

桦褐孔菌化学成分的胆碱酯酶抑制和细胞毒活性研究

魏艳梅¹, 陈惠琴², 杨理², 梅文莉², 陈志宝^{1,3*}, 戴好富^{2*}¹黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319;²海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101;³广东海洋大学农学院, 湛江 524088

摘要:为了研究桦褐孔菌的化学成分并探究其胆碱酯酶抑制和细胞毒活性。采用各种柱色谱方法从桦褐孔菌乙酸乙酯部分中分离得到 12 个单体化合物, 通过现代波谱学技术分别鉴定为 monogynol A (**1**)、桦木酸 (**2**)、白桦酯醇 (**3**)、羊毛甾醇 (**4**)、inoterpene D (**5**)、inonotsutrial C (**6**)、(3 β ,5 α ,6 β ,22E)-6-methoxyergosta-7,22-diene-3,5-diol (**7**)、过氧化麦角甾醇 (**8**)、香草酸 (**9**)、2-(3',4'-二羟基苯基)-1,3-胡椒环-5-醛 (**10**)、2,3-二羟基-1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-1-丙酮 (**11**) 和 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1-one (**12**), 其中化合物 **1**、**10** 和 **11** 为首次从桦褐孔菌中分离得到。活性测试结果表明化合物 **2**、**3**、**4** 和 **6** 有较好的丁酰胆碱酯酶抑制活性, **2** 和 **3** 有较好的乙酰胆碱酯酶抑制活性; 化合物 **1**、**5** 和 **6** 有较好的细胞毒活性。

关键词:桦褐孔菌; 化学成分; 胆碱酯酶; 细胞毒

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)7-1156-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.7.010

Cholinesterase inhibitory and cytotoxic activity of chemical constituents from *Inonotus obliquus*WEI Yan-mei¹, CHEN Hui-qin², YANG Li², MEI Wen-li², CHEN Zhi-bao^{1,3*}, DAI Hao-fu^{2*}¹College of Life Science & Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;²Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;³College of Agronomy, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: To study the chemical constituents of *Inonotus obliquus* and their cytotoxicity and cholinesterase inhibitory activity. With various chromatographic methods, twelve compounds were isolated from the ethyl acetate fraction of *I. obliquus*. Their structures were identified on the basis of spectroscopic data analysis as monogynol A (**1**), betulinic acid (**2**), betulin (**3**), lanosterol (**4**), inoterpene D (**5**), inonotsutrial C (**6**), (3 β ,5 α ,6 β ,22E)-6-methoxyergosta-7,22-diene-3,5-diol (**7**), ergosterol peroxide (**8**), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (**9**), 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-carboxaldehyde (**10**), 2,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-1-acetone (**11**), 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propan-1-one (**12**). Compounds **1**, **10** and **11** were isolated from the *I. obliquus* for the first time. The bioassay results showed that compounds **2**, **3**, **4**, and **6** displayed butyrylcholinesterase inhibitory activity; Compounds **2** and **3** showed acetylcholinesterase inhibitory activity; compounds **1**, **5**, and **6** exhibited moderate cytotoxic activity.

Key words: *Inonotus obliquus*; chemical constituent; cholinesterase; cytotoxicity桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*), 也称作桦树茸、白

桦茸, 是俄罗斯的一种民间药用真菌, 主产于北纬 40°~50° 的高寒地区, 在我国主要分布于吉林和黑龙江省, 其寄生于白桦树上, 生长期达 15~20 年, 可耐零下 40 °C 的极寒^[1]。桦褐孔菌入药部位主要是菌核, 大量药理实验表明其有治疗糖尿病^[2]、抗癌^[3,4] (乳腺癌、肝癌、胃癌、肺癌、宫颈癌)、抗病

收稿日期: 2019-12-26 接受日期: 2020-04-24

基金项目: 海南省重点研发计划 (ZDYF2019217); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21); 中国热带农业科学院院级创新团队南药产业技术创新团队 (17CXTD-15); 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费 (1630052016008)

* 通信作者 E-mail: chenzb@gdou.edu.cn, daihaofu@itbb.org.cn

毒^[5]和增强免疫力^[6]等作用。还有研究发现从桦褐孔菌中分离得到的桦褐孔菌醇可以保护 PC12 细胞免受氧葡萄糖剥夺-再恢复引起的损伤^[7],表明其有用于治疗中风的可能。而目前关于桦褐孔菌中化合物对与神经系统相关的胆碱酯酶抑制作用的研究较少,为了进一步明确桦褐孔菌中的药理活性成分,本课题对桦褐孔菌乙酸乙酯部分进行了化学成分研究,并对分离得到的所有单体化合物进行胆碱酯酶抑制活性以及细胞毒活性测试。

1 仪器与材料

Bruker AV-500 型超导核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);Autospec300 质谱仪(英国 VG 公司);分析型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);半制备高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);红外光谱仪(Nicolet 380 美国赛默飞世尔 Thermo 公司);紫外光谱仪(UV-2550 Shimadzu);旋光仪 MCP 5100(奥地利 Anton Paar 有限公司);N-1000(2 L)立式旋转蒸发仪和 CA-1111 冷却水循环装置(上海爱朗仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环真空泵(上海隆拓仪器设备有限公司);SW-40 超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);ELX-800 酶标仪(美国宝特公司);AS 220. R2 万分之一电子秤(RADWAG Wagi Elektroniczne);Sephadex LH-20 凝胶(Merck Co., Ltd.);C₁₈反相硅胶(20~45 μm,日本 Fuji Silysia Chemical Ltd 公司);柱层析用硅胶和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂);乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶、碘代硫代乙酰胆碱、二硫代二硝基苯甲酸(DNTB)和他克林均购自 Sigma 公司;人慢性髓原白血病细胞(K562)、人肝癌细胞(BEL-7402)、人胃癌细胞(SGC-7901)、人肝癌细胞(HepG2)购买自中国中科院上海生命科学研究院,人肺癌细胞(A549)和人宫颈癌细胞(Hela)购买自中南大学实验动物学部。

桦褐孔菌样品于 2017 年 6 月购买自俄罗斯,经中国热带农业科学院热带生物技术研究所王军博士鉴定为桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*),标本(No. 20170620)存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

2 提取与分离

将块状的桦褐孔菌(13.0 g)粉碎,用 95% 的乙醇浸泡提取 3 次,减压浓缩至无醇味,得到乙醇浸膏 0.76 kg。将乙醇浸膏用水分散形成悬浊液,依次用石油醚和乙酸乙酯分别萃取 3 次,分别浓缩得石油醚萃取物(32.8 g)和乙酸乙酯萃取物(211.0 g)。

将乙酸乙酯萃取物(211.0 g)经减压硅胶柱色谱,以石油醚-乙酸乙酯(100:1→1:1)梯度洗脱得到 28 个流份(Fr. 1~Fr. 28)。

Fr. 3 重结晶得化合物 4(2.5 g)。Fr. 5(17.0 g)先经 C₁₈反相硅胶柱色谱以甲醇-水(1:1→1:0)梯度洗脱,得到 25 个流份(Subfr. 5-1~Subfr. 5-25)。Subfr. 5-18(258.9 mg)经硅胶柱色谱以石油醚-氯仿-丙酮(10:5:0.1→0:1:1)梯度洗脱,得到 16 个流份(Subfr. 5-18-1~Subfr. 5-18-16)。Subfr. 5-18-13(45.8 mg)经硅胶 H 柱色谱以石油醚-乙酸乙酯(20:1)等梯度洗脱,得到化合物 8(25.8 mg)。Subfr. 5-18-15(42.0 mg)经硅胶 H 柱色谱以石油醚-氯仿-乙酸乙酯(6:5:1)等梯度洗脱,得到化合物 7(22.5 mg)。Fr. 9(5.2 g)经硅胶柱以石油醚-氯仿-乙酸乙酯(6:3:0.01→0:1:1)梯度洗脱,得到 15 个流份(Subfr. 9-1~Subfr. 9-14),Subfr. 9-9(1.0 g)经硅胶柱以石油醚-氯仿-丙酮(30:1:0.3→0:1:1)梯度洗脱得到 5 个流份(Subfr. 9-9-1~Subfr. 9-9-5),将 Subfr. 9-9-3 重结晶得化合物 3(33.4 mg)。Subfr. 9-15(1.4 g)经硅胶柱以石油醚-二氯甲烷-异丙醇(5:3:0.25→1:2:0)梯度洗脱,得到 22 个流份(Subfr. 9-15-1~Subfr. 9-15-22),Subfr. 9-15-3 重结晶得到化合物 2(65.2 mg)。Fr. 11(4.3 g)经 C₁₈反相硅胶柱色谱以甲醇-水(1:1→1:0)梯度洗脱,得到 33 个流份(Subfr. 11-1~Subfr. 11-33)。Subfr. 11-27(840.6 mg)经硅胶柱以石油醚-乙酸乙酯(40:1→10:1)梯度洗脱,得到 24 个流份(Subfr. 11-27-1~Subfr. 11-27-24)。Subfr. 11-27-12(8.5 g)经制备 TLC 以氯仿-甲醇(100:1)等梯度洗脱得化合物 1(8.0 mg)。

Fr. 19(7.4 g)经 C₁₈反相硅胶柱色谱以甲醇-水(3:7→1:0)梯度洗脱,得到 32 个流份(Subfr. 19-1~Subfr. 19-32)。Subfr. 19-3(112.8 mg)经 Sephadex LH-20 凝胶柱以氯仿-甲醇(1:1)除杂,再经硅胶柱以石油醚-丙酮(10:1)等梯度洗脱得化合物 9(22.5 mg)。Subfr. 19-23(155.9 mg)经硅胶柱石油醚-氯仿-乙酸乙酯(10:5:1→1:2:1)梯度洗脱得到 4 个流份(Subfr. 19-23-1~Subfr. 19-23-4)。Subfr. 19-23-1(12.9 mg)经制备 TLC 以石油醚-氯仿-异丙醇(5:5:0.5)展开得到化合物 5(6.4 mg)。Subfr. 19-23-4(12.7 mg)先经 Sephadex LH-20 凝胶柱除杂,再经硅胶柱以氯仿-甲醇(60:1)等梯度洗脱得到化合物 6(3.9 mg)。

Fr. 26(25.3 mg)经 C₁₈反相硅胶柱色谱,以甲

醇-水(1:9→1:0)梯度洗脱,得到12个流份(subf. 26-1~Subfr. 26-12)。Subfr. 26-2(0.4 g)经凝胶柱色谱(100%甲醇)划分为5个流份(Subfr. 26-2-1~Subfr. 26-2-5),Subfr. 26-2-4(82.1 mg)通过半制备HPLC(C_{18} 柱,甲醇-酸水V:V=18:82等梯度洗脱,流速为4 mL/min,检测波长254 nm)分离得到化合

物**10**(5.5 mg, t_R = 6 min)和**11**(5.1 mg, t_R = 8 min)。Subfr. 26-4-9(20.0 mg)经半制备HPLC(C_{18} 柱,甲醇-酸水V:V=35:65等梯度洗脱,流速为4 mL/min,检测波长254 nm)分离得到化合物**12**(1.3 mg, t_R = 7 min)。

3 结构鉴定

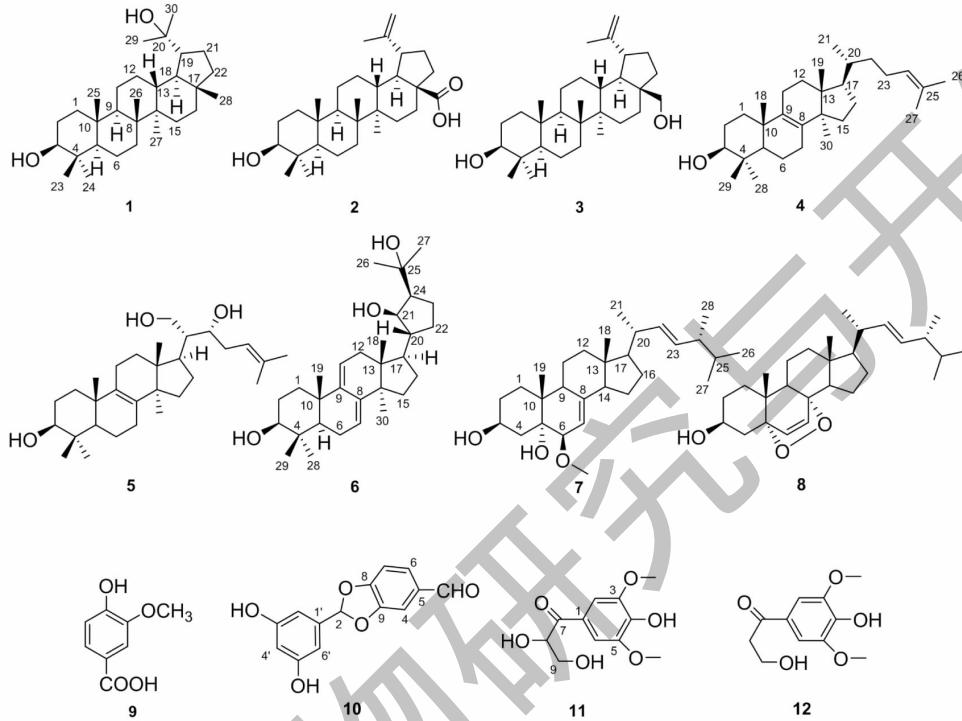


图1 化合物**1**~**12**的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds **1**-**12**

化合物 1 白色粉末($CHCl_3$);ESI-MS: m/z 445 $[M + H]^+$;分子式为 $C_{30}H_{52}O_2$; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.20 (1H, dd, J = 11.5, 4.8 Hz, H-3), 1.22 (3H, s, H-29), 1.12 (3H, s, H-30), 1.06 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-24), 0.81 (3H, s, H-23), 0.76 (3H, s, H-28); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.8 (C-1), 27.5 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 55.3 (C-5), 18.5 (C-6), 34.7 (C-7), 41.5 (C-8), 55.3 (C-9), 37.2 (C-10), 21.5 (C-11), 29.2 (C-12), 37.6 (C-13), 43.7 (C-14), 27.7 (C-15), 35.7 (C-16), 44.8 (C-17), 48.4 (C-18), 50.1 (C-19), 73.6 (C-20), 28.9 (C-21), 40.4 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.3 (C-25), 16.3 (C-26), 15.0 (C-27), 19.4 (C-28), 24.9 (C-29), 31.7 (C-30)。上述波谱数据与文献^[8]数据对照基本一致,故鉴定化合物**1**为

monogynol A (图1)。

化合物 2 白色粉末($CHCl_3$);ESI-MS: m/z 457 $[M + H]^+$;分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.58 (1H, s, H-30a), 4.46 (1H, s, H-30b), 2.87 (1H, m, H-3), 1.54 (3H, s, H-29), 1.15 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-9), 0.83 (3H, s, H-27), 0.76 (3H, s, H-23), 0.76 (3H, s, H-24), 0.66 (3H, s, H-26), 0.55 (3H, s, H-25); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.3 (C-1), 27.2 (C-2), 76.9 (C-3), 38.6 (C-4), 55.0 (C-5), 18.0 (C-6), 34.0 (C-7), 40.3 (C-8), 50.0 (C-9), 36.8 (C-10), 20.5 (C-11), 25.2 (C-12), 37.7 (C-13), 42.1 (C-14), 30.2 (C-15), 31.8 (C-16), 55.5 (C-17), 48.6 (C-18), 46.7 (C-19), 150.4 (C-20), 29.3 (C-21), 36.4 (C-22), 28.2 (C-23), 15.8 (C-24), 15.9 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27), 177.3 (C-28), 19.0 (C-29), 109.7 (C-30)。

上述波谱数据与文献^[9]数据对照基本一致,故鉴定化合物**2**为桦木酸。

化合物3 白色粉末(CHCl_3);ESI-MS: m/z 443 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :4.68 (1H, br s, H-30a), 4.58 (1H, br s, H-30a), 3.79 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-28a), 3.33 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-28b), 3.18 (1H, dd, $J = 11.4, 4.8$ Hz, H-3), 1.68 (3H, s, H-29), 1.64 (1H, m, H-13), 1.60 (1H, m, H-18), 1.02 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ :38.8 (C-1), 27.5 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 55.4 (C-5), 18.4 (C-6), 34.4 (C-7), 41.0 (C-8), 50.5 (C-9), 37.3 (C-10), 21.0 (C-11), 25.3 (C-12), 37.4 (C-13), 42.8 (C-14), 27.2 (C-15), 29.3 (C-16), 47.9 (C-17), 48.9 (C-18), 47.9 (C-19), 150.6 (C-20), 29.9 (C-21), 34.1 (C-22), 28.1 (C-23), 15.5 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.9 (C-27), 60.2 (C-28), 19.2 (C-29), 109.8 (C-30)。上述波谱数据与文献^[10]数据对照基本一致,故鉴定化合物**3**为白桦酯醇。

化合物4 白色粉末(CHCl_3);ESI-MS: m/z 427 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :5.09 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-24), 3.23 (1H, dd, $J = 11.6, 4.5$ Hz, H-3), 1.68 (3H, s, H-26), 1.60 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-28), 0.97 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.87 (3H, s, H-30), 0.80 (3H, s, H-28), 0.68 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ :36.5 (C-1), 28.0 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 50.5 (C-5), 18.4 (C-6), 26.6 (C-7), 134.5 (C-8), 134.5 (C-9), 37.2 (C-10), 21.1 (C-11), 31.0 (C-12), 44.6 (C-13), 49.9 (C-14), 31.1 (C-15), 28.3 (C-16), 50.5 (C-17), 15.9 (C-18), 19.3 (C-19), 36.4 (C-20), 18.8 (C-21), 35.7 (C-22), 25.1 (C-23), 125.4 (C-24), 131.0 (C-25), 25.9 (C-26), 17.8 (C-27), 15.6 (C-28), 28.1 (C-29), 24.4 (C-30)。上述波谱数据与文献^[11]数据对照基本一致,故鉴定化合物**4**为羊毛甾醇。

化合物5 白色粉末(CHCl_3);ESI-MS: m/z 459 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :5.21 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-24), 4.01 (1H, dd, $J = 10.8, 4.0$ Hz, H-21), 3.82 (1H, dt, $J = 10.6, 2.9$ Hz, H-22), 3.71 (1H, t, $J = 10.6$ Hz, H-

21), 3.22 (1H, dd, $J = 11.6, 4.5$ Hz, H-3), 1.75 (3H, s, H-26), 1.68 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-28), 0.98 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-30), 0.81 (3H, s, H-29), 0.77 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ :35.7 (C-1), 28.0 (C-2), 79.1 (C-3), 39.0 (C-4), 50.5 (C-5), 18.4 (C-6), 26.6 (C-7), 134.2 (C-8), 134.7 (C-9), 37.2 (C-10), 21.2 (C-11), 27.5 (C-12), 44.8 (C-13), 49.8 (C-14), 30.9 (C-15), 30.9 (C-16), 47.4 (C-17), 16.0 (C-18), 19.3 (C-19), 43.2 (C-20), 63.6 (C-21), 75.4 (C-22), 30.0 (C-23), 121.0 (C-24), 135.9 (C-25), 26.1 (C-26), 18.2 (C-27), 15.6 (C-28), 28.1 (C-29), 24.4 (C-30)。上述波谱数据与文献^[12]数据对照基本一致,故鉴定化合物**5**为 inoterpene D。

化合物6 白色粉末(CHCl_3);ESI-MS: m/z 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :8.31 (1H, s, H-21), 5.44 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 5.36 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11), 3.00 (1H, m, H-3), 1.09 (3H, s, H-26), 1.06 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-28), 0.90 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, s, H-30), 0.77 (3H, s, H-29), 0.56 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ :35.4 (C-1), 27.5 (C-2), 76.8 (C-3), 38.3 (C-4), 48.9 (C-5), 22.6 (C-6), 119.7 (C-7), 142.5 (C-8), 145.7 (C-9), 37.0 (C-10), 116.1 (C-11), 34.8 (C-12), 43.4 (C-13), 49.5 (C-14), 31.1 (C-15), 26.3 (C-16), 48.9 (C-17), 16.4 (C-18), 22.5 (C-19), 48.7 (C-20), 79.1 (C-21), 24.0 (C-22), 28.2 (C-23), 57.7 (C-24), 70.7 (C-25), 28.7 (C-26), 27.1 (C-27), 16.1 (C-28), 28.3 (C-29), 25.5 (C-30)。上述波谱数据与文献^[13]数据对照基本一致,故鉴定化合物**6**为 inonotsutriol C。

化合物7 白色粉末(CHCl_3);ESI-MS: m/z 445 $[\text{M} + \text{H}]^+$;分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ :5.39 (1H, m, H-7), 5.21 (1H, dd, $J = 15.3, 7.3$ Hz, H-23), 5.15 (1H, dd, $J = 15.3, 8.0$ Hz, H-22), 4.04 (1H, tt, $J = 11.0, 4.8$ Hz, H-3), 3.38 (3H, s, 6-OCH₃), 3.16 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-6), 2.02 (1H, m, H-20), 1.84 (1H, m, H-24), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-28), 0.83 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-26), 0.81 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-27), 0.58 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ :32.9 (C-1), 31.0 (C-2), 67.9 (C-3), 39.7 (C-4),

76.5 (C-5), 82.6 (C-6), 115.1 (C-7), 143.8 (C-8), 44.0 (C-9), 37.4 (C-10), 22.3 (C-11), 39.5 (C-12), 44.0 (C-13), 55.1 (C-14), 23.0 (C-15), 28.1 (C-16), 56.1 (C-17), 12.4 (C-18), 18.5 (C-19), 40.5 (C-20), 21.2 (C-21), 135.6 (C-22), 132.2 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28), 58.4 (6-OCH₃)。上述波谱数据与文献^[14]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **7** 为(3 β , 5 α , 6 β , 22*E*)-6-methoxyergosta-7, 22-diene-3, 5-diol。

化合物 8 白色粉末(CHCl₃);ESI-MS:*m/z* 429 [M + H]⁺;分子式 C₂₈H₄₄O₃; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 6.50 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 5.21 (1H, dd, *J* = 15.3, 7.5 Hz, H-23), 5.13 (1H, dd, *J* = 15.2, 8.3 Hz, H-22), 3.96 (1H, dd, *J* = 10.6, 4.6 Hz, H-3), 0.99 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, H-26), 0.81 (1H, d, *J* = 7.3 Hz, H-27), 0.80 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 34.8 (C-1), 30.2 (C-2), 66.6 (C-3), 37.1 (C-4), 82.3 (C-5), 135.3 (C-6), 130.9 (C-7), 79.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.1 (C-10), 20.8 (C-11), 39.5 (C-12), 44.7 (C-13), 51.8 (C-14), 23.5 (C-15), 28.8 (C-16), 56.3 (C-17), 13.0 (C-18), 18.3 (C-19), 39.9 (C-20), 21.0 (C-21), 135.5 (C-22), 132.4 (C-23), 42.9 (C-24), 33.2 (C-25), 20.1 (C-26), 19.8 (C-27), 17.7 (C-28)。上述波谱数据与文献^[15]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **8** 为过氧化麦角甾醇。

化合物 9 白色粉末(MeOH);ESI-MS:*m/z* 169 [M + H]⁺;分子式 C₈H₈O₄; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.47 (1H, m, H-7), 7.46 (1H, m, H-3), 6.75 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-4), 3.80 (3H, s, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 170.04 (C-1), 123.02 (C-2), 113.73 (C-3), 115.79 (C-4), 152.59 (C-5), 148.59 (C-6), 125.24 (C-7), 56.35 (C-8)。上述波谱数据与文献^[16]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **9** 为香草酸。

化合物 10 黄色油状(MeOH);ESI-MS:*m/z* 259 [M + H]⁺;分子式 C₁₄H₁₀O₅; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 9.69 (1H, s, H-8), 7.33 (1H, m, H-6), 7.32 (1H, m, H-5'), 6.91 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-7), 6.85 (1H, s, H-2'), 6.74 (2H, s, H-4, 6'), 5.22 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 104.8

(C-2), 115.8 (C-4), 130.8 (C-5), 126.4 (C-6), 116.2 (C-7), 147.2 (C-8), 153.7 (C-9), 193.1 (C-10), 146.1 (C-1'), 114.8 (C-2'), 146.7 (C-3'), 131.1 (C-4'), 115.4 (C-5'), 119.4 (C-6')。上述波谱数据与文献^[17]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **10** 为 2-(3', 4'-二羟苯基)-1, 3-胡椒环-5-醛。

化合物 11 无色油状(MeOH);ESI-MS:*m/z* 243 [M + H]⁺;分子式 C₁₁H₁₄O₆; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.40 (1H, s, OH-4), 7.28 (2H, s, H-2, H-6), 5.10 (1H, d, *J* = 6.9 Hz, OH-8), 4.99 (1H, m, H-8), 4.74 (1H, t, *J* = 5.9 Hz, OH-9), 3.82 (6H, s, OCH₃-3, OCH₃-5), 3.68 (1H, m, H-9a), 3.60 (1H, m, H-9b); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 125.5 (C-1), 106.6 (C-2), 147.5 (C-3), 141.1 (C-4), 147.5 (C-5), 106.6 (C-6), 198.4 (C-7), 73.8 (C-8), 64.4 (C-9), 56.2 (OCH₃-1, OCH₃-2)。上述波谱数据与文献^[18]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **11** 为 2, 3-二羟基-1-(4-羟基-3, 5-二甲氧基苯基)-1-丙酮。

化合物 12 无色油状(MeOH);ESI-MS:*m/z* 227 [M + H]⁺;分子式 C₁₁H₁₄O₅; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ : 7.33 (2H, s, H-2, H-6), 3.95 (1H, t, *J* = 6.2 Hz, H-9), 3.91 (6H, s, OCH₃-3, OCH₃-5), 3.19 (3H, t, *J* = 6.2 Hz, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 129.3 (C-1), 107.3 (C-2), 149.0 (C-3), 142.6 (C-4), 149.0 (C-5), 107.3 (C-6), 199.7 (C-7), 41.7 (C-8), 58.9 (C-9), 56.9 (OCH₃-3, OCH₃-5)。上述波谱数据与文献^[19]数据对照基本一致,故鉴定化合物 **12** 为 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3, 5-dimethoxyphenyl) propan-1-one。

4 活性测试

4.1 胆碱酯酶抑制活性测试

采用 Ellman 法^[20]测定各单体化合物的乙/丁酰胆碱酯酶抑制活性。取 150 μ L PBS 缓冲液(pH 为 8.0)、10 μ L 待测化合物溶液和 20 μ L 乙/丁酰胆碱酯酶溶液(浓度为 0.1 U/mL)于 96 孔板中,于 30 $^{\circ}$ C 放置 15 min 后,依次加入 10 μ L 5, 5'-二硫-双-2-硝基苯甲酸溶液(DTNB, 浓度为 2 mM)和 10 μ L 碘代硫代乙酰胆碱溶液(AICI, 浓度为 10 mM)/10 μ L 硫代碘代丁酰胆碱溶液(BICI, 浓度为 10 mM),充分混匀,30 min 后,在 412 nm 波长下测定并记录每孔的吸光度,重复三次取平均值。以他克林作为阳性对照, DMSO 作为阴性对照,试验重复操作 3

次。按下面公式计算各浓度下的抑制率,并计算得到化合物对乙/丁酰胆碱酯酶的半抑制浓度(IC_{50} 值)。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{阴性对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$$

结果(表 1)显示化合物 **2** 和 **3** 具有较好的乙酰胆碱酯酶抑制作用,化合物 **2**、**3**、**4** 和 **6** 显示有较好的丁酰胆碱酯酶抑制活性,其他化合物均未表现出明显活性。

表 1 化合物的胆碱酯酶抑制活性

Table 1 Cholinesterase inhibitory activity of compounds

化合物 Compound	IC_{50} (μM)	
	乙酰胆碱酯酶 Acetylcholine esterase	丁酰胆碱酯酶 Bubutyrocholinesterase
2	4.2 ± 0.3	6.7 ± 0.07
3	8.1 ± 1.2	9.1 ± 0.5
4	-	37.1 ± 0.7
6	-	42.6 ± 1.2
他克林 Tacrine	0.5 ± 0.02	0.2 ± 0.02

注:“-”表示没有活性;他克林为阳性对照。

Note:“-” indicates no activity; Tacrine is positive control.

4.2 化合物对胆碱酯酶的动力学测试

按照“4.1”方法,在不同底物[S]和样品的浓度下,分别测定各反应体系的吸光度变化率,以底物浓度的倒数($1/[S]$)为横坐标,酶促反应初始速率的倒数($1/V$)为纵坐标,绘制 Lineweaver-Burk 双倒数

曲线图。然后根据米氏常数 K_m 和最大反应速率数值(V_{max})的变化可判断抑制类型。以化合物浓度为横坐标,双倒数图中各个浓度直线的斜率为纵坐标,作二级曲线图,与 X 轴的截距为抑制常数 K_i 。

竞争型抑制剂的双倒数方程可表示为:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]}$$

混合型抑制剂的双倒数方程可表示为:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_{is}})$$

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m [I]}{V_{max} K_i}$$

式中,[S]为底物浓度,[I]为抑制剂浓度, V_{max} 为最大速率, K_m 为米氏常数, K_i 和 K_{is} 分别表示抑制剂与游离酶和酶-底物复合物结合的解离常数。

由化合物 **2** (A) 和 **3** (B) 抑制乙酰胆碱酯酶的双倒数图(图 2)可知,所有直线均交于第二象限内,该结果表明,化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制属于混合型抑制剂,化合物既可以和游离酶结合也可以和酶-底物复合物结合。由化合物 **2** (C) 和 **3** (D) 抑制丁酰胆碱酯酶双倒数图(图 3)可知,所有直线均交于 Y 轴,该结果表明,化合物 **2**、**3** 对丁酰胆碱酯酶的抑制均属于竞争型抑制剂,化合物与底物竞争酶的结合位点。

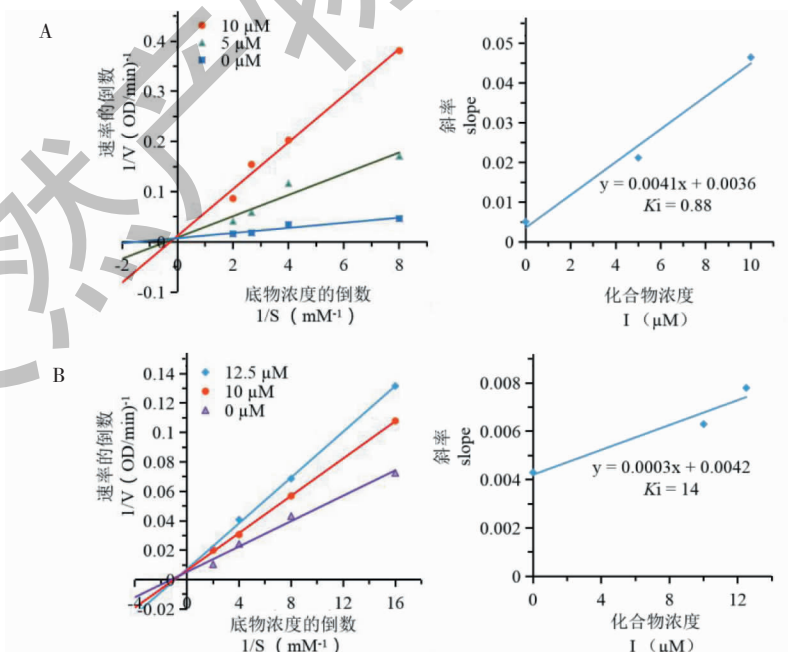


图 2 化合物 **2** (A) 和 **3** (B) 抑制乙酰胆碱酯酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 2 Lineweaver-Burk plot of **2** (A) and **3** (B) on acetylcholinesterase

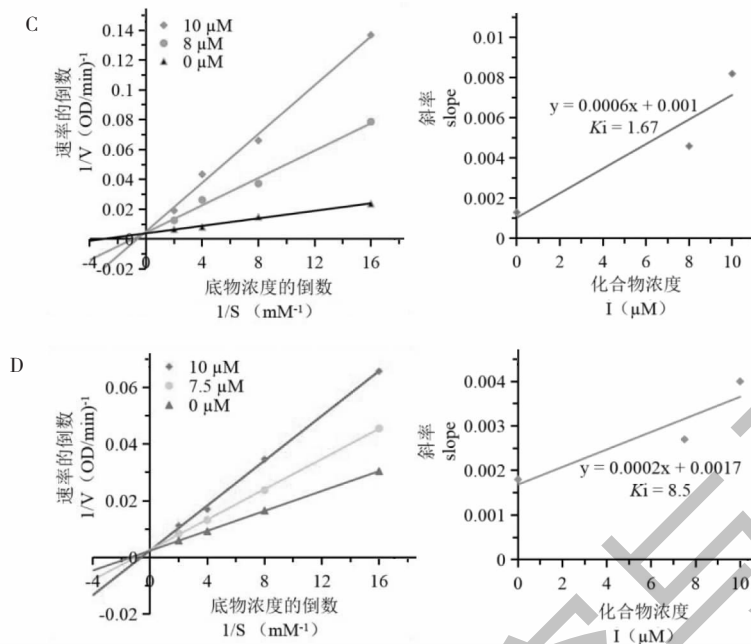


图3 化合物2(C)和3(D)抑制丁酰胆碱酯酶的 Lineweaver-Burk 双倒数图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of 2 (C) and 3 (D) on butyrylcholinesterase

4.3 细胞毒活性测定

采用 MTT 法^[21]测定化合物的肿瘤细胞抑制活性,分别在 96 孔板上接种 100 μL 浓度约 5×10^4 个/mL 的待测细胞,于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 90% 以上湿度条件下培养 24 h,加入 100 μL 待测化合物溶液,继续培养 72 h 后,向每孔细胞中加入 15 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,4 h 后吸走上清液,再向每孔加入 100 μL DMSO,使其充分溶解。在 490 nm 波长下测定每孔的 OD 值,按下面公式计算肿瘤细胞生长抑制率。阳性对照组为盐酸阿霉素,阴性对照组

为 DMSO,待测化合物设为 5 个浓度梯度,横坐标表示待测化合物浓度,纵坐标表示抑制率,作图求出待测化合物的半数抑制浓度(IC_{50})值。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

对化合物 1~6 和 9~12 进行细胞毒活性测试,结果(表 2)表明化合物 1、5 和 6 对不同的细胞均表现出一定的抑制活性,化合物 4、9、10、11 和 12 对检测的所有细胞均没有细胞毒性($\text{IC}_{50} > 100$)。

表 2 桦褐孔菌中化合物的细胞毒活性

Table 2 Cytotoxicity of compounds from *I. obliquus*

化合物 Compound	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD} (\mu\text{M})$					
	A549	K562	SGC-7901	BEL-7402	Hela	HepG2
1	> 100	> 100	54.7 \pm 3.3	56.5 \pm 4.2	48.8 \pm 0.1	> 100
5	57.1 \pm 1.0	26.1 \pm 0.7	39.2 \pm 0.7	37.6 \pm 0.8	36.3 \pm 2.5	> 100
6	> 100	54.9 \pm 1.5	64.3 \pm 3.4	27.4 \pm 0.6	43.6 \pm 2.1	> 100
盐酸阿霉素 Doxorubicin hydrochloride	< 2.0	1.3 \pm 0.1	< 2.0	3.6 \pm 0.1	< 2.0	12.1 \pm 0.6

注:盐酸阿霉素为阳性对照。

Note: Doxorubicin hydrochloride is positive control.

5 讨论

桦褐孔菌具有悠久的民间药用历史,在临床应用方面疗效显著,在糖尿病、抗肿瘤等药用领域显示

出较好疗效,目前已成为国内外许多学者的研究热点。桦褐孔菌的药理活性主要集中在抗肿瘤,降血糖等方面,对于其他方面的活性研究较少,因此有必

要探索其潜在的其他生物活性,为充分挖掘其潜在价值提供理论支持。本研究对桦褐孔菌乙醇提取物的乙酸乙酯部位的化学成分进行系统研究,共分离鉴定了12个化合物,其中化合物**1**、**10**和**11**为首次从桦褐孔菌中分离得到。活性筛选结果显示,化合物**1**、**5**和**6**对多种肿瘤细胞显示出较好的细胞毒活性,根据文献报道化合物**2**和**3**对多种肿瘤细胞有较好的细胞毒活性^[22,23],佐证了桦褐孔菌的抗肿瘤活性。除此之外,化合物**2**、**3**、**4**和**6**的丁酰胆碱酯酶抑制活性较好,化合物**2**和**3**对乙酰胆碱酯酶抑制活性较好。通过动力学分析阐明了这些化合物与胆碱酯酶的酶抑制机制,化合物**2**和**3**为乙酰胆碱酯酶混合型抑制剂,化合物能与乙酰胆碱酯酶的活性部位结合,也可以与酶和底物的复合物结合从而抑制其活性;而对丁酰胆碱酯酶则属于竞争型抑制,通过与其催化中心的活性位点相结合从而抑制其活性。胆碱酯酶是参与中枢神经系统的一种关键酶,神经退行性疾病如阿尔兹海默病(AD)就与大脑内乙酰胆碱的缺失有关,因此开发针对胆碱酯酶有活性的药物意义重大。本文初步阐释了化合物**2**和**3**抑制胆碱酯酶的作用机制,为桦褐孔菌针对阿尔兹海默病开发利用提供了科学依据。

参考文献

- Huang NL. A mysterious folk medicinal mushroom in Russia-*Inonotus obliquus* [J]. Edible Fungi of China(中国食用菌), 2002, 21(4):7-8.
- Wang C, Chen Z, Pan Y, et al. Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides-chromium(III) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in normal mice [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 108:498-509.
- Ma L, Chen H, Dong P, et al. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* [J]. Food Chem, 2013, 139:503-508.
- Li ZK, Wang FH, Chen B, et al. Review on activity of terpenoids from mushroom [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29:357-369.
- Huang JG, Lv J, Yu XT, et al. Isolation and identification of the antiviral active ingredients of *Inonotus obliquus* [J]. Mod Food Sci Tech(现代食品科技), 2015, 31:175-180.
- Wang W, Zhou ZG, Liu X, et al. Research progress of *Inonotus obliquus* relative with medicine [J]. China Med Equip(中国医学装备), 2017, 14(10):140-145.
- Li Y, Zhang WT, Chen C, et al. Inotodiol protects PC12 cells against injury induced by oxygen and glucose deprivation/restoration through inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. J Appl Biomed, 2018, 16(2):126-132.

- Tang WX, Wu XF, Zhao M, et al. Chemical constituents from inflorescence bracts of *Arctii Fructus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46:958-961.
- Che Y, Li ST, Zhang YQ. Chemical constituents of *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa* roots [J]. Chem Ind Forest Prod(林产化学与工业), 2012, 32(4):83-86.
- Wei XH, Yang SJ, Liang N, et al. Chemical constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston [J]. Molecules, 2013, 18:1325-1336.
- Zhang SJ, Xie YF, Tan YZ, et al. Triterpenoids of *Inonotus obliquus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46:2355-2360.
- Nakamura S, Iwami J, Matsuda H, et al. Absolute stereostructures of inoterpenes A-F from sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. Tetrahedron, 2009, 65:2443-2450.
- Taji S, Yamada T, Tanaka R. ChemInform Abstract: three new lanostane triterpenoids, inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus* [J]. ChemInform, 2008, 39:1513-1524.
- Gao H, Hong K, Zhang X, et al. New steryl esters of fatty acids from the mangrove fungus *Aspergillus awamori* [J]. Helv Chim Acta, 2007, 90:1165-1178.
- Simona H, Sejbal J, Martin D, et al. Chemical constituents of *Stereum subtomentosum* and two other birch-associated basidiomycetes: an interspecies comparative study [J]. Chem Biodivers, 2008, 5:743-750.
- Tu CL, Kyung YK, Inho Y, et al. A new secondary metabolite from Korean traditional herb plant *Hovenia dulcis* [J]. Nat Prod Commun, 2018, 13:451-454.
- Tagashira, Motoyuki, Ohtake, et al. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis* [J]. Planta Med, 1998, 64:555-558.
- Di HH, Xu LX, Chan ZH, et al. Megastigmane sesquiterpenes and phenylpropanols from *Epimedium pseudowushanense* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2015, 23(1):99-102.
- Liu Sk, Que S, Chen W, et al. Chemical constituents from whole plants of *Carduus acanthoides* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38:2334-2337.
- Ellman GL, Courtney KD, Valentino JA, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(2):88-95.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2):55-63.
- Zhao FQ, Xia GY, Chen LX, et al. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities [J]. J Nat Med, 2016, 70:721-730.
- Santos RC, Salvador JAR, Marín S, et al. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity [J]. Bioorgan Med Chem, 2009, 17:6241-6250.