

秃杉中 taiwanins E 和 H 的分离鉴定及除草、细胞毒性研究

周毅峰¹, 黄继光², 孔德宁², 唐巧玉¹, 周利娟^{2*}

¹ 湖北民族大学 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 恩施 445000;

² 华南农业大学 天然农药与化学生物学教育部重点实验室; 华南农业大学植物保护学院, 广州 510642

摘要: 秃杉提取物除草活性筛选结果表明, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙酸乙酯层萃取物对胜红薊的根长和鲜重抑制率均达到100%。通过活性追踪, 利用各种色谱和波谱学方法分离鉴定了2种化合物:taiwanin E(1)和taiwanin H(2)。进一步活性测定结果表明, 化合物1对龙葵和胜红薊具有优异的根长抑制活性, 处理7天后的IC₅₀值分别为6.84和8.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 化合物2对龙葵、马齿苋、薇甘菊、荷莲草的根长IC₅₀值均在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下; 二者对胜红薊的鲜重抑制活性最高, 处理7天后的IC₅₀值分别为24.12和21.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞毒力研究发现taiwanin H能破坏烟草细胞核, 并表现出良好的细胞毒性。化合物1、2的除草活性为首次报道。

关键词: 秃杉;taiwanin E;taiwanin H;除草活性;细胞毒性

中图分类号:S482.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0606-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.008

Isolation and identification of taiwanins E and H from *Taiwania flousiana* Gausseen and their herbicidal activity and cytotoxicity

ZHOU Yi-feng¹, HUANG Ji-guang², KONG De-ning², TANG Qiao-yu¹, ZHOU Li-juan^{2*}

¹ Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

² Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University; College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: The herbicidal activity of the extract of *Taiwania flousiana* Gausseen was evaluated by the cup method. Results showed that the fraction of ethyl acetate at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ completely inhibited the growth of *Ageratum conyzoides* L. The inhibition rates of root length and fresh weight were 100%. Two active ingredients were isolated and identified by the bioassay-guided isolation. Further, the inhibition rates of root length and fresh weight of the two active ingredients were investigated on 19 weed species. Results showed that taiwanin E showed significant activities on the root length of *Solanum nigrum* L. and *A. conyzoides* and the IC₅₀ values of 7 d after the treatment were 6.84 and 8.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The IC₅₀ values of 7 d after the treatment of taiwanin H on *S. nigrum*, *Portulaca oleracea* L., *Mikania micrantha* Kunth and *Drymaria diandra* Blume were less than 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As far as the fresh weight was concerned, the two active ingredients showed the best activity on *A. conyzoides* and the IC₅₀ values of 7 d after the treatment were 24.12 and 21.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Generally, the two active ingredients were more active on the broadleaves than the grass weeds and taiwanin H showed a better activity than taiwanin E. Cytotoxicity studies revealed that taiwanin H could destroy the nucleus of the tobacco BY-2 cells and showed cytotoxicity. The herbicidal activities of taiwanins H and E, belonging to lignans, were firstly reported.

Key words: *Taiwania flousiana* Gausseen; taiwanin E; taiwanin H; herbicidal activity; cytotoxicity

从植物中寻找活性物质是农药创制的重要途径之一, 如拟除虫菊酯类、新烟碱类杀虫剂, 三酮类除

收稿日期:2021-10-08 接受日期:2022-01-18

基金项目:生物资源保护与利用湖北省重点实验室2020年开放基金(PT012001); 广东省自然科学基金(2018A0303130093)

*通信作者 Tel:86-015917363981; E-mail:zhoulj@scau.edu.cn

草剂的先导化合物均来自植物。秃杉(*Taiwania flousiana* Gausseen)(异名:*Taiwania cryptomerioides* Hayata), 又名台湾杉, 属柏科台湾杉属, 常绿高大乔木, 具有较高的用材和观赏价值, 天然分布于中国湖北西部、云南西部及贵州东南部等地区, 具有多种多样的生物活性。He等^[1]较早对秃杉的生物活性开

展研究,发现秃杉对盐水虾、埃及伊蚊具有杀虫活性,对肿瘤细胞具有抑制作用。随后,陆续报道了秃杉精油和提取物的抗菌、杀螨、抗白蚁、抗炎以及抗肿瘤活性^[2-5]。在成分研究方面,秃杉心材精油、嫩枝精油、叶片精油、茎皮精油等均已被分离鉴定^[6,7],并已从其提取物中分离鉴定了木脂素^[8]、倍半萜^[9]、二萜^[10]、三萜^[11]、酚类和糖苷^[12]等化学成分。但对于该植物的除草活性,尚未见研究报道。本课题组在除草活性植物筛选中,发现秃杉具有明显的抑制杂草生长的作用,并对该植物提取物展开研究,旨在为植物源除草剂的研发提供理论参考,同时促进秃杉的综合开发利用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试植物材料

秃杉(树龄35年左右)植物茎皮于2019年9月采集于湖北省恩施自治州利川市境内,经湖北民族大学易咏梅教授鉴定为秃杉(*Taiwania flousiana*),凭证标本(BRPU-20190908)保存于湖北民族大学生物资源保护与利用湖北省重点实验室。

1.1.2 供试杂草

反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.)、胜红薊(*Aggeratum conyzoides* L.)、薇甘菊(*Mikania micrantha* Kunth)、三叶鬼针草(*Bidens pilosa* L.)、凹头苋(*Amaranthus lividus* L.)、马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)、苣荬菜(*Sonchus arvensis* L.)、黄鹌菜(*Youngia japonica* (L.) DC.)、鳢肠(*Eclipta prostrata* (L.) L.)、小飞蓬(*Conyza canadensis* (L.) Cronq)、荷莲莢草(*Drymaria diandra* Blume)、荔枝草(*Salvia plebeia* R. B.)、青葙(*Celosia argentea* L.)、一点红(*Emilia sonchifolia* (L.) DC)、龙葵(*Solanum nigrum* L.)、车前草(*Plantago asiatica* L.)、光头稗(*Echinochloa colonum* (L.) Link)、牛筋草(*Eleusine indica* (L.) Gaertn)、水蜈蚣(*Kyllinga brevifolia* Rottb)等杂草(经华南农业大学周利娟教授鉴定)种子采集于华南农业大学教学科研基地,成熟种子采集回来后晾干密封保存待用。

1.1.3 供试细胞

烟草BY-2细胞(*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2)由香港中文大学生命科学学院姜里文教授馈赠,取回后于华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室细胞培养室培养备用。

1.2 仪器与试剂

薄层层析硅胶板(GF₂₅₄)和柱层析硅胶(80~100目、100~200目、200~300目)(青岛海洋化工厂,中国);葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20, Pharmacia公司,美国);伊文思蓝(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,中国);纤维素酶R-10、果胶酶Y-23(广州康凯信生物科技有限公司,中国)。其他常用溶剂如石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、甲醇等为市售分析纯。

DRX-600超导核磁共振仪(Bruker公司,瑞士);6540 UHD Q-TOF质谱仪(安捷伦科技有限公司,美国);Axio Imager M2荧光显微镜(卡尔·蔡司公司,德国);SB-1100旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社,日本);智能人工气候箱RXZ型(宁波江南仪器制造厂,中国);暗箱三用紫外分析仪ZF-7型(上海嘉鹏科技有限公司,中国);摇床、电热恒温水浴锅HWS24(上海一恒科学仪器有限公司,中国);紫外分光光度计mini/240型(岛津公司,日本);ZF-7A手提紫外检测灯(上海豪分仪器有限公司,中国)。

1.3 方法

1.3.1 提取与分离

秃杉茎皮采集后先阴干(92 kg),再置于烘箱内加热60℃干燥,粉碎过40目筛。植物干粉采用5倍体积(V/m)甲醇浸提,每次提取48 h,重复3次,滤液合并后浓缩,得到甲醇提取物。提取物经少量甲醇溶解,加4倍体积去离子水悬浮后,依次用石油醚、乙酸乙酯各萃取3次,合并浓缩得到石油醚层(110 g)、乙酸乙酯层(650 g)萃取物。

乙酸乙酯层萃取物经硅胶柱层析(三氯甲烷/甲醇=1:0→0:1)划分为9段样品Fr. 1~Fr. 9。Fr. 3(165 g)再进行正相硅胶柱层析(石油醚/丙酮=99:1→50:50),TLC检测合并后得到10段样品Fr. 3.1~Fr. 3.10。其中,Fr. 3.2(6.6 g)采用反相中压柱层析(甲醇/水=40%→100%)得到Fr. 3.2.1~Fr. 3.2.4共4个组分,其中第2组分(Fr. 3.2.2)用葡聚糖凝胶净化,氯仿:甲醇=1:1洗脱,得到化合物**1**(34 mg)和化合物**2**(23 mg)。

1.3.2 除草活性测定

采用改进的小杯法进行。准确取一定量的供试物质,用少量二甲基亚砜溶解,去离子水稀释定容,配制成一定浓度的溶液待用。将供试杂草种子用15%的次氯酸钠浸泡15 min后,用清水清洗数次直

到闻不到次氯酸钠气味为止,然后用 200 μg/mL 的赤霉素浸泡 24 h,清洗干净。在培养皿里铺一层滤纸,加水保湿,然后将处理好的种子分开撒到湿润的滤纸上,置于人工气候箱中培养,待种子露白后进行测定。

测定时以六孔细胞培养板为容器,每孔吸取配制好的供试药液 2 mL,加入 2 层直径约 0.4 cm 的小玻璃珠,将露白的种子均匀平铺到小玻璃珠上,种子与液面刚好接触。然后用保鲜膜覆盖,每孔扎 4 个小孔,防止水分蒸发并保持透气。每处理 20 粒种子,3 次重复,对照用相同含量的有机溶剂进行处理。处理后置于温度 25 ± 1 °C,光周期(16:8)的人工气候箱中培养,7 天后观察根部生长情况和植株的整体状况,并拍照,称量鲜重(g),用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量根长(mm)。

按公式(1)、(2)计算根长抑制率和鲜重抑制率。

$$\text{根长抑制率} = \frac{\text{对照根长} - \text{处理根长}}{\text{对照根长}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{鲜重抑制率} = \frac{\text{对照鲜重} - \text{处理鲜重}}{\text{对照鲜重}} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 烟草细胞毒性测定

1.3.3.1 烟草 BY-2 细胞的培养

烟草悬浮细胞培养参照文献^[13]进行,并稍作调整:在 MS 液体培养基中补充 30 g/L 蔗糖、0.1 g/L 肌醇、1 × 10⁻³ g/L 维生素 B1、2 × 10⁻³ g/L KH₂PO₄ 和 2 × 10⁻⁴ g/L 的 2,4-二氯苯氧乙酸为悬浮细胞培养基,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 5.8,培养液分装到 250 mL 的锥形瓶中,每瓶 50 mL 培养液,120

℃ 灭菌 30 min。25 °C、130 r/min 摆床黑暗条件下振荡培养。每 6 天悬浮细胞与新鲜培养基按 1:10 继代一次。取生长约 3 ~ 4 天处于对数生长期的细胞进行试验。

1.3.3.2 烟草细胞死亡率测定

不同浓度药剂处理对数生长期的细胞后,PBS 清洗 3 次,1 000 r/min 离心弃去上清液,参照文献^[14]的方法测定细胞死亡情况。对照用含有相同数量的溶剂处理,重复 3 次。

1.3.3.3 细胞形态观察

药剂处理后,将烟草 BY-2 细胞用 PEM 缓冲液(100 mmol/L PIPES、10 mmol/L EGTA 和 10 mmol/L MgSO₄,pH = 6.8)清洗,DAPI 染色,再在荧光显微镜下用 DAPI 通道观察。DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)是一种 DNA 特异性染料,可透过完整的细胞膜,对细胞核进行有效的染色。

2 结果与分析

2.1 秃杉的除草活性

以双子叶杂草胜红蓟、单子叶杂草牛筋草为对象测定了秃杉及不同萃取层提取物的除草活性。结果表明,200 μg/mL 秃杉甲醇提取物表现出较高的除草活性,对胜红蓟的根长抑制率和鲜重抑制率在 90.00% 左右,对牛筋草的活性稍低,根长和鲜重抑制率在 70.00% 以上。经过萃取分层后,弱极性的石油醚层和强极性的水层除草活性较差,而中等极性的乙酸乙酯层表现出良好的除草活性,100 μg/mL 乙酸乙酯层萃取物对胜红蓟的根长抑制率和鲜重抑制率均达到 100.00%,对牛筋草的鲜重抑制率也达到 80.00% 以上(见表 1)。

表 1 秃杉提取物对胜红蓟和牛筋草的抑制作用

Table 1 Inhibition of *Taiwania flousiana* extracts against *Ageratum conyzoides* and *Eleusine indica*

提取物 Extract	胜红蓟 <i>Ag. conyzoides</i>		牛筋草 <i>El. indica</i>	
	根长抑制率 Inhibition rate of root length (%)	鲜重抑制率 Inhibition rate fresh weight (%)	根长抑制率 Inhibition rate of root length (%)	鲜重抑制率 Inhibition rate fresh weight (%)
石油醚层 Petroleum ether fraction	62.38 ± 3.16 ^c	54.71 ± 1.84 ^c	46.59 ± 1.53 ^b	38.79 ± 3.35 ^c
乙酸乙酯层 Ethyl acetate fraction	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	68.57 ± 3.22 ^a	80.62 ± 2.16 ^a
水层 Water fraction	33.19 ± 3.72 ^d	38.41 ± 2.19 ^d	27.33 ± 1.82 ^c	20.67 ± 2.56 ^d
甲醇粗提物 Methanol crude extract	87.57 ± 0.17 ^b	90.12 ± 1.89 ^b	71.26 ± 2.25 ^a	76.34 ± 1.63 ^b

注:萃取层供试浓度为 100 μg/mL,粗提物供试浓度为 200 μg/mL。表中同列数据后随上标小写字母相同者示经方差分析在 5% 水平上差异不显著(DMRT 法),下同。

Note: The concentration of fraction and extract were 100 and 200 μg/mL, respectively. Analysis of variance showed no significant difference at 5% level with the same superscript lowercase letters in the same column (DMRT), the same below.

2.2 化合物鉴定

化合物 1 白色粉末; 分子式为 $C_{20}H_{12}O_7$, ESI-MS: m/z 365.2 [M + H]⁺。¹H NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.43(s, 1H, 4-OH), 7.61(s, 1H, H-5), 7.00(d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 5.35(s, 2H, H-11), 6.16(d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H-13), 6.83(s, 1H, H-2'), 6.81(d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-5'), 6.69(dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H, H-6'), 6.11(d, *J* = 11.6 Hz, 2H, H-7'); ¹³C NMR(150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 169.4(C-12), 148.7(C-6), 148.3(C-7), 146.8(C-4'), 146.6(C-3'), 145.4(C-4), 131.1(C-9), 129.9(C-1), 128.8(C-1'), 124.6(C-10), 123.7(C-3), 122.3(C-6'), 119.2(C-2), 110.9(C-5'), 107.8(C-2'), 102.4(C-8), 102.0(C-5), 101.0(C-7'), 98.1(C-13), 66.6(C-11)。以上数据与文献^[15]报道的基本一致, 故该化合物鉴定为 taiwanin E(结构式见图 1)。

化合物 2 白色粉末; 分子式为 $C_{20}H_{16}O_7$, ESI-MS: m/z 369.4 [M + H]⁺。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 7.64(1H, s, H-5), 7.02(1H, s, H-8), 6.82(1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 6.67(1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 6.54(1H, dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, H-6'),

表 2 Taiwanins E 和 H 对 19 种杂草根长和鲜重抑制情况(7 天)

Table 2 The inhibition of root length and fresh weight of taiwanins E and H on 19 kinds of weeds (7 d)

杂草种类 Weed	Taiwanin E		Taiwanin H	
	根长抑制率 Inhibition rate on root length (%)	鲜重抑制率 Inhibition rate on fresh weight (%)	根长抑制率 Inhibition rate on root length (%)	鲜重抑制率 Inhibition rate on fresh weight (%)
反枝苋 <i>A. retroflexus</i>	74.56 ± 0.40 ^{bc}	50.24 ± 1.95 ^b	100.00 ± 0.00 ^a	70.52 ± 3.65 ^b
胜红蓟 <i>Ag. conyzoides</i>	100.00 ± 0.00 ^a	70.58 ± 0.77 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	68.98 ± 3.22 ^b
薇甘菊 <i>M. micrantha</i>	70.66 ± 2.90 ^c	18.72 ± 2.78 ^{hi}	100.00 ± 0.00 ^a	61.02 ± 0.34 ^c
马齿苋 <i>P. oleracea</i>	94.36 ± 0.47 ^a	46.56 ± 2.77 ^{bc}	100.00 ± 0.00 ^a	64.26 ± 0.65 ^c
荷莲草 <i>D. diandra</i>	100.00 ± 0.00 ^a	4.49 ± 2.00 ^{lm}	100.00 ± 0.00 ^a	62.60 ± 2.24 ^c
荔枝草 <i>S. plebeia</i>	22.42 ± 4.24 ^h	41.59 ± 0.37 ^d	100.00 ± 0.00 ^a	40.11 ± 1.10 ^e
龙葵 <i>So. nigrum</i>	100.00 ± 0.00 ^a	5.33 ± 1.72 ^{lm}	100.00 ± 0.00 ^a	39.88 ± 0.73 ^e
车前草 <i>Pl. asiatica</i>	33.45 ± 2.53 ^g	23.37 ± 1.44 ^{fgh}	100.00 ± 0.00 ^a	59.78 ± 1.66 ^c
凹头苋 <i>Am. lividus</i>	40.09 ± 1.20 ^{fg}	40.41 ± 1.30 ^d	91.88 ± 1.03 ^b	80.62 ± 1.76 ^a
三叶鬼针草 <i>B. pilosa</i>	55.63 ± 1.84 ^d	39.51 ± 2.33 ^d	78.56 ± 2.79 ^c	42.14 ± 1.34 ^e
苣荬菜 <i>S. arvensis</i>	51.97 ± 3.15 ^{de}	25.37 ± 1.03 ^{efg}	62.99 ± 3.99 ^d	8.83 ± 1.32 ^{gh}
小飞蓬 <i>C. canadensis</i>	46.37 ± 2.71 ^{ef}	12.26 ± 1.63 ^{jk}	59.89 ± 2.31 ^d	58.13 ± 1.23 ^{cd}
水蜈蚣 <i>K. brevifolia</i>	22.23 ± 3.40 ^h	42.02 ± 2.05 ^{cd}	53.65 ± 1.76 ^e	26.09 ± 3.06 ^f
鳢肠 <i>E. prostrata</i>	35.82 ± 2.50 ^g	20.93 ± 1.13 ^{gh}	53.08 ± 1.84 ^e	7.74 ± 2.69 ^h
牛筋草 <i>El. indica</i>	70.49 ± 1.11 ^c	14.96 ± 0.85 ^{ij}	50.24 ± 3.37 ^{ef}	27.90 ± 1.47 ^f
一点红 <i>Em. sonchifolia</i>	14.75 ± 2.62 ^{ij}	29.47 ± 1.46 ^e	47.10 ± 2.03 ^{fg}	41.24 ± 0.66 ^e

5.36(2H, s, H-11), 3.93(3H, s, 6-OCH₃), 3.63(3H, s, 7-OCH₃); ¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 167.0(C-12), 153.1(C-4'), 150.9(C-3'), 147.8(C-6), 145.0(C-7), 143.4(C-4), 130.6(C-9), 129.5(C-1), 127.2(C-6'), 126.8(C-1'), 123.3(C-10), 121.4(C-3), 117.6(C-2), 116.3(C-5'), 116.0(C-2'), 107.8(C-8), 100.0(C-5), 60.9(C-11), 56.5(6-OCH₃), 56.1(7-OCH₃)。以上数据与文献^[16]报道的基本一致, 故该化合物鉴定为 taiwanin H。

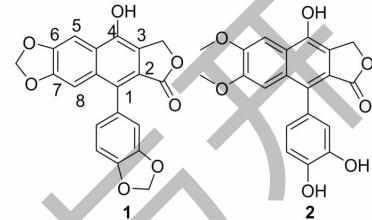


图 1 化合物 1 和 2 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

2.3 Taiwanins E 和 H 的除草活性

为明确 taiwanins E 和 H 的除草谱, 测定了 taiwanin E 和 taiwanin H 在 50 μ g/mL 的浓度下对 19 种杂草的根长和鲜重抑制情况, 结果见表 2。

续表2(Continued Tab. 2)

杂草种类 Weed	Taiwanin E		Taiwanin H	
	根长抑制率 Inhibition rate on root length(%)	鲜重抑制率 Inhibition rate on fresh weight(%)	根长抑制率 Inhibition rate on root length(%)	鲜重抑制率 Inhibition rate on fresh weight(%)
	55.73 ± 2.74 ^d	2.28 ± 1.10 ^m	38.03 ± 2.92 ^{hi}	38.50 ± 0.79 ^e
光头稗 <i>Ec. colonum</i>	7.63 ± 1.51 ^j	21.74 ± 1.45 ^{gh}	34.55 ± 1.87 ⁱ	13.99 ± 1.09 ^g
黄鹌菜 <i>Y. japonica</i>	47.52 ± 3.41 ^e	4.46 ± 1.46 ^{lm}	16.90 ± 1.46 ^j	53.92 ± 1.19 ^d
青葙 <i>Ce. argentea</i>				

注:供试浓度为 50 μg/mL。

Note: The concentration was 50 μg/mL.

从表 2 可以看出, 50 μg/mL 处理后 7 天, taiwanin H 对反枝苋、胜红薊、薇甘菊、马齿苋、荷莲荳草、荔枝草、龙葵和车前草等 8 种杂草的根长抑制率为 100.00%, 对凹头苋、反枝苋、胜红薊、荷莲荳草、薇甘菊和马齿苋的鲜重抑制率超过 60.00%, 表现出良好除草活性。taiwanin E 对胜红薊、荷莲荳草和龙葵的根长抑制率为 100.00%, 对马齿苋的根长抑制率超过 90.00%。从鲜重抑制情况来看, 50 μg/

mL 的 taiwanin E 对胜红薊的鲜重产生了明显的抑制, 抑制率为 70.58%。在供试的 19 种杂草中, taiwanin H 整体上比 taiwanin E 表现出了更高的除草活性。

进一步测定了 taiwanin H 和 taiwanin E 对几种代表性杂草的根长和鲜重抑制中浓度, 结果见表 3 和表 4。

表 3 Taiwanin H 对几种杂草鲜重和根长抑制作用的毒力回归方程(7 天)

Table 3 The toxicity regression equation of fresh weight and root length of taiwanin H against several weeds (7 d)

测定指标 Index	杂草 Weed	回归方程 Regression equation	IC ₅₀ (μg/mL)	95% 置信限 95% Confidence limit		R	χ ²	df	P
				95% 置信限 95% Confidence limit	R				
鲜重 Fresh weight	胜红薊 <i>Ag. conyzoides</i>	$y = 2.7145 + 1.7203x$	21.31	18.09 ~ 25.10	0.9742	122.576	4	< 0.001	
	荷莲荳草 <i>D. diandra</i>	$y = 2.8555 + 1.4434x$	30.60	25.24 ~ 37.09	0.9893	103.000	4	< 0.001	
	龙葵 <i>So. nigrum</i>	$y = 2.5489 + 1.3564x$	64.13	52.20 ~ 78.78	0.9843	91.987	4	< 0.001	
	马齿苋 <i>P. oleracea</i>	$y = 3.2643 + 1.1985x$	28.07	22.46 ~ 35.08	0.9951	72.973	4	< 0.001	
	反枝苋 <i>A. retroflexus</i>	$y = 3.2700 + 1.2593x$	23.65	19.13 ~ 29.23	0.9948	80.773	4	< 0.001	
	薇甘菊 <i>M. micrantha</i>	$y = 3.4873 + 1.0713x$	25.82	20.20 ~ 33.01	0.9891	60.057	4	< 0.001	
	牛筋草 <i>El. indica</i>	$y = 2.4033 + 1.1737x$	163.10	126.23 ~ 210.74	0.9924	46.517	4	< 0.001	
	光头稗 <i>Ec. colonum</i>	$y = 2.9158 + 1.0190x$	111.02	85.73 ~ 143.76	0.9888	53.924	4	< 0.001	
根长 Root length	胜红薊 <i>Ag. conyzoides</i>	$y = 3.6468 + 1.2702x$	11.62	9.40 ~ 14.38	0.9950	79.478	4	< 0.001	
	荷莲荳草 <i>D. diandra</i>	$y = 3.2382 + 1.8187x$	9.31	7.97 ~ 10.86	0.9848	136.147	4	< 0.001	
	龙葵 <i>So. nigrum</i>	$y = 3.4382 + 1.7909x$	7.45	6.32 ~ 8.78	0.9837	124.750	4	< 0.001	
	马齿苋 <i>P. oleracea</i>	$y = 3.1940 + 1.9314x$	8.61	7.41 ~ 9.99	0.9697	140.304	4	< 0.001	
	反枝苋 <i>A. retroflexus</i>	$y = 3.7541 + 1.1359x$	12.50	9.84 ~ 15.88	0.9794	65.999	4	< 0.001	
	薇甘菊 <i>M. micrantha</i>	$y = 3.6212 + 1.4328x$	9.17	7.59 ~ 11.08	0.9931	94.705	4	< 0.001	
	牛筋草 <i>El. indica</i>	$y = 2.6288 + 1.4106x$	47.97	39.62 ~ 58.09	0.9907	94.934	4	< 0.001	
	光头稗 <i>Ec. colonum</i>	$y = 2.7712 + 1.2345x$	63.89	51.11 ~ 79.88	0.9845	74.795	4	< 0.001	

表 3 结果表明, taiwanin H 对胜红薊、反枝苋、薇甘菊、马齿苋的鲜重抑制作用明显, 其 IC₅₀ 值均在 30 μg/mL 以下, 而对两种禾本科杂草牛筋草和光头稗的 IC₅₀ 值超过 100 μg/mL。对几种供试杂草根长的抑制作用也表现出类似的规律。

表 4 结果表明, taiwanin E 对胜红薊鲜重表现出较好的抑制活性, 其次是反枝苋和马齿苋, 对荷莲荳草、龙葵、光头稗的鲜重 IC₅₀ 值超过 400 μg/mL; 而从根长抑制情况来看, 除对光头稗效果稍低外, 对其它几种杂草均表现出较明显的抑制作用, IC₅₀ 值大

表 4 Taiwanin E 对几种杂草鲜重和根长抑制作用的毒力回归方程(7 天)

Table 4 The toxicity regression equation of fresh weight and root length of taiwanin E against several weeds (7 d)

测定指标 Index	杂草 Weed	回归方程 Regression equation	IC ₅₀ (μg/mL)	95% 置信限 95% Confidence limit	R	χ^2	df	P
鲜重 Fresh weight	胜红蓟 <i>Ag. conyzoides</i>	$y = 3.3474 + 1.1955x$	24.12	18.32 ~ 31.74	0.9890	72.248	4	< 0.001
	荷莲草 <i>D. diandra</i>	-	>400	-	-	-	-	-
	龙葵 <i>So. nigrum</i>	-	>400	-	-	-	-	-
	马齿苋 <i>P. oleracea</i>	$y = 2.6826 + 1.3411x$	53.46	43.71 ~ 65.33	0.9905	86.054	4	< 0.001
	反枝苋 <i>A. retroflexus</i>	$y = 2.4985 + 1.5235x$	43.85	36.0 ~ 52.52	0.9898	103.567	4	< 0.001
	薇甘菊 <i>M. micrantha</i>	$y = 1.4098 + 1.6196x$	164.69	138.37 ~ 196.02	0.9942	118.625	4	< 0.001
	牛筋草 <i>El. indica</i>	$y = 1.5798 + 1.4722x$	210.49	175.00 ~ 253.18	0.9874	102.298	4	< 0.001
	光头稗 <i>Ec. colonum</i>	-	>400	-	-	-	-	-
根长 Root length	胜红蓟 <i>Ag. conyzoides</i>	$y = 3.6085 + 1.4762x$	8.76	7.28 ~ 10.55	0.9880	100.038	4	< 0.001
	荷莲草 <i>D. diandra</i>	$y = 3.7340 + 1.2301x$	10.70	8.61 ~ 13.28	0.9859	77.492	4	< 0.001
	龙葵 <i>So. nigrum</i>	$y = 3.6415 + 1.6265x$	6.84	5.69 ~ 8.23	0.9964	112.233	4	< 0.001
	马齿苋 <i>P. oleracea</i>	$y = 3.5774 + 1.3970x$	10.43	8.60 ~ 12.65	0.9962	94.682	4	< 0.001
	反枝苋 <i>A. retroflexus</i>	$y = 3.6914 + 1.0863x$	16.02	12.46 ~ 20.58	0.9876	62.613	4	< 0.001
	薇甘菊 <i>M. micrantha</i>	$y = 3.5942 + 1.1294x$	17.57	13.69 ~ 22.55	0.9870	64.951	4	< 0.001
	牛筋草 <i>El. indica</i>	$y = 3.4408 + 1.1923x$	20.31	15.78 ~ 26.14	0.9937	68.721	4	< 0.001
	光头稗 <i>Ec. colonum</i>	$y = 3.2730 + 1.0771x$	40.12	30.49 ~ 52.79	0.9965	60.74	4	< 0.001

都在 20 μg/mL 以下。

2.4 Taiwanin H 对烟草 BY-2 细胞的活性

进一步采用伊文思蓝染色法测定了 taiwanin H 对烟草 BY-2 细胞的离体生物活性, 结果见图 2 和图 3。

从图 2 可以看出, 烟草细胞死亡率与 taiwanin H 之间表现出了明显的剂量效应关系, 其毒力回归方程为 $y = 2.4575 + 1.7673x, R = 0.9676, LC_{50}$ 为 27.46 μg/mL ($\chi^2 = 122.589, df = 4, P < 0.001$)。相应地, 随着浓度升高, 被染成蓝色的细胞核也明显增多(见图 3)。

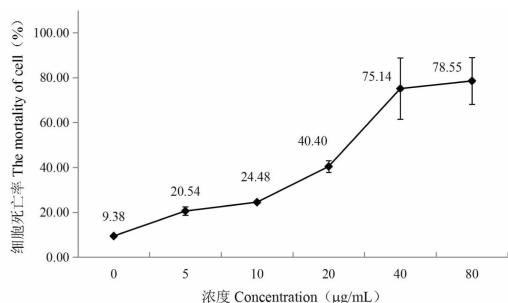


图 2 不同浓度 taiwanin H 处理后烟草细胞的死亡情况(24 h)

Fig. 2 Mortality of BY-2 cells after treated by taiwanin H (24 h)

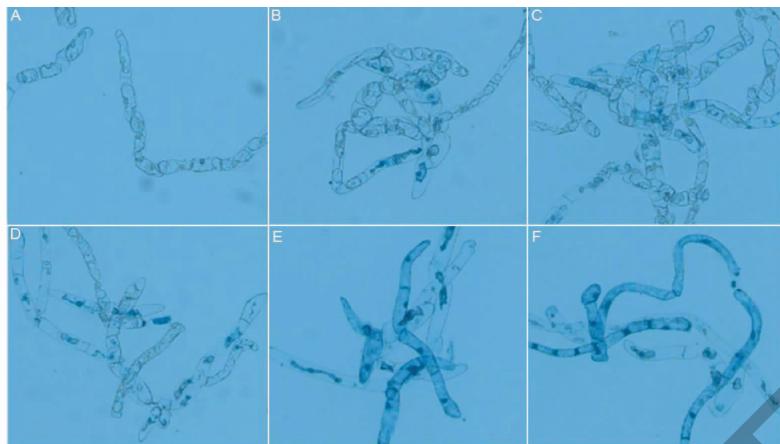


图3 Taiwanin H 处理后烟草细胞染色图(24 h,160 \times)

Fig. 3 The graphs of BY-2 cell staining treated with taiwanin H (24 h,160 \times)

注:A 表示对照,B~F 分别为 5、10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 taiwanin H 处理。下同。Note: A: Control; B-F indicated 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ taiwanin H, respectively. The following is the same.

进一步通过荧光显微镜观察发现, taiwanin H 处理后, 细胞核呈现不规则形状, 细胞核变得分散或

扁长型, 颗粒化的细胞越来越多, 说明 taiwanin H 对烟草细胞细胞核有破坏作用(见图 4)。

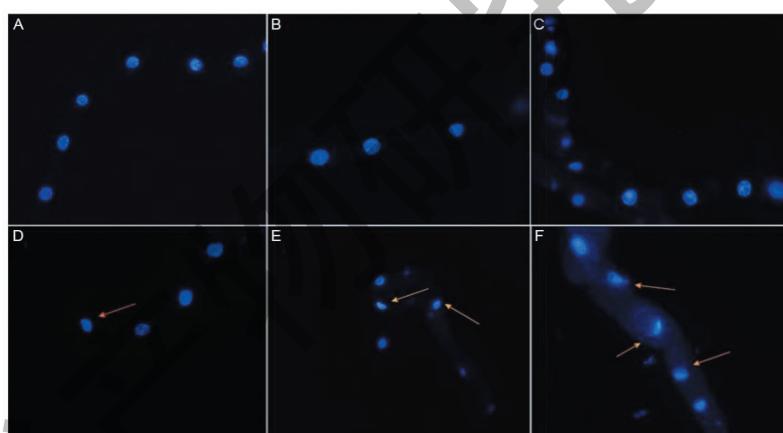


图4 Taiwanin H 处理 48 h 对烟草细胞核的形态影响(48 h,200 \times)

Fig. 4 The nucleus appearance shape effect of BY-2 cell treated with taiwanin H (48 h,200 \times)

3 讨论与结论

秃杉是一种高大乔木, 该树木具有较好的防腐性能, 研究发现其具有抗真菌、抗细菌、抗白蚁、抗螨虫和细胞活性, 这说明该植物中含有多种多样的次生代谢物。本文发现该植物提取物具有除草活性, 并通过活性追踪从中分离出 taiwanin E 和 taiwanin H 两种活性成分, 进一步为该植物的综合开发利用提供了理论依据。

目前尚未见 taiwanin H 的生物活性研究报道, 而 taiwanin E 对肺癌、乳腺癌、结肠腺癌等肿瘤细胞具有抑制活性。除草活性研究发现二者对几种供试

杂草均表现出一定的根长和鲜重抑制作用, 其对阔叶杂草的活性比对禾本科的高, 而 taiwanin H 的活性整体上优于 taiwanin E。Taiwanin E 和 taiwanin H 同为木脂素类化合物, 二者结构差别不大, 推测其活性存在差异的原因可能与 taiwanin H 含有的羟基较多、水溶性较强有关。而在对肿瘤细胞的活性比较中, 含有 1 个羟基的 taiwanin E 比没有羟基的 taiwanin C(4 位上没有羟基, 其余相同)具有更高的细胞活性^[17], 也表现出类似的规律。

本文是首次研究和报道秃杉以及化学成分 taiwanin E、taiwanin H 的除草活性。对于 taiwanin H,

只从秃杉(柏科台湾杉属)和分布于约旦北部的芸香科植物 *Haplophyllum buxbaumii*^[16] 中分离得到,研究较少。Taiwanin E 的研究较多,先后从秃杉、爵床科爵床属植物爵床 (*Justicia procumbens*)、野靛棵 (*Justicia patentiflora*),柏科扁柏属的红桧 (*Chamaecyparis formosaensis*)、五加科五家属植物白簕 (*Eleutherococcus trifoliatus*) 枝条等植物中分离得到^[18,19]。Taiwanin E 以及其他木脂素类化合物的抗肿瘤活性受到众多关注^[20],然而,目前所使用的除草剂类农药品种,结构类别上并无木脂素类化合物,本研究可望为除草剂的研发提供新的结构模板参考,同时丰富植物源除草剂的研究内容,也为含有这两种成分的植物资源开发利用提供理论依据。

Taiwanin E 和 taiwanin H 作为除草剂的开发应用已获得专利授权,它们对其他有害生物是否也具有生物活性,以及秃杉中是否还含有其他活性成分,还需进一步研究。

参考文献

- He K, Zeng L, Shi G, et al. Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides* [J]. J Nat Prod, 1997, 60(1):38-40.
- Ho CL, Yang SS, Chang TM, et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and anti-wood-decay fungal activities of the twig essential oil of *Taiwania cryptomerioides* from Taiwan [J]. Natl Prod Commun, 2012, 7:261-264.
- Chen YH, Lin CY, Yen PL, et al. Antifungal agents from heartwood extract of *Taiwania cryptomerioides* against brown root rot fungus *Phellinus noxius* [J]. Wood Sci Technol, 2017, 51:639-651.
- Liu HM, Huang JG, Yang SF, et al. Chemical composition, algicidal, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Taiwania flousiana* Gaussen [J]. Molecules, 2020, 25(4):967.
- Chang ST, Chen PF, Wang SY, et al. Antimite activity of essential oils and their constituents from *Taiwania cryptomerioides* [J]. J Med Entomol, 2001, 38:455-457.
- Chang ST, Wang DSY, Wu CL, et al. Cytotoxicity of extractives from *Taiwania cryptomerioides* heart-wood [J]. Phytochemistry, 2000, 55:227-232.
- Ho C, Yang S, Chang T, et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and anti-wood-decay fungal activities of the twig essential oil of *Taiwania cryptomerioides* from Taiwan [J]. Nat Prod Commun, 2012, 7:261-264.
- Chyu CF, Kuo YH. New lignans from the roots of *Taiwania cryptomerioides* Hayata [J]. Helv Chim Acta, 2007, 90:738-747.
- Chyu CF, Ke MR, Chang YS. New cadinane-type sesquiterpenes from the roots of *Taiwania cryptomerioides* Hayata [J]. Helv Chim Acta, 2007, 90:1514-1521.
- Chyu CF, Lin HC, Kuo YH. New abietane and seco-abietane diterpenes from the roots of *Taiwania cryptomerioides* [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(1):11-14.
- Kuo YH, Chang CI. Podocarpane-type trinorditerpenes from the bark of *Taiwania cryptomerioides* [J]. J Nat Prod, 2000, 63:650-652.
- Xiang Y, Yang SP, Zhan ZJ, et al. Terpenoids and phenols from *Taiwania flousiana* [J]. Acta Bot Sin, 2004, 46:1002-1008.
- Iakimova ET, Yordanova ZP, Cristescu SM, et al. Cell death signaling and morphology in chemical-treated tobacco BY-2 suspension cultured cells [J]. Environ Exp Bot, 2019, 164: 157-169.
- Cheng DD, Jia YJ, Gao HY, et al. Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells [J]. Physiol Plant, 2011, 141(2):117-129.
- Kim T, Jeong KH, Kang KS, et al. An optimized and general synthetic strategy to prepare arylnaphthalene lactone natural products from cyanophthalides [J]. Eur J Org Chem, 2017, 2017, 1704-1712.
- Yousef A, Musa A, Salim S, et al. A arylnaphthalene lignan from *Haplophyllum buxbaumii* [J]. Phytochemistry, 1998, 49: 1779-1781.
- Chang ST, Wang SY, Kuo YH. Resources and bioactive substances from Taiwania (*Taiwania cryptomerioides*) [J]. J Wood Sci, 2003, 49(1):1-4.
- Susplugas S, Nguyen VH, Bignon J, et al. Cytotoxic arylnaphthalene lignans from a Vietnamese Acanthaceae, *Justicia patentiflora* [J]. J Nat Prod, 2005, 68:734-738.
- Wang HC, Tseng YH, Wu HR, et al. Anti-proliferation effect on human breast cancer cells via inhibition of pRb phosphorylation by taiwanin E isolated from *Eleutherococcus trifoliatus* [J]. Nat Prod Commun, 2014, 9:1303-1306.
- Ma LM, Yang JL. Research advance of anti-tumor components of *Zanthoxylum* genus [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32:334-340.