

牛角瓜茎的化学成分及其细胞毒活性研究

于 森, 戴好富, 黄圣卓, 冉红玲, 盖翠娟, 蔡彩虹, 梅文莉*, 王 昊*

中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室;海南热带农业资源研究院,海口 571101

摘要:为了研究牛角瓜茎的化学成分及其细胞毒活性,采用硅胶、Sephadex LH-20 等多种色谱分离技术从牛角瓜茎乙醇提取物中分离得到 10 个化合物,通过质谱和核磁共振等波谱技术对其结构进行鉴定,分别为(-)-松脂醇-4'-O- β -D-葡萄糖苷(1)、(+)-pinoresinol-4-O-[6''-O-vanillyl] - β -D-glucopyranoside(2)、(-)-jatrorrhizolignan B(3)、(+)-(7R,7'R,7''S,7'''S,8S,8'S,8''S,8'''S)-4'',4'''-dihydroxy-3',3'',3''',5,5'-hexamethoxy-7,9';7',9-diepoxy-4,8'';4',8'''-bisoxyl-8,8'-dineolignan-7'',7''',9'',9'''-tetraol(4)、弗如糖苷(5)、(+)-dehydrovomifoliol(6)、3-吲哚甲酸(7)、2,3-二甲氧基苯甲酸(8)、对羟基苯甲酸(9)、香草酸(10)。其中化合物 1,3,4 和 6~8 为首次从牛角瓜中分离得到。采用 MTT 法测试化合物 1~10 对慢性髓原白血病细胞 K562、人胃癌细胞 SGC-7901、人肺癌细胞 A549 和宫颈癌细胞 HeLa 的体外细胞毒活性,结果显示化合物 4 和 5 具有不同程度的细胞毒活性,IC₅₀ 值范围分别为 12.37~49.29 和 0.29~0.98 μ M。

关键词:牛角瓜; 化学成分; 细胞毒活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)9-1513-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.009

Study on chemical constituents and their cytotoxic activities from the stems of *Calotropis gigantea*

YU Miao, DAI Hao-fu, HUANG Sheng-zhuo,
RAN Hong-ling, GAI Cui-juan, CAI Cai-hong, MEI Wen-li*, WANG Hao*

Hainan Key Laboratory of Research and Development of Natural Product from Li Folk Medicine, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; Hainan Academy of Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101, China

Abstract: To study chemical constituents and their cytotoxic activity from the stems of *Calotropis gigantea*, ten compounds were isolated from the ethanol extract of *C. gigantea* by using various chromatographic techniques including silica gel, Sephadex LH-20, etc. Their structures were elucidated on the basis of spectroscopic data including ¹H NMR, ¹³C NMR and MS analysis as (-)-pinoresinol-4-O- β -D-glucoside (1), (+)-pinoresinol 4-O-[6''-O-vanillyl] - β -D-glucopyranoside (2), (-)-jatrorrhizolignan B (3), (+)-(7R,7'R,7''S,7'''S,8S,8'S,8''S,8'''S)-4'',4'''-dihydroxy-3',3'',3''',5,5'-hexamethoxy-7,9';7',9-diepoxy-4,8'';4',8'''-bisoxyl-8,8'-dineolignan-7'',7''',9'',9'''-tetraol (4), frugoside (5), (+)-dehydrovomifoliol (6), 1H-indole-3-carboxylic acid (7), 2,3-dimethoxybenzoic acid (8), p-hydroxybenzoic acid (9), and vanillic acid (10). Compounds 1,3,4 and 6~8 were identified from this plant for the first time. All isolated compounds were evaluated *in vitro* by MTT assay against chronic myeloid leukemia cell K562, human gastric cancer cell SGC-7901, human lung cancer cell A549 and human cervical cancer cell line HeLa. Compounds 4 and 5 exhibited cytotoxic activity against five human cancer cell lines with IC₅₀ values ranging from 12.37 to 49.29 μ M and from 0.29 to 0.98 μ M, respectively.

Key words: *Calotropis gigantea*; chemical constituent; cytotoxic activity

收稿日期:2021-01-25 接受日期:2021-06-02

基金项目:海南省重点研发计划(ZDYF2019217);中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630052017002);财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21)

*通信作者 E-mail: wanghao@itbb.org.cn, meiwenli@itbb.org.cn

牛角瓜(*Calotropis gigantea*(L.) Dry. ex Ait. f.)又名断肠草、五狗卧花心,为萝藦科(Asclepiadaceae)牛角瓜属(*Calotropis*)植物,主要分布在中国南

部、印度、越南、斯里兰卡和缅甸等地，在我国云南、海南、广东和四川等地均有分布，生长于低海拔向阳山坡、旷野地及海边^[1]。牛角瓜具有祛痰平喘功效、抗菌、抗氧化、消炎和解毒等作用^[2]。牛角瓜花具有镇痛作用^[3]；茎干具有保肝作用^[4]；叶具有抗腹泻作用^[5]；乳汁具有促进伤口愈合及抗菌的功效^[6,7]。现代研究表明牛角瓜中含有多种化学成分，包括强心苷类、甾体类、三萜类及黄酮类等成分^[8-11]。由于其显著的抗肿瘤活性，诸多学者已对牛角瓜化学成分进行分离纯化和结构鉴定。为了更好的研究牛角瓜化学物质基础，进一步完善该植物的生物活性内容，本课题对牛角瓜茎的化学成分及其细胞毒活性进行研究，采用硅胶、Sephadex LH-20 等多种色谱分离技术对牛角瓜茎乙醇提取物的乙酸乙酯部位进行分离，并采用四甲基唑蓝（MTT）法测定化合物对 4 种肿瘤细胞的体外细胞毒活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker AV-500 型超导核磁共振波谱仪，TMS 为内标（德国 Bruker 公司）；Autospec 300 质谱仪（英国 VG 公司）；高效液相色谱仪（Agilent 1260）（美国安捷伦科技有限公司）；旋转蒸发仪（Heidolph Labo-rota）；核磁管 TA1008-200（河流科技有限公司）；ZJH-C1109C 超净工作（上海智诚分析仪器制造有限公司）；HHB11360-S CO₂ 培养箱（上海跃进医疗器械厂）；Sephadex LH-20（德国 Merck 公司）；C₁₈ 反相硅胶（日本 Fuji 公司）；柱层析硅胶 G（200~300、60~80 目）（青岛海洋化工厂）；薄层层析硅胶 H（青岛海洋化工厂）；甲醇、乙腈为色谱纯（天津市科密欧有限公司）；水为超纯水；10% 硫酸乙醇显色剂。

1.2 材料

牛角瓜于 2019 年 8 月采自海南省海口市，并经中国热带农业科学院热带生物技术研究所黄圣卓博士鉴定为萝藦科（Asclepiadaceae）牛角瓜属（*Calotropis*）植物牛角瓜（*Calotropis gigantea*），凭证标本（WANG202001），保存于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 提取与分离

牛角瓜茎（5.2 kg），干燥粉碎后用 95% 乙醇浸泡提取 3 次，提取液减压浓缩得到乙醇提取物（219.7 g）。将提取物分散于水中成悬浊液，依次用

石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取，得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物（14.1 g）和正丁醇萃取物。乙酸乙酯萃取物经正相硅胶柱色谱，以石油醚-乙酸乙酯（15:1→0:1）、丙酮梯度洗脱，得到 14 个流份（Fr. 1~Fr. 14）。Fr. 10 经反相硅胶柱色谱（甲醇-水 3:7→1:0）得到 13 个流份（Fr. 10.1~Fr. 10.13），其中流份 Fr. 10.8（633.6 mg）经减压硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（甲醇）分离得到化合物 1（2.0 mg）、2（5.9 mg）、4（22.0 mg）、5（402.7 mg）；流份 Fr. 10.6（14.5 mg）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（甲醇）分离得到化合物 3（5.1 mg）。流份 Fr. 2（964.4 mg）经反相硅胶柱色谱（甲醇-水 3:7→1:0）得到 6 个流份（Fr. 2.1~Fr. 2.6），其中流份 Fr. 2.1（87.7 mg）经减压硅胶柱色谱分离得到化合物 9（4.1 mg）和 10（5.0 mg）；流份 Fr. 2.2（9.0 mg）通过结晶得到化合物 8（5.4 mg），流份 Fr. 2.3（27 mg）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（甲醇）分离得到化合物 6（15.0 mg），Fr. 2.4（11.3 mg）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（甲醇）分离得到化合物 7（5.4 mg）。

1.3.2 活性测试

采用 MTT 法测试化合物 1~10 对慢性髓原白血病细胞 K562、人胃癌细胞 SGC-7901、人肺癌细胞 A549 和人宫颈癌细胞 HeLa 的体外细胞毒活性。化合物分别用 DMSO 溶解后配成 20 μmol/L 储备液，临用前稀释到适合的浓度。将 4 种人体肿瘤细胞制成单细胞悬浮液，接种于 96 孔板上，并设空白组、对照组以及实验组，每组设 3 个平行孔，实验组为 0.078、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μmol/L 的含药样品溶液，在 96 孔板中直接加入各个样品溶液 10 μL，连续培养 72 h 后。再加入 15 μL 配制好的 MTT 溶液（5 mg/mL），在 CO₂ 恒温培养箱中恒温培养，孵育后使用酶标仪测量其在波长为 490 nm 下的吸光度（A），并计算生长抑制率及 IC₅₀ 值。盐酸阿霉素为阳性对照。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

化合物 1 白色粉末；C₂₆H₃₂O₁₁；ESI-MS: *m/z* 521.1 [M + H]⁺；¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.15 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.03 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.95 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 6.82 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5')，

4.88(1H, m, H-1''), 4.77(1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-7'), 4.71(1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-7), 4.25(2H, m, H-9a, 9'a), 3.90(1H, m, H-6'' a), 3.87(3H, s, 3-OCH₃), 3.86(3H, s, 3'-OCH₃), 3.88(2H, m, H-9b, 9'b), 3.69(1H, m, H-6'' b), 3.49(1H, m, H-2''), 3.45(1H, m, H-3''), 3.40(1H, m, H-4''), 3.39(1H, m, H-5''), 3.15(2H, m, H-8, 8'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 137.5(C-1), 111.6(C-2), 151.0(C-3), 147.5(C-4), 118.0(C-5), 119.8(C-6), 87.5(C-7), 55.3(C-8), 72.7(C-9), 133.8(C-1'), 111.0(C-2'), 147.3(C-3'), 149.1(C-4'), 116.1(C-5'), 120.0(C-6'), 87.9(C-7'), 55.8(C-8'), 72.7(C-9'), 102.8(C-1''), 74.8(C-2''), 77.8(C-3''), 71.3(C-4''), 78.2(C-5''), 62.5(C-6''), 56.7(3-OCH₃), 56.4(3'-OCH₃)。以上数据与文献报道对照基本一致^[12],故鉴定化合物**1**为(-)-松脂醇-4'-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物2 棕色粉末; C₃₄H₃₈O₁₄; ESI-MS: m/z 671.6 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 7.58(1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6''), 7.54(1H, br s, H-2''), 6.99(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.98(1H, s, H-2'), 6.97(1H, br s, H-2), 6.88(1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.82(1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-6'), 6.78(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 6.45(1H, br d, $J = 8.3$ Hz, H-6), 4.87(1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 4.69(2H, m, H-7, 7'), 4.66(1H, dd, $J = 11.7, 2.2$ Hz, H-6'' a), 4.48(1H, dd, $J = 11.7, 8.2$ Hz, H-6'' b), 4.26(1H, dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, H-9a), 4.15(1H, dd, $J = 9.0, 7.9$ Hz, H-9'a), 3.89(3H, s, 3-OCH₃), 3.84(1H, m, H-9b), 3.82(3H, s, 3'-OCH₃), 3.82(3H, s, 3'''-OCH₃), 3.82(1H, m, H-9'b), 3.78(1H, m, H-5''), 3.54(2H, m, H-2'', 3''), 3.43(1H, dd, $J = 9.2, 8.9$ Hz, H-4''), 3.10(1H, m, H-8'), 3.00(1H, m, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 137.3(C-1), 111.7(C-2), 150.7(C-3), 147.1(C-4), 117.7(C-5), 119.3(C-6), 87.0(C-7), 55.4(C-8), 72.8(C-9), 133.7(C-1'), 111.1(C-2'), 149.1(C-3'), 144.3(C-4'), 116.0(C-5'), 120.2(C-6'), 87.6(C-7'), 55.3(C-8'), 72.5(C-9'), 102.4(C-1''), 74.8(C-2''), 77.8(C-3''), 72.2(C-4''), 75.6(C-5''), 65.0(C-6''), 122.5(C-1'''), 113.9(C-2'''), 148.8(C-3'''), 153.1(C-4'''), 116.1(C-5'''), 125.3(C-6'''), 167.8(C-7'''), 56.7(3-

OCH₃), 56.5(3'-OCH₃), 56.5(3'''-OCH₃)。以上数据与文献报道对照基本一致^[13],故鉴定化合物**2**为(+)-pinoresinol-4-O-[6''-O-vanillyl]- β -D-glucopyranoside。

化合物3 黄色油状; C₃₁H₃₆O₁₁; ESI-MS: m/z 607.2 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.97(2H, br s, H-2, 6), 6.97(2H, br s, H-2', 6'), 6.96(1H, br s, H-2''), 6.77(1H, dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, H-6''), 6.72(1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5''), 6.55(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7'), 6.24(1H, dt, $J = 15.8, 6.0$ Hz, H-8'), 5.58(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-7), 4.90(1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-7''), 4.25(1H, dd, $J = 8.9, 5.1$ Hz, H-8''), 4.20(2H, d, $J = 6.0$ Hz, H-9'), 3.92(1H, m, H-9'' a), 3.91(3H, s, 5-OCH₃), 3.88(2H, d, $J = 5.2$ Hz, H-9), 3.82(3H, s, 5'-OCH₃), 3.81(3H, s, 3-OCH₃), 3.79(3H, s, 3'-OCH₃), 3.59(1H, m, H-9'' b), 3.48(H, m, H-8); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 139.4(C-1), 103.9(C-2, 6), 154.6(C-3, 5), 136.3(C-4), 88.9(C-7), 55.5(C-8), 64.9(C-9), 132.8(C-1'), 116.5(C-2'), 130.0(C-3'), 149.1(C-4'), 145.5(C-5'), 112.1(C-6'), 131.9(C-7'), 127.7(C-8'), 63.8(C-9'), 133.8(C-1''), 111.3(C-2''), 148.6(C-3''), 146.8(C-4''), 115.6(C-5''), 120.7(C-6''), 74.0(C-7''), 87.3(C-8''), 61.6(C-9''), 56.3(3-OCH₃), 56.3(3'-OCH₃), 56.6(5-OCH₃), 56.8(5'-OCH₃)。以上数据与文献报道对照基本一致^[14],故鉴定化合物**3**为(-)-jatointelignan B。

化合物4 棕色粉末; C₄₂H₅₀O₁₆; ESI-MS: m/z 833.2 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_{H} : 6.94(2H, br s, H-2'', H-2'''), 6.74(2H, br d, $J = 8.1$ Hz, H-6'', H-6'''), 6.69(2H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'', H-5'''), 6.65(4H, s, H-2, H-6, H-2', H-6'), 4.91(2H, br s, H-7'', H-7'''), 4.71(2H, d, $J = 2.5$ Hz, H-7, H-7'), 4.23(2H, m, H-9b, 9'b), 3.91(2H, m, H-8'', H-8'''), 3.87(2H, m, H-9'' a, 9''' a), 3.86(2H, m, H-9a, 9'a), 3.83(12H, s, 3''-OCH₃, 3'''-OCH₃, 5''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 3.82(12H, s, 3-OCH₃, 3'-OCH₃, 5-OCH₃, 5'-OCH₃), 3.55(2H, m, H-9'' b, 9''' b), 3.08(4H, m, H-8, H-8'); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_{C} : 138.8(C-1, C-1'), 104.2(C-2, C-6, C-2', C-6'), 154.5(C-3, C-5, C-3', C-5'), 136.1

(C-4, C-4'), 87.2 (C-7, C-7'), 55.6 (C-8, C-8'), 73.0 (C-9, C-9'), 133.8 (C-1'', C-1'''), 111.3 (C-2'', C-2'''), 148.6 (C-3'', C-3'''), 146.8 (C-4'', C-4'''), 115.6 (C-5'', C-5'''), 120.7 (C-6'', C-6'''), 74.0 (C-7'', C-7'''), 87.2 (C-8'', C-8'''), 61.7 (C-9'', C-9'''), 56.7 (3-OCH₃, 3'-OCH₃, 5-OCH₃, 5'-OCH₃), 56.3 (3''-OCH₃, 3'''-OCH₃, 5''-OCH₃, 5'''-OCH₃)。以上数据与文献报道对照基本一致^[15],故鉴定化合物**4**为(+)-(7R,7'R,7''S,7'''S,8S,8'S,8''S,8'''S)-4'',4'''-dihydroxy-3,3',3'',3''',5,5'-hexamethoxy-7,9';7',9-diepoxy-4,8'';4',8'''-bisoxo-8,8'-dineolignan-7'',7''',9'',9'''-tetraol。

化合物5 白色粉末; C₂₉H₄₄O₉; ESI-MS: *m/z* 559.2 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ_H: 5.90 (1H, s, H-22), 4.97 (1H, d, *J* = 18.3 Hz, H-21a), 4.88 (1H, d, *J* = 18.3 Hz, H-21b), 4.53 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, H-1'), 3.51 (1H, m, H-3), 3.79 (1H, m, H-3'), 3.64 (1H, m, H-19a), 3.53 (1H, m, H-5'), 3.49 (1H, m, H-19b), 3.06 (1H, m, H-2'), 2.96 (1H, m, H-4'), 2.70 (1H, dd, *J* = 9.0, 5.3 Hz, H-17), 2.19 (1H, d, *J* = 12.8 Hz, H-1a), 1.99 (1H, m, H-16a), 1.98 (1H, m, H-7a), 1.94 (1H, m, H-15a), 1.76 (1H, m, H-7b), 1.68 (1H, m, H-2a), 1.62 (1H, m, H-4a), 1.62 (1H, m, H-8), 1.56 (1H, m, H-15b), 1.54 (1H, m, H-11a), 1.45 (1H, m, H-11b), 1.40 (1H, m, H-2b), 1.36 (1H, m, H-12a), 1.28 (1H, m, H-4b), 1.24 (1H, m, H-12b), 1.20 (1H, m, H-6a), 1.09 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, H-6'), 1.09 (1H, m, H-6b), 1.08 (1H, m, H-5), 0.94 (1H, m, H-16b), 0.86 (1H, td, *J* = 12.0, 3.3 Hz, H-9), 0.80 (3H, s, H-18), 0.63 (1H, t, *J* = 12.8 Hz, H-1b); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ_C: 31.3 (C-1), 29.5 (C-2), 76.5 (C-3), 34.6 (C-4), 44.0 (C-5), 28.0 (C-6), 26.4 (C-7), 41.2 (C-8), 49.6 (C-9), 38.8 (C-10), 22.4 (C-11), 39.5 (C-12), 49.5 (C-13), 83.9 (C-14), 32.1 (C-15), 27.3 (C-16), 50.2 (C-17), 15.8 (C-18), 57.8 (C-19), 176.5 (C-20), 73.2 (C-21), 116.2 (C-22), 173.9 (C-23), 98.1 (C-1'), 70.7 (C-2'), 71.4 (C-3'), 72.7 (C-4'), 68.6 (C-5'), 18.0 (C-6')。以上数据与文献报道对照基本一致^[16],故鉴定化合物**5**为弗如糖苷。

化合物6 白色粉末; C₁₃H₁₈O₃; ESI-MS: *m/z* 245.1 [M + Na]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H:

7.00 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-7), 6.43 (1H, d, *J* = 15.8 Hz, H-8), 5.95 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-4), 2.59 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H-2a), 2.30 (3H, s, H-10), 2.25 (1H, d, *J* = 17.2 Hz, H-2b), 1.89 (3H, s, H-11), 1.06 (3H, s, H-12), 1.02 (3H, s, H-13); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 42.6 (C-1), 50.5 (C-2), 200.4 (C-3), 128.0 (C-4), 164.7 (C-5), 80.0 (C-6), 148.4 (C-7), 131.7 (C-8), 200.7 (C-9), 27.6 (C-10), 23.5 (C-11), 24.7 (C-12), 19.2 (C-13)。以上数据与文献报道对照基本一致^[17],故鉴定化合物**6**为(+)-dehydrovomifoliol。

化合物7 白色粉末; C₉H₇NO₂; ESI-MS: *m/z* 162.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 8.07 (1H, br d, *J* = 7.5 Hz, H-5), 7.95 (1H, s, H-2), 7.43 (1H, br d, *J* = 7.5 Hz, H-8), 7.20 (1H, br t, *J* = 7.5 Hz, H-6), 7.17 (1H, br t, *J* = 7.5 Hz, H-7); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 133.4 (C-2), 108.8 (C-3), 127.6 (C-4), 122.0 (C-5), 123.6 (C-6), 122.3 (C-7), 112.9 (C-8), 138.2 (C-9), 169.3 (C-10)。以上数据与文献报道对照基本一致^[18],故鉴定化合物**7**为3-吲哚甲酸。

化合物8 白色粉末; C₉H₁₀O₄; ESI-MS: *m/z* 183.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.25 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6), 7.13 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 7.06 (1H, dd, *J* = 7.8, 7.2 Hz, H-5), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.80 (3H, s, 2-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 127.4 (C-1), 149.9 (C-2), 154.7 (C-3), 117.2 (C-4), 123.2 (C-6), 125.2 (C-5), 169.7 (C-7), 61.9 (2-OCH₃), 56.5 (3-OCH₃)。根据以上数据及二维核磁数据,故鉴定化合物**8**为2,3-二甲氧基苯甲酸。

化合物9 白色粉末; C₇H₆O₃; ESI-MS: *m/z* 139.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.89 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2, H-6), 6.84 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3, H-5); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ_C: 122.7 (C-1), 133.0 (C-2, C-6), 116.0 (C-3, C-5), 163.3 (C-4), 170.1 (C-7)。以上数据与文献报道对照基本一致^[19],故鉴定化合物**9**为对羟基苯甲酸。

化合物10 白色粉末; C₈H₈O₄; ESI-MS: *m/z* 169.1 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ_H: 7.57 (2H, m, H-2, H-5), 6.86 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 3.91 (3H, s, 3-OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz,

$CD_3OD\delta_C$:123.1(C-1),113.8(C-2),152.7(C-3),148.7(C-4),115.8(C-5),125.3(C-6),170.1(1-COOH),56.4(3-OCH₃)。以上数据与文献报道对照基本一致^[20],故鉴定化合物**10**为香草酸。

2.2 活性测试结果

化合物**1~10**的细胞毒活性测试结果(见表1)

表1 化合物**1~10**的体外细胞毒活性测试结果

Table 1 Results of compounds **1~10** cytotoxic activity *in vitro*

化合物 Compound	IC_{50} (μM)			
	K562	SGC-7901	A549	HeLa
1~3	>50	>50	>50	>50
4	24.63 ± 0.25	49.29 ± 0.76	48.49 ± 0.31	12.37 ± 0.39
5	0.29 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.55 ± 0.01
6~10	>50	>50	>50	>50
盐酸阿霉素 Doxorubicin hydrochloride	0.07 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.28 ± 0.01

注:盐酸阿霉素为阳性对照。

Note: Doxorubicin hydrochloride is positive control.

3 结论

从牛角瓜茎中分离得到10个化合物,化合物**1~3**和**6~8**为首次从该植物中分离得到,其中化合物**1~4**为木脂素类化合物,**8~10**为酚酸类化合物。测试化合物**1~10**对4种肿瘤的细胞毒活性,结果表明化合物**4**和**5**对4种肿瘤细胞具有不同程度的细胞毒活性, IC_{50} 值范围分别为12.37~49.29和0.29~0.98 μM ,其他化合物没有显示出明显活性。根据文献报道化合物**4**对人卵巢癌细胞SK-OV-3具有微弱的细胞毒活性,化合物**5**弗如糖苷是牛角瓜中主要的强心苷成分,超过提取物含量的2.8%,且对多种肿瘤细胞具有较强的细胞毒活性。最近的研究表明,弗如糖苷可通过诱导线粒体介导黑色素瘤细胞凋亡^[21],可能有助于预防黑色素瘤,这表明该化合物可能具有很多潜在活性尚未开发,具有进一步研究的价值。

参考文献

- Huang ZY, Ao FF, Wu XZ, et al. Chemical constituents of *Calotropis gigantea* L. and their anticancer activity [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2016, 51:1826-1830.
- Sarkar S, Chakraverty R, Ghosh A. *Calotropis gigantea* Linn. -a complete basket of Indian traditional medicine [J]. Int J Pharm Res Sci, 2014, 2(1):7-17.
- Pathak AK, Argal A. Analgesic activity of *Calotropis gigantea* flower [J]. Fitoterapia, 2007, 78(1):40-42.

显示化合物**4**和**5**对4种肿瘤细胞具有不同程度的细胞毒活性,其他化合物无明显细胞毒活性。其中,化合物**4**对人宫颈癌细胞HeLa具有的抑制活性较强, IC_{50} 为12.37 μM ;化合物**5**对慢性髓原白血病细胞K562的抑制活性最强, IC_{50} 为0.29 μM 。

- Lodhi G, Singh H, Pant K, et al. Hepatoprotective effects of *Calotropis gigantea* extract against carbon tetrachloride induced liver injury in rats [J]. Acta Pharm, 2009, 59(1):89-96.
- Chitme H, Chandra R, Kaushik S. Studies on anti-diarrhoeal activity of *Calotropis gigantea* R. Br. in experimental animals [J]. J Pharm Pharm Sci, 2004, 7(1):70.
- Nalwaya N, Pokharna G, Deb L, et al. Wound healing activity of latex of *Calotropis gigantea* [J]. J Pharm Pharm Sci, 2009, 1(1):176-182.
- Kumar G, Karthik L, Rao KVB. Antimicrobial activity of latex of *Calotropis gigantea* against pathogenic microorganisms-an *in vitro* study [J]. Pharmacology, 2010, 3:155-163.
- Dai HF, Wang MY, Mei WL, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Calotropis gigantea* [J]. J Henan Univ: Med Sci(河南大学学报:医学版), 2009, 28:1-7.
- Kitagawa I, Zhang RS, Park JD, et al. Indonesian medicinal plants. I. chemical structures of calotroposides A and B, two new oxypregnane-oligoglycosides from the root of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40: 2007-2013.
- Thakur S, Das P, Itoh T, et al. Latex extractables of *Calotropis gigantea* [J]. Phytochemistry, 1984, 23:2085-2087.
- Nguyen MTT, Nguyen KDH, Dang PH, et al. Calosides A-F, cardenolides from *Calotropis gigantea* and their cytotoxic activity [J]. J Nat Prod, 2020, 83:385-391.
- Xiao YY, Gou P, Xie HH. Phenylpropanoids from *Leontopodi-*

- um leontopodioides* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2017, 25(2): 195-201.
- 13 Parhira S, Yang ZF, Zhu GY, et al. *In vitro* anti-influenza virus activities of a new lignan glycoside from the latex of *Calotropis gigantea* [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104544.
- 14 Zhu JY, Cheng B, Zheng YJ, et al. Enantiomeric neolignans and sesquineolignans from *Jatropha integerrima* and their absolute configurations [J]. Rsc Adv, 2015, 5: 12202-12208.
- 15 Zhu JX, Ren J, Qin JJ, et al. Phenylpropanoids and lignanoids from *Euonymus acanthocarpus* [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35: 1739-1747.
- 16 Kiuchi F, Fukao Y, Maruyama T, et al. Cytotoxic principles of a bangladeshi crude drug, akond mul (roots of *Calotropis gigantea* L.) [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46: 528-530.
- 17 Peng B, He CN, Xu LJ, et al. Studies on the chemical constit-
- uents of *Saururus chinensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 1950-1952.
- 18 Wang RP, Lin HW, Li LZ, et al. Monoindole alkaloids from a marine sponge *Mycale fibrexilis* [J]. Biochem Syst Ecol, 2012, 43: 210-213.
- 19 Ji MC, Guo DL, Jiang SY, et al. Phenolic components from *Pothos chinensis* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27: 609-612.
- 20 Wang LL, Kong WX, Yuan Z. A new 8-O-4' neolignan from *Glehnia littoralis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43: 1036-1039.
- 21 Song IS, Jeong YJ, Kim JE, et al. Frugoside induces mitochondria-mediated apoptotic cell death through inhibition of sulfiredoxin expression in melanoma cells [J]. Cancers, 2019, 11: 854-870.

一种用于锚定药效团引导药物发现的新工具——AncPhore

作为经典的计算机辅助药物设计方法之一,药效团方法在药物发现领域内得到了广泛的应用,它主要基于这样一个概念:在生物靶点对配体的分子识别中观察特定的分子相互作用。通常情况下,药理模型被定义为化学相互作用(如氢键、电荷和疏水接触)及其空间排列的组合,它能使目标蛋白或一组化学性质不同的活性配体的相互作用模式被合理化,并能随后应用于虚拟筛选、从头设计和先导化合物优化。药效团模型由多个药效团特征组成,以表示目标蛋白识别结构多样配体的特异性。在实际应用中,极小部分的药理特征在蛋白质-配体识别中具有最关键的贡献,这种特征被称为“锚定药效团特征”。虽然人们已经逐渐认识到锚定药理特征的重要性,但直到现在还缺乏对这种特征的全面分析和正确应用。

来自四川大学华西药学院的李国菠团队描述了一个用于药物发现的新工具——AncPhore,它的特点是药效团特征分析和锚式药效团引导的分子拟合和虚拟筛选。它包含了分析蛋白质-配体复合物、配体或载脂蛋白药效团特征的方法,特别是之前没有被很好描述的相对复杂的金属配位特征。通过对药效团特征的大规模跨靶点分析,该团队发现锚定药效团特征普遍与目标蛋白家族中的保守特征有关,并对配体结合亲和力有很大贡献,这为锚定药效团特征提供了相对全面、概括性的理解。更值得注意的是,在AncPhore中引入了新的算法和新的评分函数,以实现锚定药效团引导的分子拟合和虚拟筛选。使用DUD-E数据集对不同类型的蛋白质目标进行的性能评估表明,当考虑到锚定药理特征的独特贡献和多样性时,AncPhore的预测能力明显提高。AncPhore的应用发现了两类临幊上结构多样的相关金属酶的新抑制剂:金属 β -内酰胺酶(MBLs)和吲哚胺2,3-二氧酶1(IDO1)/色氨酸2,3-二氧酶(TDO),这进一步证明了AncPhore在发现先导化合物方面的能力。这项工作揭示了锚定药效团是以目标为中心的药物发现中一个有价值的概念,并说明了AncPhore在有效识别不同类型蛋白质目标的新抑制剂方面的潜力。AncPhore程序目前可在网站<https://ancphore.ddtmlab.org>上可免费获取。相关研究发表在《Acta Pharm Sin B》杂志上。

胡乃华编译自:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383521000216>

原文标题:AncPhore: A versatile tool for anchor pharmacophore steered drug discovery with applications in discovery of new inhibitors targeting metallo- β -lactamases and indoleamine/tryptophan 2,3-dioxygenases