甘霖), Shen L (沈力). Three gorges chinese herbal medicine resources(长江三峡中草药资源) [M]. Beijing: China traditional chinese medicine publishing house, 2012.