

南海杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. 的甾体化学成分研究康永锋^{1,3,4}, 段松¹, 张红军², 甘建红^{1,2*}¹上海海洋大学食品学院, 上海 201306; ²中国人民解放军第二军医大学长征医院药学部, 上海 200433;³上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心; ⁴食品科学与工程国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 利用溶剂分步萃取、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、硅胶柱层析、HPLC 等多种柱色谱手段对中国南海杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. 化学成分分离; 通过多种现代波谱学手段结合文献对照, 鉴定所分离化合物的结构。从其石油醚和二氯甲烷萃取部位分离鉴定了 8 个甾体类化合物: cholesta-5,7-dien-3 β -ol (**1**)、ergosta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol (**2**)、ergosta-5,7-dien-3 β -ol (**3**)、(24E)-stigmasta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol (**4**)、stigmasta-5,7-dien-3 β -ol (**5**)、5 α ,6 α -epoxystigmasta-7,22-dien-3 β -ol (**6**)、5 α ,6 α -epoxycholest-7,22-dien-3 β -ol (**7**)、5 α ,6 α -epoxycholest-7-en-3 β -ol (**8**), 化合物 **1**~**8** 为首次从该属海绵分离。测试了所有化合物对人乳腺癌细胞 MCF-7、人结肠癌细胞 HT-29 和人喉癌上皮细胞 Hep-2 的细胞毒活性, 其中化合物 **1**, **2** 和 **7** 对 MCF-7 人乳腺癌细胞的细胞毒活性显著, IC₅₀ 分别为 8.8、10.3 和 3.9 μ mol/L。

关键词: *Phyllospongia* sp.; 化学成分; 分离; 结构鉴定

中图分类号: R931.77

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)12-2053-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.12.009

Study on the steroidal constituents of *Phyllospongia* sp. from the South China Sea

KANG Yong-feng^{1,3,4}, DUAN Song¹, ZHANG Hong-jun², GAN Jian-hong^{1,2*}¹School of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;²Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;³Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation;⁴National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering, Shanghai 201306, China

Abstract: A series of column chromatography methods including solvent extraction, Sephadex LH-20 column chromatography, silica column chromatography and HPLC methods were used to isolate and refine compounds from sponge *Phyllospongia* sp. from the South China Sea. The structures were identified by spectroscopic analysis and comparison with the literature. From the petroleum ether and dichloromethane soluble extract of *Phyllospongia* sp., eight steroids were isolated for the first time and their structures were determined as cholesta-5,7-dien-3 β -ol (**1**), ergosta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol (**2**), ergosta-5,7-dien-3 β -ol (**3**), (24E)-stigmasta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol (**4**), stigmasta-5,7-dien-3 β -ol (**5**), 5 α ,6 α -epoxystigmasta-7,22-dien-3 β -ol (**6**), 5 α ,6 α -epoxycholest-7,22-dien-3 β -ol (**7**), 5 α ,6 α -epoxycholest-7-en-3 β -ol (**8**). The cytotoxic activity of all compounds against MCF-7 human breast cancer cells, HT-29 human colon cancer cells and HEP-2 human laryngeal cancer cells were tested. Compounds **1**, **2** and **7** showed significant cytotoxic activity against MCF-7 human breast cancer cells with IC₅₀ values of 8.8, 10.3, and 3.9 μ mol/L respectively.

Key words: *Phyllospongia* sp.; chemical constituents; isolation; structure elucidation

海绵属多孔动物门(Porifera), 是最原始的低等多细胞动物, 海绵多变的生境和原始的进化地位, 使其产生并积累了大量结构新颖且具有抗肿瘤、抗寄

生虫、抗病毒、抗菌、抗炎和免疫调节等不同生物活性的次生代谢产物, 是海洋天然产物的首要来源^[2,3]。我国南海海域辽阔, 是世界上海绵集中分布的海域之一, 多年来南海海绵一直是被研究的海洋天然产物化学研究热点生物之一^[4]。早在 1933 年, 美国耶鲁大学的 Bergmann 教授开始对海绵的化

收稿日期: 2021-04-27

接受日期: 2021-07-07

基金项目: 上海市科委地方院校能力建设项目(19050502000)

* 通信作者 Tel: 86-015692165885; E-mail: jhgan@shou.edu.cn

学成分进行研究,从中得到了甾体类成分。1951年,他从海绵 *Phyllospongia* sp. 中分离获得了 spongothymidine 和 spongouridine 等核苷类化合物;后来的抗病毒药阿糖腺苷和抗癌药阿糖胞苷就是 spongothymidine 的合成类似物^[5,6]。从海绵研究中获得 laulimalide、peloruside A、salicylhalimide A、variolins、dictyodendrins 已作为抗肿瘤药进入临床前研究^[7]。

本文的研究对象杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. 属寻常海绵纲(Demospongiae),网角海绵目(Dictyoceratida),角骨海绵科(Spongiidae)海绵^[8]。目前,国内外有很多课题组对该种海绵进行了系列研究报道,从中分离得到许多结构新颖的次生代谢产物,包括二倍半萜类、甾体类、二苯基醚类、甘油糖脂类和神经酰胺类等化合物^[9]。其中含有独特的四环或五环 scalarane 型的二倍半萜类和甾体类化合物占大多数。但其生物活性研究报道较少,为了更好地阐明 *Phyllospongia* sp. 中具有生物活性的成分,本实验综合运用各种现代色谱和光谱技术,对提取物的石油醚和二氯甲烷部位分离的化合物进行了研究,并进行细胞毒活性的筛选,丰富了 *Phyllospongia* sp. 的成分,为后续该海绵的活性成分的开发与利用奠定了基础。

1 材料与amp;方法

Q-Tof micro YA019 型液质联用仪、Bruker AV-600 型核磁共振仪、Waters 1525/2996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);EYELAN-2000 型旋转蒸发器;Sephadex LH-20 凝胶柱(美国 Pharmacia 公司);层析硅胶(200~300目)、TLC 高效薄层层析板(烟台江友硅胶开发有限公司);甲醇、乙腈、正己烷(色谱纯,美国 Promptar 公司);二氯甲烷、甲烷、石油醚、乙酸乙酯、丙酮(分析纯,上海化学试剂公司);氘代试剂(上海思域化工科技有限公司);显色剂用 10% 硫酸香兰素溶液。

MCF-7(人乳腺癌细胞株)、HT-29(人结肠癌细胞株)、Hep-2(人喉癌上皮细胞株)(上海交通大学细胞中心);HF 90 CO₂ 培养箱(上海力升科学仪器);Nikon Eclipse 倒置显微镜,LDZM 位式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);Spark 多功能酶标仪试剂(瑞士 Tecan 公司);离心机(上海贝克曼库尔特仪器设备);胎牛血清、DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司);青链霉素混合液、PBS、MTT、胰酶(上海鼎国生物技术有限公司)。

杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. (XS-2019. 12) 样品于 2019 年 12 月采自中国南海西沙永兴岛附近,种属名称经上海交通大学林厚文教授和本文作者之一张红军教授鉴定为 *Phyllospongia* 属海绵(*Phyllospongia foliascens*)。标本(XS-2019. 12)存放于上海海洋大学食品学院。

1.1 提取与分离

将冷冻的杯叶海绵(*Phyllospongia* sp., 干重 2.0 kg)切碎后,用丙酮超声 1 h 提取共 3 次;每次用二氯甲烷:甲醇(1:1)混合溶剂超声 1.5 h 提取,共 3 次。合并提取液,减压浓缩得到总浸膏 32.0 g,将其混悬分散于 90% 的甲醇溶液中,用石油醚萃取 3 次,浓缩萃取液得到石油醚部位浸膏(12.5 g);再加水将混悬液的甲醇浓度调整至 65%,用二氯甲烷萃取 3 次,浓缩萃取液得到二氯甲烷部位浸膏(6.3 g)。将石油醚部位浸膏进行减压硅胶柱色谱,二氯甲烷-甲醇(100:1→5:1)梯度洗脱,根据 TLC 显色合并相似流分得到 7 个组分 Fr. a ~ Fr. g。对组分 Fr. e 进行正相硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯(100:1→5:1)梯度洗脱,根据 TLC 显色合并相似流分得到 5 个组分(Fr. e1 ~ Fr. e5)。其中 Fr. e-3(13.7 mg)以 95% 甲醇-水(含 0.1% 甲酸,2 mL/min,UV 254 nm)经高效液相色谱洗脱,得到化合物 1(1.5 mg, $t_R = 35$ min)、2(2.5 mg, $t_R = 38$ min)和 3(1.9 mg, $t_R = 47$ min)。Fr. e-4(18.5 mg)以 90% 甲醇-水(含 0.1% 甲酸,2 mL/min,UV 254 nm)经高效液相色谱洗脱,得到化合物 4(2.4 mg, $t_R = 32$ min)和 5(2.7 mg, $t_R = 39$ min)。将二氯甲烷部位浸膏按照上述同样的方法,经 HPLC 检测合并得到 5 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 5),其中 Fr. 3(20.4 mg)以 75% 甲醇-水(2 mL/min,UV 254 nm)经制备液相色谱洗脱,得到化合物 6(2.3 mg, $t_R = 19$ min)、7(1.3 mg, $t_R = 26$ min)和 8(2.5 mg, $t_R = 34$ min)。

1.2 细胞毒活性筛选

将 MCF-7、HT-29 和 Hep-2 细胞株用含 10% 新生胎牛血清的 DMEM 完全培养基培养,37 °C,5% CO₂ 培养箱培养至细胞覆盖率达 85% 以上时传代,生长状态良好的细胞用于实验研究^[10]。用 MTT 法检测化合物对 MCF-7、HT-29 和 Hep-2 细胞的抑制作用,将三种细胞进行细胞计数后接种于 96 孔板内(体积为 100 μL/孔),设相应浓度的溶媒对照孔,然后加入不同浓度的受试药物 100 μL/孔,每个浓度设 3 个复孔,空白组加入等量含 0.1% DMSO 的培

培养基^[11]。以顺铂为阳性对照,在培养箱中培养 48 h 后用 MTT 法检测细胞生长情况。取出细胞培养板,倒置显微镜下观察细胞形态。每孔加入 10 μL MTT,置培养箱中继续培养 4 h。弃去 MTT,然后在 DMSO 中溶解^[12]。用酶标仪在测定 550 nm 处的 OD 值,计算 IC_{50} ,试验反复进行 3 次。

2 实验结果

2.1 结构鉴定

从杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. 的石油醚和二氯甲烷萃取部位首次分离鉴定了 8 个甾体类化合物 (1~8) (见图 1)。

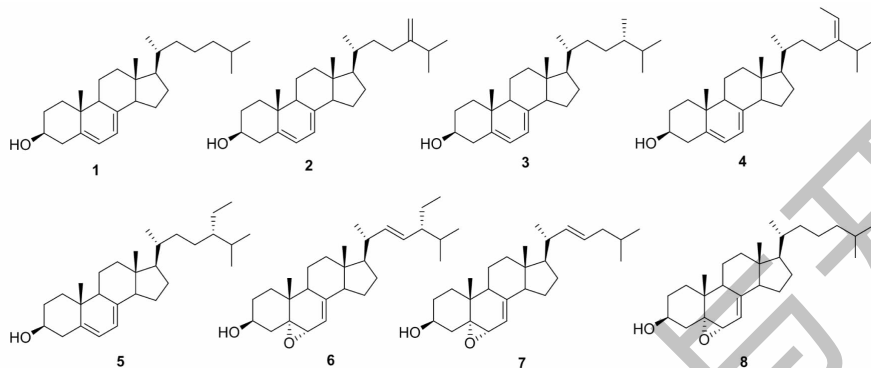


图 1 化合物 1~8 的结构式

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-8

化合物 1 白色粉末 (MeOH); mp. 149 ~ 151.5 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 6.5$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 385.6 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$; 确定相对分子量为 384, 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.65 (m, H-3), 2.47 (br d, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.29 (t, $J = 12.0$ Hz, H-4b), 5.58 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-6), 5.40 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 0.63 (s, H-18), 0.96 (s, H-19), 0.95 (d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.5 (C-8), 46.3 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.2 (C-12), 42.9 (C-13), 54.5 (C-14), 23.0 (C-15), 28.1 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 16.3 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 34.6 (C-22), 31.1 (C-23), 156.9 (C-24), 33.8 (C-25), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 106.0 (C-28)。以上数据与文献^[14]报道一致, 鉴定化合物 1 为 cholesta-5,7-dien-3 β -ol。

化合物 2 白色粉末 (MeOH); mp. 103 ~ 105 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 9.8$ (c 0.5, CHCl_3); ESI-MS: m/z 397.6 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$; 确定相对分子量为 396, 分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.64 (m, H-3), 2.48 (br d, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.29 (t, $J = 12.0$ Hz, H-4b), 5.58 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-6), 5.40 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 0.63 (s, H-18), 0.95 (s, H-19), 0.95

(d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.07 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 4.72 (m, H-28) 4.66 (m, H-28); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.5 (C-8), 46.3 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.2 (C-12), 42.9 (C-13), 54.5 (C-14), 23.0 (C-15), 28.1 (C-16), 55.9 (C-17), 11.8 (C-18), 16.3 (C-19), 36.2 (C-20), 18.8 (C-21), 34.6 (C-22), 31.1 (C-23), 156.9 (C-24), 33.8 (C-25), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 106.0 (C-28)。以上数据与文献^[14]报道一致, 鉴定化合物 2 为 ergosta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol。

化合物 3 白色粉末 (MeOH); mp. 173 ~ 174 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 78.3$ (c 0.06, CHCl_3); ESI-MS: m/z 399.7 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$; 确定相对分子量为 398, 分子式 $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.64 (m, H-3), 2.48 (br d, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.29 (t, $J = 12.0$ Hz, H-4b), 5.58 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-6), 5.39 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 0.63 (s, H-18), 0.96 (s, H-19), 0.95 (d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.79 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.5 (C-8), 46.2 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.2 (C-12), 42.9 (C-

13), 54.5 (C-14), 23.0 (C-15), 28.1 (C-16), 55.7 (C-17), 11.8 (C-18), 16.3 (C-19), 36.5 (C-20), 19.0 (C-21), 33.6 (C-22), 30.6 (C-23), 39.1 (C-24), 31.5 (C-25), 20.5 (C-26), 17.6 (C-27), 15.4 (C-28)。以上数据与文献^[15]报道一致, 鉴定化合物 **3** 为 ergosta-5,7-dien-3 β -ol。

化合物 4 白色粉末 (MeOH); mp. 135 °C; $[\alpha]_D^{25} + 4.9$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 411.3 $[M + H]^+$; 确定相对分子量为 410, 分子式 $C_{29}H_{46}O$ 。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.65 (m, H-3), 2.48 (br d, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.29 (t, $J = 12.0$ Hz, H-4b), 5.58 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-6), 5.40 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 0.64 (s, H-18), 0.96 (s, H-19), 1.02 (d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.00 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 5.20 (m, H-28), 1.58 (d, $J = 6.6$ Hz, H-29); ¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.5 (C-8), 46.2 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.2 (C-12), 42.9 (C-13), 54.5 (C-14), 23.1 (C-15), 28.1 (C-16), 55.7 (C-17), 11.8 (C-18), 16.3 (C-19), 36.8 (C-20), 18.9 (C-21), 35.2 (C-22), 25.8 (C-23), 146.9 (C-24), 34.8 (C-25), 22.2 (C-26), 22.1 (C-27), 115.6 (C-28), 13.2 (C-29)。以上数据与文献^[16]报道一致, 鉴定化合物 **4** 为 (24*E*)-stigmasta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol。

化合物 5 白色粉末 (MeOH); mp. 144.5 °C; $[\alpha]_D^{25} + 40$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 413.7 $[M + Na]^+$; 确定相对分子量为 412, 分子式 $C_{29}H_{48}O$ 。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.65 (m, H-3), 2.48 (br d, $J = 12.0$ Hz, H-4a), 2.29 (t, $J = 12.0$ Hz, H-4b), 5.58 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-6), 5.40 (br d, $J = 5.7$ Hz, H-7), 0.63 (s, H-18), 0.96 (s, H-19), 0.97 (d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, H-28); ¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 38.4 (C-1), 32.0 (C-2), 70.5 (C-3), 40.8 (C-4), 139.8 (C-5), 119.6 (C-6), 116.3 (C-7), 141.5 (C-8), 46.2 (C-9), 37.0 (C-10), 21.1 (C-11), 39.2 (C-12), 42.9 (C-13), 54.5 (C-14), 23.1 (C-15), 28.1 (C-16), 55.7 (C-17), 11.8 (C-18), 16.3 (C-19), 36.8 (C-20), 18.9 (C-21), 35.2 (C-22), 25.8 (C-23), 146.9 (C-24), 34.8 (C-25), 22.2 (C-26), 22.1 (C-27), 115.6

(C-28), 13.2 (C-29)。以上数据与文献^[17]报道一致, 鉴定化合物 **5** 为 stigmasta-5,7-dien-3 β -ol。

化合物 6 白色粉末 (MeOH); mp. 130 ~ 132 °C; $[\alpha]_D^{25} + 14.9$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 427.4 $[M + H]^+$; 确定相对分子量为 426, 分子式 $C_{29}H_{46}O_2$ 。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.08 (tt, $J = 11.0$, 5.0 Hz, H-3), 3.63 (br d, $J = 4.6$ Hz, H-6), 5.36 (m, H-7), 0.60 (s, H-18), 1.09 (s, H-7), 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 5.16 (dd, $J = 15.2$, 8.6 Hz, H-22), 5.05 (dd, $J = 15.2$, 8.6 Hz, H-23), 0.83 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27), 0.85 (t, $J = 6.6$ Hz, H-29); ¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 33.0 (C-1), 30.9 (C-2), 67.7 (C-3), 39.5 (C-4), 76.0 (C-5), 73.7 (C-6), 117.6 (C-7), 144.0 (C-8), 43.5 (C-9), 37.2 (C-10), 23.0 (C-11), 39.3 (C-12), 43.8 (C-13), 54.8 (C-14), 22.1 (C-15), 28.2 (C-16), 55.9 (C-17), 12.3 (C-18), 18.8 (C-19), 40.7 (C-20), 20.9 (C-21), 137.8 (C-22), 129.8 (C-23), 51.2 (C-24), 31.8 (C-25), 21.4 (C-26), 18.9 (C-27), 25.4 (C-28), 12.5 (C-29)。以上数据与文献^[18]报道一致, 鉴定化合物 **6** 为 5 α ,6 α -epoxystigmasta-7,22-dien-3 β -ol。

化合物 7 白色粉末 (MeOH); mp. 219 ~ 220 °C; $[\alpha]_D^{25} + 21$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 384.6 $[M + H]^+$; 确定相对分子量为 383, 分子式 $C_{27}H_{42}O_2$ 。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.08 (tt, $J = 11.0$, 5.0 Hz, H-3), 3.63 (br d, $J = 4.6$ Hz, H-6), 5.36 (m, H-7), 0.60 (s, H-18), 1.09 (s, H-7), 1.03 (d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 5.21 (dd, $J = 15.2$, 8.6 Hz, H-22), 5.30 (dd, $J = 15.2$, 8.6 Hz, H-23), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, H-25), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26); ¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 33.0 (C-1), 30.9 (C-2), 67.7 (C-3), 39.5 (C-4), 76.0 (C-5), 73.7 (C-6), 117.6 (C-7), 144.0 (C-8), 43.5 (C-9), 37.2 (C-10), 22.9 (C-11), 39.2 (C-12), 43.8 (C-13), 54.8 (C-14), 22.1 (C-15), 28.0 (C-16), 55.9 (C-17), 12.3 (C-18), 18.8 (C-19), 40.4 (C-20), 21.0 (C-21), 137.6 (C-22), 126.7 (C-23), 42.0 (C-24), 28.6 (C-25), 22.3 (C-26), 22.3 (C-27)。以上数据与文献^[19]报道一致, 鉴定化合物 **7** 为 5 α ,6 α -epoxycholest-7,22-dien-3 β -ol。

化合物 8 白色粉末 (MeOH); mp. 237 ~ 239 °C; $[\alpha]_D^{25} + 9.8$ (c 0.1, MeOH); ESI-MS: m/z 401.3

$[M + H]^+$; 确定相对分子量为 400, 分子式 $C_{27}H_{44}O_2$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.09 (tt, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-3), 3.64 (br d, $J = 4.6$ Hz, H-6), 5.37 (m, H-7), 0.60 (s, H-18), 1.09 (s, H-7), 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz, H-21), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, H-26), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, H-27); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 33.0 (C-1), 30.8 (C-2), 67.7 (C-3), 39.4 (C-4), 76.0 (C-5), 73.7 (C-6), 117.5 (C-7), 144.1 (C-8), 43.5 (C-9), 37.1 (C-10), 22.9 (C-11), 39.3 (C-12), 43.9 (C-13), 54.7 (C-14), 22.0 (C-15), 27.7 (C-16), 56.2 (C-17), 12.1 (C-18), 18.8 (C-19), 36.1 (C-20), 18.8 (C-21), 36.0 (C-22), 23.9 (C-23), 39.5 (C-24), 28.0 (C-25), 22.5 (C-26), 22.8 (C-27)。以

表 1 各化合物对 MCF-7、HT-29 和 Hep-2 的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} of compound against MCF-7, HT-29 and Hep-2

化合物 Compound	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		
	MCF-7	HT-29	Hep-2
1	8.8 \pm 1.5	> 83	46.3 \pm 2.2
2	10.3 \pm 0.7	27.8 \pm 1.1	10.6 \pm 1.0
3	> 83	> 83	> 83
4	36.5 \pm 1.9	> 83	25.1 \pm 1.3
5	47.1 \pm 1.3	42.2 \pm 1.6	54.6 \pm 2.5
6	> 83	> 83	> 83
7	3.9 \pm 1.2	38.6 \pm 1.4	41.5 \pm 1.9
8	> 83	> 83	> 83
顺铂 Cisplatin ^a	6.0 \pm 1.1	10.6 \pm 1.3	6.3 \pm 0.5

注:^a 阳性对照药。

Note:^a Positive control.

3 结论

本文对采自我国南海西沙群岛的杯叶海绵 *Phyllospongia* sp. 进行了化学成分研究,首次从石油醚和二氯甲烷部位中分离得到 8 个甾体类化合物,并采用 MTT 法测试了其对 MCF-7(人乳腺癌细胞)、HT-29(人结肠癌细胞)和 Hep-2(人喉癌上皮细胞)的细胞毒活性试验,其中化合物 1、3、4、6、8 对人结肠癌细胞 HT-29 毒活性较弱, IC_{50} 均大于 83 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 1、2、7 对 MCF-7 的细胞毒活性显著, IC_{50} 分别为 8.8、10.3、3.9 $\mu\text{mol/L}$; 化合物 2 对 Hep-2 的细胞毒活性较好, IC_{50} 为 10.6 $\mu\text{mol/L}$ 。实验结果表明化合物 7 的细胞毒活性优于阳性对照药顺铂组,由于该化合物的含量较少,且未有文献报道显著活性,故有望通过结构修饰或有机合成发展成为新的抗肿瘤药物的潜力。这些工作进一步对南海西沙海绵资源和生物活性的考察和研究,寻求高效低毒的新的抗肿瘤化学结构和先导化合物提供了参考依据。

上数据与文献^[20]报道一致,鉴定化合物 8 为 $5\alpha,6\alpha$ -epoxycholest-7-en-3 β -ol。

2.2 细胞毒活性实验结果

检测化合物对 MCF-7、HCT-116 和 Hep-2 的细胞毒活性,镜下观察可见,化合物 3、6 和 8 组细胞生长形态规则,破碎不明显,其余各化合物不同剂量组细胞形态不规则出现细胞破碎等现象,阳性对照顺铂组细胞出现明显的细胞破碎现象。各化合物对以上三种细胞的 IC_{50} 值如表 1 所示。化合物 7 对 MCF-7 具有显著的细胞毒活性, IC_{50} 值为 3.9 $\mu\text{mol/L}$,顺铂为阳性对照 ($IC_{50} = 6.0 \mu\text{mol/L}$); 化合物 2 对 Hep-2 有较好的细胞毒活性, IC_{50} 值为 10.6 $\mu\text{mol/L}$,顺铂为阳性对照 ($IC_{50} = 6.3 \mu\text{mol/L}$)。

参考文献

- 1 Krasko A, Lorenz B, Batel R, et al. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin [J]. FEBS J, 2010, 267:4878-4887.
- 2 Wang X, Yu H, Zhang Y, et al. Bioactive pimarane-type diterpenes from marine organisms [J]. Chem Biodivers, 2018, 15(1):12-14.
- 3 Kywa B, Pilla B, Jfsa B, et al. Four new polyhydroxylated steroids from the South Sea sponge *Phyllospongia* sp. [J]. Chin J Nat Med(中华自然医学杂志), 2020, 18:844-849.
- 4 Shikov AN, Flisyuk EV, Obluchinskaya ED, et al. Pharmacokinetics of marine-derived drugs [J]. Mar Drugs, 2020, 18(11):557.
- 5 Bergmann W, Feeney RJ. Marine products. XXXII. the nucleosides of sponges. I [J]. J Org Chem, 1951, 16:981-987.
- 6 Bergmann W, Burke DC. Marine products. XL. the nucleosides of sponges. IV. spongine [J]. J Org Chem, 1956, 21

- (10):226-268.
- 7 Hamel E, Day BW, Miller JH, et al. Synergistic effects of peboruside a and laulimalide with taxoid site drugs, but not with each other, on tubulin assembly [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70:1555-1564.
 - 8 Nicholas WJ, Catherine BJ, Ryan G. A first exploration of genome size diversity in sponges [J]. *Genome*, 2013, 56:451-456.
 - 9 Houssen WE, Jaspars M. Isolation of marine natural products [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 864:367-392.
 - 10 Urbina JA, Concepcion JL, Montalvetti A, et al. Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate(WC-9) against *trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas' disease [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47:2047-2050.
 - 11 Zhang JP, Yan HJ, Wang YL, et al. Indole alkaloids from *Alstonia macrophylla* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:622-626.
 - 12 Medina JM, Rodrigues JF, Souza W, et al. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes [J]. *Parasitology*, 2012, 139:1253-1265.
 - 13 Lajili S, Deghrigue M, Abdelhamid A, et al. Anticancer activity of diterpenes and steroids from *Eunicella singularis* against two and three dimensional breast cancer cell models [J]. *J Coastal Life Med*, 2017, 5:531-539.
 - 14 Lira R, Contreras LM, Rita RMS, et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2001, 47:537-546.
 - 15 Ngoc NT, Huong PTM, Nguyen VT, et al. Cytotoxic steroids from the vietnamese soft coral *Sinularia conferta* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2017, 65:300-305.
 - 16 Barrero AF, Oltra JE, Poyatos JA, et al. Phycomysterols and other sterols from the fungus *Phycomyces blakesleeanus* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61:1491-1496.
 - 17 Bu M, Cao T, Li H, et al. Synthesis and biological evaluation of novel steroidal 5 α , 8 α -endoperoxide derivatives with aliphatic side-chain as potential anticancer agents [J]. *Steroids*, 2017, 124:46-53.
 - 18 Trinh TTV, Truong BN, Doan TMH, et al. New 9 α -Hydroxy-5 α , 6 α -epoxyhydroxysterols from the Vietnamese marine sponge *Ircinia echinata* [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(11):32-35.
 - 19 Tang WZ, Yang ZZ, Sun F, et al. Two new 5,6-epoxysterols from calcareous marine sponge *Leucetta chagosensis* [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33:2970-2976.
 - 20 Medina P, Paillasse MR, Payre B, et al. Synthesis of new alkylaminoxyysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases [J]. *J Med Chem*, 2009, 52:7765-7777.

毛蕊异黄酮通过调节 KLF2 和 MLKL 相互作用增强自噬来改善动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是导致心血管疾病的主要原因。斑块中泡沫细胞和坏死核心的形成是由巨噬细胞中的脂质沉积、细胞凋亡和炎症引起的,这是动脉粥样硬化的标志。巨噬细胞自噬是一个关键的抗动脉粥样硬化过程,自噬缺陷通过促进泡沫细胞形成、细胞凋亡和炎症而加重动脉粥样硬化。因此,增强自噬可能是动脉粥样硬化治疗的一种策略。毛蕊异黄酮是一种来自黄芪的黄酮类化合物,具有抗氧化和抗炎活性,因此有可能降低患心血管疾病的风险。然而,毛蕊异黄酮的抗动脉粥样硬化作用及其相关机制尚不清楚。

来自天津中医药大学第一附属医院的马传瑞及其团队对毛蕊异黄酮的抗动脉粥样硬化作用进行了研究。毛蕊异黄酮可防止动脉粥样硬化,并通过促进自噬增强斑块稳定性,抑制泡沫细胞的形成、炎症和细胞凋亡。MLKL 被证明是一种新的自噬调节剂,可以被 KLF2 负调节。毛蕊异黄酮能够通过调节 KLF2-MLKL 信号通路来改善自噬,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。这项研究证明了毛蕊异黄酮的动脉粥样硬化保护作用是通过上调 KLF2-MLKL 介导的自噬,这不仅提出了对动脉粥样硬化的新机制见解,而且还确定了毛蕊异黄酮作为动脉粥样硬化治疗的潜在候选药物。相关研究成果发表在《British Journal of Pharmacology》杂志上。

胡乃华编译自: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15720>

原文标题: Calycosin ameliorates atherosclerosis by enhancing autophagy via regulating the interaction between KLF2 and MLKL in apolipoprotein E gene-deleted mice