

喙尾琵琶甲中抗肿瘤活性化合物的分离及鉴定

史晓玲¹, 屈瑶¹, 唐会鹏¹, 王耀杰², 李蕾^{1*}¹云南大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650091;²河北医科大学第四医院, 石家庄 050011

摘要:在抗肿瘤活性模型的指导下,采用萃取法、硅胶色谱、凝胶色谱等方法对喙尾琵琶甲全虫 95% 乙醇浸提液中具有抗肿瘤活性的馏分进行分离纯化,并综合运用 HR-EMI-MS、¹H NMR、¹³C NMR 等方法鉴定化合物的结构;采用 MTT 法测定化合物对乳腺癌 MD-A-MB-23 的细胞毒活性。喙尾琵琶甲的抗肿瘤活性集中在乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位,从中分离纯化得到 6 个化合物,分别鉴定为: hydroquinone (**1**)、2-methyl-1,4-benzenediol (**2**)、2-ethyl-1,4-benzenediol (**3**)、hydroxytyrosol (**4**)、1-(3,4-dihydroxyphenyl) isochroman-6,7-diol (**5**) 和 2,5-dihydroxyphenethyl 2-hydroxypropanoate (**6**)。这 6 个活性化合物均为苯酚类,化合物 **4** 是首次从喙尾琵琶甲中分离得到,首次报道化合物 **4**、**5** 和 **6** 对 MD-A-MB-23 细胞有中度的细胞毒活性。化合物 **1**、**2** 和 **3** 表现出较强的活性,化合物 **1** 苯环二位上的氢分别被甲基(化合物 **2**)或乙基(化合物 **3**)取代后,它们对 MD-A-MB-23 细胞的 IC₅₀ 值从 69.86 μg/mL 分别下降到 6.76、2.64 μg/mL。

关键词:喙尾琵琶甲;苯酚类化合物;对苯二酚;2-甲基对苯二酚;2-乙基对苯二酚;抗肿瘤活性

中图分类号:R282.74

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0041-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.007

Isolation and identification of antitumor compounds from *Blaps rynehopetera* Fairmaire

SHI Xiao-ling¹, QU Yao¹, TANG Hui-peng¹, WANG Yao-jie², LI Lei^{1*}¹State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan University, Kunming 650091, China;²Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: The separation procedure was guided by a bioassay using MD-A-MB-23 cells, and the column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 was employed for the purification of compounds from 95% ethyl alcohol extract of *B. Rynehopetera*. Their structures were fully determined based on spectroscopic analysis including HR-EMI-MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The compound cytotoxicity was evaluated in vitro against MD-A-MB-23 cells by MTT method. After anti-tumor-guide purification, six active compounds with antitumor activity were isolated from ethyl acetate fraction of 95% ethyl alcohol extract of *B. Rynehopetera*. These compounds were identified as hydroquinone (**1**), 2-methyl-1,4-benzenediol (**2**), 2-ethyl-1,4-benzenediol (**3**), hydroxytyrosol (**4**), 1-(3,4-dihydroxyphenyl) isochroman-6,7-diol (**5**) and 2,5-dihydroxyphenethyl 2-hydroxypropanoate (**6**). The six active compounds are all phenolic derivatives. It is for the first time that compound **4** was isolated from the *B. Rynehopetera* and compounds **4**, **5** and **6** showed the moderate cytotoxic activity against MD-A-MB-23 cells. Compounds **1**, **2** and **3** showed strong activities. The hydrogen at the di-position of the benzene ring of compound **1** was replaced respectively by methyl (**2**) or ethyl (**3**), and their IC₅₀ of MD-A-MB-23 cells decreased from 69.86 μg/mL to 6.76 and 2.64 μg/mL.

Key words: *Blaps rynehopetera* Fairmaire; phenolic derivative; hydroquinone; 2-methyl-1,4-benzenediol; 2-ethyl-1,4-benzenediol; antitumor activity

喙尾琵琶甲 (*Blaps rynehopetera* Fairmaire), 属鞘

翅目 (Coleoptera) 拟步甲科 (Tenebrionidae) 琵琶甲族 (Blaptini) 琵琶甲属 (*Blaps*)。喙尾琵琶甲是一种民间常用的药用昆虫,此外还是我国少数民族彝族的传统医药用药,多用于治疗各种疑难杂症,包括抗

收稿日期:2020-05-27 接受日期:2020-07-20

基金项目:国家自然科学基金(31660538)

* 通信作者 Tel:86-018087548253; E-mail:leelei@ynu.edu.cn

菌、消炎、解毒和消除肿块等^[14]。根据调查研究表明,喙尾琵琶甲在云南分布非常广且具有广泛的药用价值。文献报道表明喙尾琵琶甲的提取物具有多种生物活性。1999年, Li等^[5,6]发现喙尾琵琶甲的乙醚提取液有抗菌活性,分离出的化合物 2-ethyl-1,4-benzenediol、2-methyl-1,4-benzenediol 和 hydroquinone 对大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 等有抑菌作用。Cui等^[7,8]研究了喙尾琵琶甲的不同极性提取物的体外抗氧化活性,发现在氯仿萃取相和乙酸乙酯萃取相部分具有较好的抗氧化活性。Zheng等^[9]人对从喙尾琵琶甲分离得到的化合物进行了抗 EV71(肠道病毒)、结核病、COX-2(环氧酶)、Rock1/2(卷曲螺旋蛋白激酶)和 JAK3(Janus 激酶 3)的活性测试来探索生物活性,结果发现其化合物对于 COX-2、ROCK1、ROCK2 和 JAK3 都有抑制活性, Yan等^[10]从喙尾琵琶甲中分离的所有化合物的抗炎活性均采用环氧合酶-1(COX-1)和 COX-2 抑制试验进行评价,其结果显示这些化合物都对 COX-2 的生物活性是中等的,抑制 COX-2 而不是 COX-1 有利于致病性炎症。2013年, Yan等^[11]从喙尾琵琶甲中分离得到可以抑制 14-3-3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPIs)的化合物。全球范围内,恶性肿瘤都是非常严重的公共卫生问

题,乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌三种恶性肿瘤高居发病率和死亡率的榜首,对恶性肿瘤的研究是我们将其彻底扼杀的前提^[12,13]。相比微生物来源和植物来源的天然抗肿瘤药物的研究,动物来源的天然抗肿瘤药物研究相对较少。在民间用药偏方中,有吞噬活体喙尾琵琶甲作为肿瘤治疗的方法。文献报道琵琶甲粗提物和粗蛋白体外实验显示其具有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[14-16]。Xiao等^[17]研究者报道了喙尾琵琶甲的防御性分泌物 hydroquinone、p-benzoquinone、2-methyl-p-benzoquinone 和 2-ethyl-p-benzoquinone,它们对肿瘤细胞 AGS(人胃癌细胞)、Coca-2(人结肠腺癌细胞)、HepG2(肝癌细胞)、U251(人胶质瘤细胞)和 Bel-7401(肝癌细胞)都有抑制活性。已有研究者从全虫的正丁醇萃取部位分离出有效抗肿瘤化合物^[18,19]。为了阐明喙尾琵琶甲抗肿瘤活性成分,本文作者对其乙醇提取物进行乳腺癌 MD-A-MB-23 细胞活性跟踪分离,发现乙酸乙酯萃取相具有抗肿瘤活性,从乙酸乙酯萃取相分离纯化得到 6 个化合物,通过光谱分析方法鉴定出化合物的结构,化合物 4 是首次从喙尾琵琶甲中分离出来。化合物 1、2、3、4、5 和 6 对于肿瘤细胞有抑制活性,且均为苯酚类衍生物。

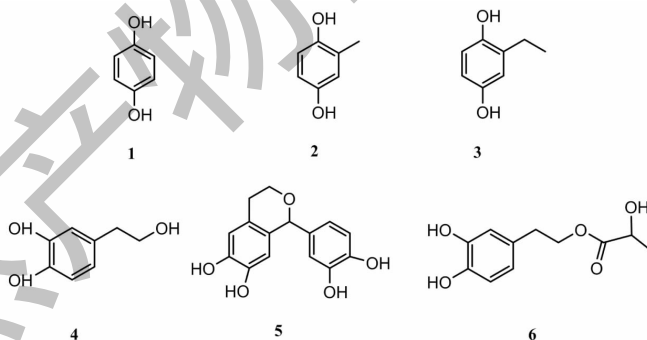


图 1 化合物 1~6 的化学结构

Fig. 1 The chemical structures of compounds 1-6

1 材料方法

1.1 仪器与材料

柱层析硅胶(青岛海洋化工厂,200~300目);柱层析凝胶(Pharmacia, Sephadex LH-20);薄层层析(青岛海洋化工厂,正相硅胶板);旋转蒸发仪(Rotavapor R-215型);高分辨质谱仪(Finnigan LCQ-Advantage型);超导核磁共振仪(Bruker DRX-500和 Bruker III-600 NMR型)。

喙尾琵琶甲:购买自云南省昆明市景星花鸟市场,4 kg,共计 947 只。

肿瘤细胞株:在抗肿瘤活性测试中选用乳腺癌 MD-A-MB-23 细胞。

1.2 提取与分离

本实验利用 95% 浓度的酒精对喙尾琵琶甲活体进行浸泡提取,浸提 5 次,每次一周,合并提取液,减压浓缩得浸提液,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁

醇萃取得到石油醚部位(9.2 g),乙酸乙酯部位(10.8 g),正丁醇部位(15.3 g),活性测试实验结果如图1所示,乙酸乙酯相萃取物对于MD-A-MB-231

肿瘤细胞有抑制作用,表明抗癌活性集中在乙酸乙酯部位。我们在活性模型的指导下,分离乙酸乙酯部位。

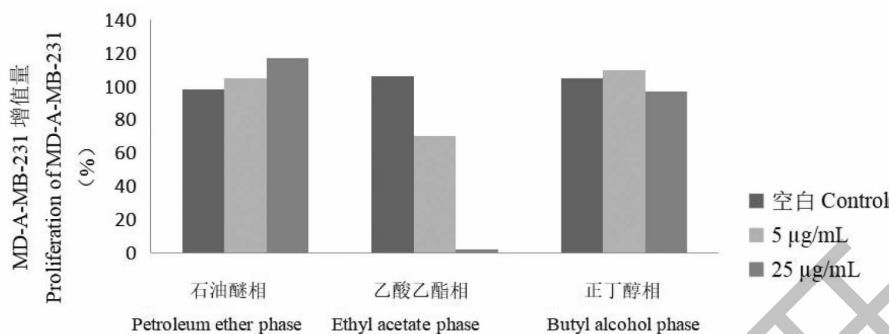


图2 喙尾琵琶甲萃取物对于MD-A-MB-231肿瘤细胞增殖量的影响

Fig. 2 The effect of the extract of *B. rynehoptera* on the proliferation of MD-A-MB-231 tumor cells

取乙酸乙酯部位15.0 g,经硅胶柱色谱(VLC)分离,用氯仿-丙酮(30:1→1:1)进行梯度洗脱,得到8个组份,合并后得到4个组份(Fr. A~D),抗肿瘤活性组份存在组份B中。Fr. B经硅胶柱色谱(二氯甲烷-丙酮80:1→1:1)梯度洗脱,得到四个组分(Fr. B1~B4),活性检测表明组份B2~B4中有抗肿瘤活性,对活性组份进行分离得到具有抗肿瘤活性的化合物。Fr. B2经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮20:1~1:1)洗脱,得到四个组分(Fr. B2.1~Fr. B2.4)。Fr. B2.1在凝胶柱上依次分别用甲醇和丙酮反复纯化,得到了化合物4(2.0 mg),Fr. B2.2经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮30:1→1:1)反复纯化得到化合物5(1.2 mg)。Fr. B3在硅胶柱上(石油醚-乙酸乙酯15:1→1:1)梯度洗脱,得到三个组份(Fr. B3.1~Fr. B3.3)。Fr. B3.1在凝胶柱上用丙酮纯化得到化合物6(1.8 mg)。Fr. B4在凝胶柱用丙酮反复纯化得到化合物1(2.2 mg),经硅胶柱色谱(氯仿:甲醇15:1→1:1)反复纯化得到化合物2(9.2 mg)和化合物3(6.3 mg)。

2 实验结果

2.1 化合物结构鉴定

化合物1 白色针棱晶体;在空气中久置会变为黑色固体,ESI-MS: m/z 133 [M + Na]⁺,¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ :6.60和8.61;¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ :115.4,149.7。以上数据与文献^[1]报道数据符合,故鉴定化合物1为hydroquinone。

化合物2 白色片状晶体;ESI-MS: m/z 147 [M + Na]⁺,¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ :2.18(3H, s),6.47(1H, dd, J = 3.0, 8.5 Hz),6.64(1H, d, J

= 3 Hz),6.52(1H, d, J = 8.5 Hz);¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ :15.0(C-7),112.5(C-3),114.9(C-5),117.0(C-6),125.1(C-2),147.9(C-4),149.6(C-1)。以上数据与文献^[20]报道数据相符合,故鉴定化合物2为2-methyl-1,4-benzenediol。

化合物3 浅黄色晶体;ESI-MS: m/z 161 [M + Na]⁺,¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ :1.08(3H, t, J = 7.5 Hz),2.48(2H, q, J = 7.5 Hz),6.40(1H, dd, J = 2.9, 8.5 Hz),6.50(1H, d, J = 2.9 Hz),6.53(1H, d, J = 8.5 Hz);¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ :149.8(C-1),125.3(C-2),115.4(C-3),147.1(C-4),115.2(C-5),115.6(C-6),22.8(CH₂),13.6(CH₃)。以上数据与文献^[21]数据相符合,故鉴定化合物3为2-methyl-1,4-benzenediol。

化合物4 棕色黏液;ESI-MS: m/z 155 [M + Na]⁺,¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ :6.70(2H, d, J = 8.0 Hz),6.67(1H, d, J = 1.9 Hz),6.55(1H, d, J = 1.9 Hz),3.70(2H, t, J = 14.5 Hz),2.69(2H, t, J = 7.3, 14.5 Hz);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ :144.7(C-1),143.2(C-2),130.4(C-3),119.8(C-4),115.7(C-5),114.92(C-6)。以上数据与文献^[22]报道数据相符合,故鉴定化合物4为hydroxytyrosol。

化合物5 黄色固体;ESI-MS: m/z 275 [M + Na]⁺,¹H NMR(600 MHz, (CD₃)₂CO) δ :5.41(1H, s),4.04(1H, m),3.86(1H, m),2.96(1H, m),2.62(1H, m),6.61(1H, s),6.19(1H, s),6.68(1H, d, J = 1.9 Hz),6.80(1H, d, J = 8.0 Hz),6.73(1H, d,

$J = 1.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 78.7 (C-1), 63.2 (C-2), 29.6 (C-3), 125.1 (C-4), 115.8 (C-5), 142.9 (C-6), 144.6 (C-7), 113.4 (C-8), 129.4 (C-9), 135.1 (C-10), 114.5 (C-11), 143.8 (C-12), 146.2 (C-13), 114.7 (C-14), 120.5 (C-15)。以上数据与文献^[23]报道数据相符合,故鉴定化合物**5**为1-(3,4-dihydroxyphenyl) isochroman-6,7-diol。

化合物6 黄色固体;ESI-MS: m/z 249 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.71 (1H, s), 6.70 (1H, s), 6.57 (1H, s), 4.31 (3H, m), 2.82 (2H, s), 1.35 (3H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 143.6 (C-1), 129.2 (C-2), 115.6 (C-3), 144.9 (C-4), 115.0 (C-5), 119.9 (C-6), 19.2 (C-7), 66.5 (C-8), 175.0 (C-9), 65.5 (C-10), 34.0 (C-11)。以上数据与文献^[24]报道数据相符合,故鉴定化合物**6**为2,5-dihydroxyphenethyl 2-hydroxypropanoate。

2.2 体外抗肿瘤活性

采用MTT法^[25]测试了乙酸乙酯相萃取物、石油醚相萃取物、正丁醇萃取物和目标化合物对MD-A-MB-23肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性。以顺铂作为阳性对照(IC_{50} 值为 $20.23 \pm 1.32 \mu\text{M}$)。实验结果显示,化合物**4**、**5**和**6**对乳腺癌MD-A-MB-231细胞有一定的细胞毒活性(IC_{50} 均大于 $40 \mu\text{M}$),化合物**1**、**2**和**3**活性较好,它们的 IC_{50} 值分别是69.86、6.76、2.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,具有较好的抑制肿瘤细胞增殖的活性。

3 讨论

在分离琵琶甲全虫抗癌活性化合物的过程中,我们都是以抗癌活性模型为指导,分离活性化合物,从实验结果可以看出所有分离到的抗癌活性物质均为苯酚类化合物,但化合物**1**、**2**和**3**的活性强于化合物**4**、**5**和**6**。有研究发现苯酚类衍生物是具有细胞毒性和抗肿瘤活性,对苯二酚部分的环的芳香化和萘烯部分的催化加氢有助于增强细胞毒性^[26]。已有研究者从琵琶甲中分离出了很多苯酚类衍生物^[9,21,27],可见在琵琶甲中存在这类物质,但是他们没有报道这些物质的抗癌活性。我们的研究还表明当化合物**1**苯环二位上的氢分别被甲基(化合物**2**)或乙基(化合物**3**)取代后,对乳腺癌MD-A-MB-231细胞的 IC_{50} 值从69.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别下降到6.76、2.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可见苯环2位的取代对细胞的毒性影响是很大的,这是一个非常有意义的结构和活性变化的规律,值得后续研究探索。本文首次报道喙尾

琵琶甲全虫中的苯酚类物质可能是其抗肿瘤活性的物质基础,也为开发这种昆虫用于癌症的治疗提供了一定的科学依据。

参考文献

- Zhang LS, Xia CL, Yang YS, et al. Progress on studies of *Blaps rynchopetera* Fairmaire of the Yi nationality [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2009, 20: 3113-3114.
- Shan H, Luo Q, Xiao H. The Polyphenols content analysis of *Blaps Rynchopetera* Fairmaire [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2016, 27: 532-534.
- Ratcliffe NA, Mello CB, Garcia ES, et al. Insect natural products and processes: new treatments for human disease [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2011, 41: 747-769.
- Zhang CX, Tang XD, Cheng JA. The utilization and industrialization of insect resources in China [J]. Entomol Res, 2008, 38(1): 38-47.
- Li L, Luo CY, Liu Y. Studies on antibiotic active constituents of Yunnan *Balaps japonensis yunnanensis* [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2001, 32(3): 197-199.
- Li L, Chi SQ, Li WP, et al. Antibiotic Activity of Constituent of *Balaps japonensis yunnanensis* [J]. J Yunnan Univ (云南大学学报), 2000, 22: 386-388.
- Yan YM, Qing L, Dong XP, et al. Chemical Constituents from the insect *Blaps japonensis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1712-1714.
- Cui WB, Qian JF, Luo JR, et al. Antioxidant activity of solvent extracts of *Blaps rynchopetera* Fairmaire *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2013, 24: 1566-1567.
- Zheng T, Yan YM, Tu ZC, et al. Phenolic derivatives from *Blaps japonensis* and their biological evaluation [J]. Fitoterapia, 2017, 120: 58-60.
- Yan YM, Li LJ, Qin XC, et al. Compounds from the insect *Blaps japonensis* with COX-1 and COX-2 inhibitory activities [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25: 2469-2472.
- Yan YM, Dai HQ, Du YH, et al. Identification of blapsins A and B as potent small-molecule 14-3-3 inhibitors from the insect *Blaps japonensis* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 4179-4181.
- Rebecca LS, Lindsey AT, Ahmedin J. Global Cancer statistics 2018: CLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. Ca-Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. Ca-Cancer J Clin, 2010, 60: 277-300.

- 14 Geng D, Wang CM, Xu XL, et al. Experimental study on the anti-tumor activity of the extract of Yunnan *Balaps japonensis yunnanensis* [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2011, 34(1): 95-99.
- 15 Tian JX, Zhou YF, Yang HH, et al. Experimental study on induction of apoptosis by *Blaps femoralis* Fischer-Waldheim in cell line HeLa [J]. Med Res Edu (医学研究与教育), 2011, 28(3): 7-11.
- 16 Geng D, Wang CM, Yuan Y. Extracts of Yunnan *Balaps japonensis yunnanensis* inhibited the HeLa cell proliferation and induced its apoptosis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2012, 27: 2969-2971.
- 17 Xiao H, Dong JW, Zhou DJ, et al. Cytotoxicity of the defensive secretion from the medicinal insect *Blaps rynchopetera* [J]. Molecules, 2018, 23(1): 10-13.
- 18 Yan YM, Lv Q, Dong X P, et al. Chemical constituents from the insect *Blaps japonensis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1712-1714.
- 19 Yan YM, Dong XP, Li Y, et al. Chemical constituents in Yi Medicine *Blaps japonensis* and their cytotoxic activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2013, 44(3): 269-271.
- 20 Luo CY, Liu Y, Li L, et al. Assay of inorganic elements and aminoacids in *Blaps japonensis yunnanensis* Mars [J]. Amino Acids Biotic Resour, 1999, 2(3): 30-40.
- 21 Luo JR, He JB, Zhang Z, et al. The study of the chemical constituents of medicinal insects *Blaps rynchopetera* Fairmaire [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2010, 32: 2013-2014.
- 22 Parkl CH, Kim KH, Lee IK, et al. Phenolic constituents of *Acorus gramineus* [J]. Arch Pharm Res, 2011, 8: 1289-1296.
- 23 Yan YM, Dai HQ, Du YH, et al. Identification of blapsins A and B as potent small-molecule 14-3-3 inhibitors from the insect *Blaps japonensis* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22: 4179-4181.
- 24 Xiao H, Guo NN, Hong X, et al. Preparation method and medical use of a hydroxypropionic acid compound (一个羟基丙酸化合物及其制备方法和医药用途): CN106905159A [P]. 2017-06-30.
- 25 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.
- 26 Molinari A, Oliva A, Miguel del Corral JM, et al. Cytotoxic-antineoplastic activity of acetyl derivatives of prenylnaphtho-hydroquinone [J]. IL Farmaco, 2014, 59: 651-656.
- 27 Li WL, Xie JL. The Study of the Chemical constituents of *Blaps japonensis yunnanensis* [J]. J Kunming Teach Coll (昆明师范高等专科学校学报), 2000, 22(4): 18-19.

(上接第 66 页)

- 17 Okamoto T. NF-kappa B and rheumatic diseases [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2006, 6: 359-372.
- 18 Monaco C, Terrando N, Midwood KS. Toll-like receptor signaling: common pathways that drive cardiovascular disease and rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011, 63: 500-511.
- 19 Sun MH, Wu H, Bu YH et al. Research progress of signaling pathways involved in expression of hypoxia-inducible factor-1 α in rheumatoid arthritis [J]. Chin Pharm Bull (中国药理学通报), 2019, 35: 1197-1202.
- 20 Walker JG, Smith MD. The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis [J]. J Rheumatol, 2005, 32: 1650-1653.