

## 青阳参根中一个新的苯二氢化萘型木脂素

李小叁, 龙娟, 罗宇浩, 何妙莹, 吴绮靖, 刘立\*, 杨雪梅\*

广东医科大学药学院, 东莞 523808

**摘要:**为了解青阳参(*Cynanchum otophyllum* Schneid)根的酸催化水解物化学成分。利用硅胶柱色谱、ODS、HPLC等多种柱色谱分离手段对青阳参95%乙醇提取物的酸催化水解物进行了分离纯化,从中得到了4个木脂素,通过波谱学方法鉴定其结构,分别为9'-methoxynegundin B(**1**)、(+)-isolariciresinol(**2**)、dehydroconiferyl alcohol(**3**)、5-methoxydehydroconiferyl alcohol(**4**)。其中化合物**1**为新的苯二氢化萘型木脂素,化合物**2~4**为首次从本属植物中分离得到。采用MTT法测定了化合物**1~4**对人癌细胞株HeLa、H1299、HepG2和MCF-7的细胞毒活性,结果表明化合物**2**和**3**对肝癌HepG2细胞有明显的抑制活性。

**关键词:**青阳参;木脂素;结构鉴定;细胞毒活性

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)11-1860-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.11.007

## A new phenyldihydronaphthalene lignan from the root of *Cynanchum otophyllum* Schneid

LI Xiao-san, LONG Juan, LUO Yu-hao, HE Miao-ying, WU Qi-jing, LIU Li\*, YANG Xue-mei\*

School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

**Abstract:** To understand the chemical constituents from the acid catalytic hydrolysate of the root of *Cynanchum otophyllum* Schneid. Four lignan compounds were isolated from the acid catalytic hydrolysate of the 95% ethanol extract of the root of *C. otophyllum* by means of multiple column chromatography techniques including silica gel, ODS and preparative HPLC. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis and comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature to be 9'-methoxynegundin B (**1**), (+)-isolariciresinol (**2**), dehydroconiferyl alcohol (**3**), 5-methoxydehydroconiferyl alcohol (**4**). Among them, **1** was new compound and compounds **2-4** were obtained for the first time in the genus *Cynanchum*. The cytotoxicities of compounds **1-4** toward four human carcinoma cell lines, HeLa, H1299, HepG2, and MCF-7 cells were evaluated by MTT method. The results showed that compounds **2** and **3** had strong inhibitory effects on the growth of HepG2 carcinoma cell line.

**Key words:** *Cynanchum otophyllum*; lignans; structural identification; cytotoxicities

青阳参(*Cynanchum otophyllum* Schneid)是萝藦科鹅绒藤属植物中常见的民间用药,该植物多年生草质缠绕藤本,主要分布于我国的云南、四川、广西、西藏和贵州等省份。青阳参的主要药用部位为根茎。味辛,甘,性温,有一定毒性,祛风湿,益肾健脾和胃。现已上市的青阳参片,有平肝补肾、豁痰镇痉

作用,主要用于癫痫、头昏头痛、眩晕、耳鸣、腰膝酸软等症状。研究表明,青阳参的干燥根有抗癫痫、抗抑郁、免疫调节、抗肝炎和抗美尼尔综合征作用<sup>[1]</sup>。青阳参的化学成分结构类型多样,主要有C<sub>21</sub>甾类和去氧寡糖<sup>[2]</sup>,其中C<sub>21</sub>甾类被认为是青阳参的特征性物质和主要药效成分<sup>[3-5]</sup>。现代药理学研究表明萝藦科植物来源的C<sub>21</sub>甾类成分具有丰富的生物活性,比如抗肿瘤、抗炎、抗真菌、抗病毒等<sup>[2]</sup>。近些年来,萝藦科来源的天然C<sub>21</sub>甾体苷元拥有显著的抗肿瘤活性<sup>[6,7]</sup>,具有潜在的研究价值。青阳参是我国的传统民间用药,在我国资源丰富,但目前对其化

收稿日期:2021-03-29 接受日期:2021-04-29

基金项目:广东省粤莞联合基金(2019A1515110386);湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2020A01029);广东省中医药局面上科研项目(20211228);广东省医学科研基金(A2021218)

\*通信作者 Tel:86-532-88963253; E-mail: xuemeiyang131@163.com, liuli-44@163.com

学成分研究多数为  $C_{21}$  甾体, 缺少对其他类型成分研究。近期本课题组对青阳参干燥根的酸水解物的化学成分进行研究, 从中得到了一系列结构新颖、具有显著抗肿瘤活性的  $C_{21}$  甾体苷元<sup>[8]</sup>。然而在研究过程中, 我们发现了其酸水解物中存在一些微量的其他类型成分。因此, 为了进一步了解中药青阳参的物质基础, 提高其资源综合利用效率, 本文对青阳参干燥根的酸水解物的其他类型成分进行了分离纯化和结构鉴定, 并测试了分离化合物的细胞毒活性, 以期发现结构新颖的抗肿瘤先导化合物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Bruker-AV400 NMR 和 600 NMR 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); Micromass Q-TOF 高分辨 (美国 Waters 公司) 和 Triple Quad 4500 低分辨质谱仪 (美国 SCIEX 公司); Technologies 1260 infinity 系列分析型和制备型高效液相色谱仪 (德国 Agilent 公司);  $C_{18}$  色谱柱: 半制备型:  $5\ \mu\text{m}$ ,  $250\ (10.0\ \text{mm})$ , 分析型, 分析型:  $5\ \mu\text{m}$ ,  $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$  (美国 Epic  $C_{18}$ ); P-1020 型旋光测定仪 (日本 JASCO 公司); QF-510A FT-IR 红外光谱仪 (北京北芬-瑞丽分析仪器公司); V-550 UV/VIS 紫外光谱仪 (日本 JASCO 公司); 色谱纯乙腈、甲醇 (德国 Merck 公司); 旋转蒸发器 (EA-52 型, 上海亚荣生化仪器厂); 硅胶 (200 ~ 300 目)、硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板 (青岛海洋化工有限公司); 所用其他分析纯试剂均为天津市科密欧化学试剂有限公司生产; 培养皿、96 孔板 (ACEA, 美国); 胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基 (Gibco)、胎牛血清、谷氨酰胺 (Biological Industries, 以色列); DMSO (Solarbio); 秋水仙碱 (纯度 99%, 阿拉丁试剂公司); 水为超纯水, PBS 缓冲液等为自配。

中药青阳参干燥根于 2019 年 3 月购买于中国云南省昆明市常真堂制药有限公司。由广东医科大学药学院苟占平教授鉴定为青阳参干燥根, 标本 (No. 201903) 保存于广东医科大学药学院。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 提取和分离

青阳参干燥根 15 kg, 利用 95% 乙醇-水 (30 L) 回流提取 4 次, 每次 2 h, 然后减压浓缩得到粗提取物 (2.25 kg)。粗提取物溶解于 5% HCl 甲醇-水溶液 (V/V, 2:1, 30 L) 中, 加热回流反应 3 h, 然后慢慢滴加 10% NaOH 水溶液, 中和至 pH = 7.0。然后浓缩去除有机溶剂, 加入水稀释, 用乙酸乙酯萃取, 浓

缩后得到酸水解物 (1.48 kg)。取 1.0 kg 水解物, 利用硅胶开放柱色谱, 氯仿-甲醇梯度洗脱 (95:1 → 2:1, V/V), 分离得到 10 个馏分 (Fr. 1 ~ Fr. 10)。

馏分 Fr. 5 (132.0 g) 利用硅胶开放柱色谱, 石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱 (2:1 → 1:5, V/V), 得到 9 个子馏分 (Fr. 5-1 ~ Fr. 5-9)。馏分 Fr. 5-6 (14.0 g) 利用硅胶开放柱色谱, 环己烷/乙酸乙酯梯度洗脱 (2:1 → 1:1, V/V), 得到 5 个子馏分 (Fr. 5-6-1 ~ Fr. 5-6-5)。馏分 Fr. 5-6-5 (450 mg) 经制备型高效液相 (45% 甲醇水, 流速 3.0 mL/min) 得到化合物 1 ( $t_R = 22.5\ \text{min}$ , 4.3 mg); 馏分 Fr. 7 (30.7 g) 利用硅胶开放柱色谱, 石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱 (2:1 → 1:2, V/V), 得到 9 个子馏分 (Fr. 7-1 ~ Fr. 7-9)。馏分 Fr. 7-8 (2.8 g) 经制备型高效液相 (70% 甲醇水, 流速 3.0 mL/min) 得到 7 个子馏分 (Fr. 7-8-1 ~ Fr. 7-8-7)。馏分 Fr. 7-8-2 (86.1 mg) 经制备型高效液相 (50% 甲醇水, 流速 3.0 mL/min) 得到化合物 2 ( $t_R = 25.0\ \text{min}$ , 4.5 mg)。馏分 Fr. 7-8-3 (162.2 mg) 经制备型高效液相 (55% 甲醇水, 流速 3.0 mL/min) 得到化合物 3 ( $t_R = 22.0\ \text{min}$ , 22.0 mg) 和化合物 4 ( $t_R = 26.0\ \text{min}$ , 34.2 mg)。

#### 1.2.2 细胞毒活性测试

选择对数生长的肿瘤细胞 (HeLa、H1299、HepG2 和 MCF-7) 用含 10% FBS (胎牛血清), 1% 的左旋谷氨酰胺 (*L*-glutamine), 100 units/mL 的盘尼西林 (penicillin) 和 100 g/mL 的链霉素的 RPMI 1640 培养基培养。将培养的细胞以  $5 \times 10^3$ /孔数量接种于 96 孔板上, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。在含 5%  $\text{CO}_2$  的 37  $^\circ\text{C}$  孵育箱中培养 48 h, 加入不同浓度的待筛样品 (化合物 1 ~ 4 和阳性对照秋水仙碱), 同时设溶剂空白对照组, 37  $^\circ\text{C}$  培养 48 h。将 96 孔板中的原培养基吸出, 加入稀释的 0.5 mg/mL MTT PBS 液, 100  $\mu\text{L}$ /孔。在 37  $^\circ\text{C}$  孵育 4 h 后, 吸出 MTT 溶液, 加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 溶剂, 100  $\mu\text{L}$ /孔, 使形成的甲瓩晶体溶解, 在摇床上低速震荡 5 min。然后将 96 孔板置于酶标仪中 570 nm 单波长检测吸光值并计算肿瘤细胞生长抑制率: 细胞生长率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (阳性对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值)  $\times 100\%$ 。重复实验 3 次, 进行量效曲线的绘制和  $\text{IC}_{50}$  值的计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 结构鉴定

**化合物 1** 棕色胶状物(甲醇),  $[\alpha]_D^{26}$  (29.5 ( $c = 0.5, \text{MeOH}$ )). ESI-MS:  $m/z$  373.5  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; HR-ESI-MS:  $m/z$  373.1628  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_6$ , 373.1651), 推测该化合物的分子量  $M = 372$ , 分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_6$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) 222 (3.20), 280 (2.70) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3446, 2931, 1639, 1531, 1381, 1279, 1162, 1079, 977  $\text{cm}^{-1}$ ; IR 光谱显示该化合物结构中存在羟基 ( $\nu_{\text{max}}$  3446  $\text{cm}^{-1}$ ) 和共轭羰基 ( $\nu_{\text{max}}$  1639  $\text{cm}^{-1}$ )。在  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 图谱中, 在低场区显示一组相互耦合的邻间位苯环氢信号:  $\delta_{\text{H}}$  6.65 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.66 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5) 与 6.39 (1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H-2)、一组对位苯环氢信号:  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (1H, s, H-2') 与 6.67 (1H, s, H-5') 和一个烯烃氢信号:  $\delta_{\text{H}}$  6.40 (1H, s, H-7'), 高场区显示 3 个甲氧基的氢信号:  $\delta_{\text{H}}$  3.72 (3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (3H, s,

3'-OCH<sub>3</sub>) 与 2.98 (3H, s, 9'-OCH<sub>3</sub>)。结合  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 和 HSQC 图谱, 该化合物显示 21 个碳, 分别为 8 个季碳信号:  $\delta_{\text{C}}$  148.8 (s, C-3'), 148.6 (s, C-3), 146.3 (s, C-4'), 145.6 (s, C-4), 137.9 (s, C-1), 134.4 (s, C-8'), 128.4 (s, C-6'), 127.9 (s, C-1'), 8 个次甲基碳信号:  $\delta_{\text{C}}$  127.2 (d, C-7'), 121.4 (d, C-6), 115.7 (d, C-5), 114.5 (d, C-2' 和 C-5'), 112.7 (d, C-2), 48.6 (d, C-8), 45.0 (d, C-7), 2 个亚甲基碳信号:  $\delta_{\text{C}}$  76.0 (t, C-9'), 62.9 (t, C-9) 和 3 个甲氧基碳信号:  $\delta_{\text{C}}$  57.3 (q, 9'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (q, 3'-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (q, 3-OCH<sub>3</sub>)。

将化合物 1 的碳谱数据(见表 1) 与文献报道的化合物 negundin B<sup>[9-11]</sup> 相比较, 两者的波谱数据极为相似, 均具有相同的苯二氢化萘型木脂素特征骨架结构。结合分子式信息, 提示两个化合物的主要不同之处在于: 化合物 1 较化合物 negundin B 多了一个甲氧基取代基(结构见图 1)。在与 negundin B 的碳谱数据相比较时, 发现化合物 1 的 C-9' 位化

表 1 化合物 1 的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据(600 和 150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Table 1  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 1 (600 and 150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)	No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1	137.9, s		3'	148.8, s	
2	112.7, d	6.65, 1H, dd(1.8)	4'	146.3, s	
3	148.6, s		5'	114.5, d	6.67, 1H, s
4	145.6, s		6'	128.4, s	
5	115.7, d	6.60, 1H, d(8.0)	7'	127.2, d	6.40, 1H, s
	121.4, d	6.39, 1H, dd(8.0, 1.8)	8'	134.4, s	
7	45.0, d	4.24, 1H, br s	9'	76.0, t	4.01, 1H, d(12.3) 3.25, 1H, d(12.3)
8	48.6, d	2.62, 1H, m	3-OCH <sub>3</sub>	56.3, q	3.72, 3H, s
	62.9, t	3.60, 1H, dd(10.3, 4.6) 3.25, 1H, t(10.3)	3'-OCH <sub>3</sub>	56.4, q	3.79, 3H, s
1'	127.9, s		9'-OCH <sub>3</sub>	57.3, q	2.98, 3H, s
2'	114.5, d	6.66, 1H, s			

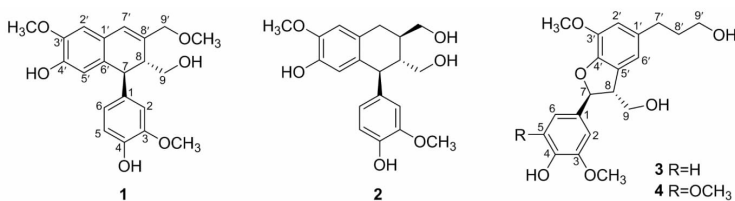


图 1 化合物 1~4 的化学结构

Fig. 1 The structures of compounds 1-4

学位移( $\delta_C$  76.0)相比 negundin B 的 C-9' 位化学位移( $\delta_C$  65.9)向低场偏移了 10.1 ppm, 同时在 HMBC 谱(图 2)中显示化合物 **1** 的一个甲氧基氢信号: $\delta_H$  2.98(3H, s, 9'-OCH<sub>3</sub>)与碳信号  $\delta_C$  76.0(C-9')有相关, 提示一个甲氧基连接在化合物 **1** 的 C-9' 位上。因此推测化合物 **1** 是化合物 negundin B 的 9'-甲氧基取代衍生物。进一步通过<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 和 HMBC 图谱相关对化合物 **1** 的平面结构进行了确证(见图 2)。在<sup>1</sup>H NMR 谱中, 显示 H-7(4.24, 1H)为单峰(br s)信号, 说明 H-7 和 H-8 没有存在相互耦合, 提示它们之间的二面角是 90°<sup>[12]</sup>。同时, 旋光值( $[\alpha]_D^{26}$  -29.5)显示为负值, 跟文献报道具有相同苯二氢化萜型骨架的木脂素 negundin B<sup>[11]</sup>( $[\alpha]_D^{26}$  -56)和 vitexdoin A<sup>[13]</sup>( $[\alpha]_D^{26}$  -79.4)一致, 故认为它们具有相同的立体构型: C-7 为 S 构型, C-8 为 R 构型。综上所述, 确定化合物 **1** 的绝对结构, 该化合物为天然产物中比较罕见的苯二氢化萜型木脂素, 为新化合物, 故将其命名为 9'-methoxynegundin B。化合物 **1** 的详细结构鉴定数据原始图谱可从本刊官网免费下载(www.trcw.ac.cn)。

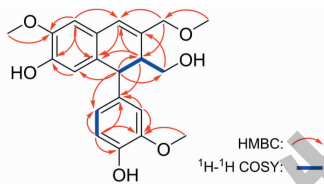


图 2 化合物 **1** 的主要<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 和 HMBC 相关

Fig. 2 Key <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and HMBC correlations of compound **1**

**化合物 2** 黄色不定型粉末(甲醇), 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂。 $[\alpha]_D^{26} + 43.5$ ( $c = 0.7$ , MeOH)。ESI-MS: $m/z$  383.3 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>; 提示该化合物分子量  $M = 360$ 。<sup>1</sup>H NMR(300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$ : 6.74(1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.67(1H, dd,  $J = 8.0, 1.8$  Hz, H-2), 6.61(1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 6.65(1H, s, H-2'), 6.18(1H, s, H-5'), 3.80(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.77(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.68(2H, m, H-9'), 3.65(1H, m, H-9a), 3.41(1H, m, H-9b), 3.79(1H, m, H-7), 2.77(2H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-7'), 2.00(1H, m, H-8'), 1.76(1H, m, H-8); <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 138.6(s, C-1), 113.8(d, C-2), 149.0(s, C-3), 145.9(s, C-4), 116.0(d, C-5), 123.2(d, C-6), 48.0(d, C-7), 48.0(d, C-8),

62.2(t, C-9), 56.3(q, 3-OCH<sub>3</sub>), 129.0(s, C-1'), 112.3(d, C-2'), 147.2(s, C-3'), 145.2(s, C-4'), 117.3(d, C-5'), 134.1(s, C-6'), 33.6(t, C-7'), 40.0(d, C-8'), 65.9(t, C-9'), 56.4(q, 3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **2** 为 (+)-isolariciresinol。

**化合物 3** 黄色不定型粉末(甲醇), 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂。ESI-MS: $m/z$  383.5 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>; 提示该化合物分子量为 360。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$ : 6.97(1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-2), 6.84(1H, dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-6), 6.79(1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.74(2H, s, H-2', 6'), 5.51(1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-7), 3.86(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.82(3H, s, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.84(1H, m, H-9b), 3.76(1H, m, H-9a), 3.59(2H, m, H-9'), 3.48(1H, m, H-8), 2.64(2H, m, H-7'), 1.84(2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 134.8(s, C-1), 110.6(d, C-2), 149.0(t, C-3), 147.5(t, C-4), 116.1(d, C-5), 119.7(d, C-6), 89.0(d, C-7), 55.4(d, C-8), 65.0(t, C-9), 56.8(q, 3-OCH<sub>3</sub>), 136.9(s, C-1'), 114.1(d, C-2'), 145.2(s, C-3'), 147.4(s, C-4'), 129.9(s, C-5'), 117.9(d, C-6'), 32.9(t, C-7'), 35.8(t, C-8'), 62.2(t, C-9'), 56.4(3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **3** 为 dehydroconiferyl alcohol。

**化合物 4** 黄色不定型粉末(甲醇), 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂。ESI-MS: $m/z$  413.4 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup>; 提示该化合物分子量为 390。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$ : 6.73(2H, s, H-2', 6'), 6.68(1H, s, H-2, 6), 5.50(1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-7), 3.85(3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>), 3.80(6H, s, 3, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.84(1H, m, H-9b), 3.76(1H, m, H-9a), 3.57(2H, m, H-9'), 3.48(1H, m, H-8), 2.62(2H, m, H-7'), 1.81(2H, m, H-8'); <sup>13</sup>C NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$ : 133.9(s, C-1), 104.2(d, C-2, 6), 149.3(s, C-3, 5), 137.0(s, C-4, 1'), 89.1(d, C-7), 55.5(d, C-8), 65.0(t, C-9), 56.8(q, 3, 5-OCH<sub>3</sub>), 114.1(d, C-2'), 145.2(s, C-3'), 147.5(s, C-4'), 129.8(s, C-5'), 117.9(d, C-6'), 32.9(t, C-7'), 35.8(t, C-8'), 62.2(t, C-9'), 56.8(q, 3'-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[15, 16]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为 5-methoxydehydroconiferyl alcohol。

## 2.2 体外人癌细胞毒活性测试

本实验对化合物 **1**~**4** 进行了细胞毒活性评价(见表 2),测试的人癌细胞株为 MCF-7、HCT-116、HeLa 和 HepG2。在 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度下进行初筛,化合物 **1** 和 **4** 无明显的细胞毒性,而化合物 **2** 和 **3**

表现出较强的细胞毒性。进一步对化合物 **2** 和 **3** 的细胞毒活性进行验证,实验结果表明化合物 **2** 和 **3** 对四种人癌细胞株均有较好的抑制生长活性,特别是对肝癌 HepG2 细胞的抑制活性最好,其  $\text{IC}_{50}$  值分别达到  $34.19 \pm 5.44$  和  $22.52 \pm 3.91 \mu\text{M}$ 。

表 2 化合物 **1**~**4** 的细胞毒活性  
Table 2 Cytotoxicity of compounds **1**~**4**

化合物 Compound	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	MCF-7	HCT-116	HeLa	HepG 2
<b>1</b>	>100	>100	>100	>100
<b>2</b>	$69.18 \pm 5.54$	$92.33 \pm 8.75$	$85.27 \pm 13.62$	$34.19 \pm 5.44$
<b>3</b>	$78.52 \pm 4.57$	$65.43 \pm 5.29$	$95.33 \pm 7.93$	$22.52 \pm 3.91$
<b>4</b>	>100	>100	>100	>100
秋水仙素 Colchicine <sup>a</sup>	$0.028 \pm 0.006$	$0.046 \pm 0.018$	$0.138 \pm 0.026$	$0.064 \pm 0.012$

注:<sup>a</sup> 阳性对照。

Note:<sup>a</sup>Positive control.

## 3 讨论与结论

由于国内外学者对中药青阳参的化学成分研究大多数集中于  $\text{C}_{21}$  甾体苷类成分<sup>[3-5]</sup>,因此忽略了对其次级苷、苷元或者其他类型成分研究,一定程度上限制了其资源再次利用和开发。对于含有丰富多样的糖链甾体苷类成分,国内外已有学者着重研究其次级苷或者苷元,比如通光藤<sup>[17]</sup>、徐长卿<sup>[18]</sup>、白首乌<sup>[6,19]</sup> 和黑鳗藤<sup>[20]</sup>,主要是利用酸催化水解方法,获得系列具有生物活性次级苷或者甾体苷元。基于文献成功的先例,本课题组前期采用酸水解催化方法处理青阳参根 95% 乙醇提取物,从中分离、鉴定了一系列结构新颖、具有抗肿瘤活性的  $\text{C}_{21}$  甾体苷元<sup>[8]</sup>。此外,我们发现青阳参根的酸水解物中仍存在微量的其他类型成分。本实验是通过采用现代色谱学方法对青阳参根的酸水解物中其他类型成分进行分离、鉴定,从中发现了 4 个木脂素,其中化合物 **1** 为新的苯二氢化萘型木脂素。进一步通过 MTT 法实验显示化合物 **2** 和 **3** 具有一定程度细胞毒活性,特别是对肝癌 HepG2 细胞,其  $\text{IC}_{50}$  分别为  $34.19 \pm 5.44$  和  $22.52 \pm 9.13 \mu\text{M}$ 。因此,本实验得到的 4 个木脂素化合物均是首次从该属植物中发现的,虽然其有可能是天然产物的酸催化水解后产生的脱糖苷衍生物,但在一定程度上反映了青阳参植物中存在木脂素类成分,丰富了其化学结构类型,同时为青阳参的资源化利用提供理论基础,也为寻找新的生物活性天然产物提供新的思路和帮助。

## 参考文献

- 1 Ai JL, Tian M, Yang QX. Advance on the  $\text{C}_{21}$  steroidal glycosides from *Cynanchum otophyllum* [J]. Guizhou Normal Univ (贵州师范大学学报), 2012, 30: 106-115.
- 2 Gu XJ, Hao DC. Recent advances in phytochemistry and pharmacology of  $\text{C}_{21}$  steroid constituents from *Cynanchum* plants [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14: 321-334.
- 3 Shen DY, Wei JC, Wan JB, et al. Four new  $\text{C}_{21}$  steroidal glycosides from *Cynanchum otophyllum* Schneid [J]. Phytochem Lett, 2014, 9: 86-91.
- 4 Li JL, Zhou J, Chen ZH, et al. Bioactive  $\text{C}_{21}$  steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum otophyllum* that suppress the seizure-like locomotor activity of zebrafish caused by pentylentetrazole [J]. J Nat Prod, 2015, 78: 1548-1555.
- 5 Dong JR, Peng XR, Li Lei, et al.  $\text{C}_{21}$  steroidal glycosides with cytotoxic activities from *Cynanchum otophyllum* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28: 1520-1524.
- 6 Huang LJ, Wang B, Zhang JX, et al. Studies on cytotoxic pregnane saponin from *Cynanchum wilfordii* [J]. Fitoterapia, 2015, 101: 107-116.
- 7 Fei HR, Chen HL, Xiao T, et al. Caudatin induces cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cell [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 131-138.
- 8 Li XS, Yang XM, Ding WJ, et al. New  $\text{C}_{21}$ -steroidal aglycones from the roots of *Cynanchum otophyllum* and their anticancer activity [J]. Fitoterapia, 2021, 149: 104833.
- 9 Azhar-ul-Haq, Malik A, Anis I, et al. Enzyme inhibiting lignans from *Vitex negundo* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52:

- 1269-1272.
- 10 Liu YJ, Min K, Huang GL, et al. Compounds from the acid hydrolysate of glycosides of *Boschniakia himalaica* [J]. Chem Nat Compd, 2019, 55: 105-106.
- 11 Arif Lodhi M, Azhar-ul-Haq, Iqbal Choudhary M, et al.  $\alpha$ -Chymotrypsin inhibition studies on the lignans from *Vitex negundo* Linn [J]. J Enzym Inhib Med Ch, 2008, 23: 400-405.
- 12 Chawla AS, Sharma AK, Handa SS, et al. A lignan from *Vitex negundo* seeds [J]. Phytochemistry, 1992, 31: 4378-4379.
- 13 Ono M, Nishida Y, Masuoka C, et al. Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo* [J]. J Nat Prod, 2004, 67: 2073-2075.
- 14 Jutiviboonsuk A, Zhang HJ, Tan GT, et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis* [J]. Phytochemistry, 2005, 66: 2745-2751.
- 15 Li LY, Seeram NP. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds [J]. J Agr Food Chem, 2010, 58: 11673-11679.
- 16 Liu YQ, Ma H, Seeram NP. Development and UFLC-MS/MS characterization of a product-specific standard for phenolic quantification of maple-derived foods [J]. J Agr Food Chem, 2016, 64: 3311-3317.
- 17 Zhang L, Chen FY, Xu SF, et al. Steroidal aglycones from stems of *Marsdenia tenacissima* that inhibited the hedgehog signaling pathway [J]. Nat Prod Commun, 2014, 9: 155-156.
- 18 Zhao JW, Chen FY, Gao LJ, et al. Two new steroidal aglycones from roots of *Cynanchun paniculatum* [J]. Nat Prod Commun, 2016, 11: 747-748.
- 19 Zhao JW, Chen FY, Gao LJ, et al. Two new 8, 14-seco-pregnane steroidal aglycones from roots of *Cynanchum bungei* [J]. Nat Prod Commun, 2016, 11: 1797-1800.
- 20 Chen FY, Ni Y, Ye YP, et al. Stephanthraniline A inhibits the proliferation and activation of T cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharm, 2012, 685: 186-197.

## 一个具有免疫抑制活性和催化活性的二倍半萜/二萜合酶的发现

萜类化合物在自然界中广泛存在,其中二倍半萜是一类稀有的萜类天然产物,结构新颖复杂、生物活性广泛,大多存在于海洋生物中,目前对于二倍半萜在植物中的分布规律、生物功能与生物合成知之甚少。来自成都中医药大学/中科院昆明植物研究所黎胜红团队从唇形科药用植物米团花中鉴定了一个具有免疫抑制活性和催化活性双功能的二倍半萜/二萜合酶,能够催化生成6个大环二倍半萜和2个大环二萜产物,其中5个为新化合物,包括2个(化合物**1**和**2**)首次发现的具有18元环的二倍半萜,也是迄今为止发现的具有最大碳环结构的萜类天然产物。通过分子对接结合定点突变获得了2个二倍半萜产量显著提高的突变酶——F516A和F516G,能够显著提高酯类化合物产量,分别比野生型酶高出3.3倍和2.5倍,并发现了大环二倍半萜的免疫抑制活性。

T细胞的异常激活与多种炎症和自身免疫性疾病的发生和发展密切相关,其中T细胞细胞因子IL-2和IFN- $\gamma$ 会增强炎症和组织损伤。该团队发现,二倍半萜化合物**1**、**3**、**5**和**6**对植物血凝素(PHA)和佛波醇12-肉豆蔻酸13-醋酸酯(PMA)诱导的Jurkat细胞分泌的IL-2有明显抑制作用,化合物**1**和**3**对CD3/CD28单抗诱导小鼠T细胞分泌IFN- $\gamma$ 也有明显抑制作用。与此同时,在浓度为20  $\mu$ M时,所有化合物对小鼠脾细胞均无明显细胞毒性。Western blot分析表明,化合物**1**和**3**可能通过抑制ERK和JNK的磷酸化影响MAPK信号通路,从而发挥免疫抑制活性。该研究为大环二倍半萜类活性天然产物生物合成工具酶的开发应用奠定了重要基础,并为揭示植物二倍半萜的化学多样性、分布规律、生物功能和生物合成等提供了有价值的参考。相关研究发表在《Angewandte Chemie International Edition》杂志上。

胡乃华编译自: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/anie.202110842>

原文标题: A cryptic plant terpene cyclase producing unconventional 18- and 14-membered macrocyclic C<sub>25</sub> and C<sub>20</sub> terpenoids with immunosuppressive activity