

北青龙衣细胞毒活性部位中的萘酚苷

刘丽娟¹, 王常禹², 麻风华² (1.黑龙江大学制药工程系, 哈尔滨 150080; 2.黑龙江省药品检验所, 哈尔滨 150001)

摘要: 目的 研究北青龙衣细胞毒活性部位中的化学成分。方法 利用 MTT 法测定北青龙衣醇提取物经大孔树脂柱色谱得到的 4 个组分对胃癌细胞 BGC803 的细胞毒作用, 对其中活性最强的 30% 乙醇洗脱部位经硅胶柱色谱和反相硅胶柱色谱进行化学成分的分离。结果 得到 4 个萘酚苷类化合物并经核磁共振谱确定了它们的结构, 分别为 1,4,5-三羟基萘-1,4-二-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(1), 1,4,5-三羟基萘-1,5-二-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(2), 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(3), 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- β -*D*-[6'-*O*-(3",4",5"-三羟基苯甲酰)] 吡喃葡萄糖苷(4)。结论 北青龙衣细胞毒活性部位中含有萘酚苷类化合物, 可能在其抗肿瘤活性中起重要作用。

关键词: 北青龙衣; 细胞毒; 萘酚苷

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)08-0704-05

基金项目: 黑龙江省科技厅青年科技创新基金(QC07C65); 黑龙江省教育厅青年基金(11531279); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金(2008RFQXS106)

作者简介: 刘丽娟, 女, 博士, 副教授

Tel: (0451)86609936

E-mail: liulijuan1972@yahoo.com.cn

Naphthalenyl Glucosides from the Cytotoxic Portion of the Fresh Rejuvenated Fruits of *Juglans Mandshurica*

LIU Lijuan¹, WANG Changyu², MA Fenghua²(1.Department of Pharmacy, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2.Heilongjiang Provincial Institute for Drug Control, Harbin 150001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical components of the cytotoxic portion of the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica*. **METHODS** The cytotoxicity of four elutes from macro-porous resin chromatography was estimated by MTT assay against human stomach BGC803 cancer cells. The 30% ethanol elute showing the strongest activities was isolated by silica gel chromatography and reverse phase silica gel chromatography. **RESULTS** 1,4,5-trihydroxynaphthalene-1,4-di-*O*- β -*D*-glucopyranoside(1), 1,4,5-trihydroxynaphthalene-1,5-di-*O*- β -*D*-glucopyranoside(2), 1,4,8-trihydroxynaphthalene-1-*O*- β -*D*-glucopyranoside(3), 1,4,8-trihydroxynaphthalene-1-*O*- β -*D*-[6'-*O*-(3",4",5"-trihydroxybenzoyl)] glucopyranoside(4) were isolated and their structures were determined by NMR spectrum. **CONCLUSION** There are naphthalenyl glucosides in the cytotoxic portion of fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica* and they may play a significant role in its antitumor activities.

KEY WORDS: the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica*; cytotoxicity; naphthalenyl glucosides

北青龙衣为胡桃科(Juglandaceae)植物胡桃楸(*Juglans mandshurica* MAXIM.)的未成熟外果皮,民间常用来治疗癌症、皮肤病以及作为止痛剂来应用。北青龙衣在 20 世纪 80 年代起就在临床上治疗胃癌、食管癌等消化道癌症,均取得了满意的效果^[1-2]。之后,陆续有其粗提物、多糖等成分抗肿瘤的研究报道^[3-4]。除此之外,北青龙衣在镇痛、抑制脂肪酶活性方面亦有报道^[5-6]。笔者曾对北青龙衣的化学成分和生物活性进行了初步的研究,从中分离鉴定了 23 个酚苷,并对这些化合物细胞毒的作用进行了初步评价,且用其中的胡桃苷 B 为指标成分进行了含量测定方法的研究^[7-11]。为进一步确定北青龙衣的活性部位和药效物质基础,笔者利用 MTT 法测定北青龙衣醇提取物经大孔树脂柱色谱得到的 4 个组分对胃癌细胞 BGC803 的细胞毒作用,并对其中活性最强的 30%乙醇洗脱部位进行化学成分的研究,经硅胶柱色谱、制备液相柱色谱进行分离纯化,结果得到 4 个萘酚苷类化合物并经核磁共振谱确定了它们的结构,分别为 1,4,5-三羟基萘-1,4-二-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(1)^[8], 1,4,5-三羟基萘-1,5-二-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(2)^[8], 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷(3)^[12], 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- β -*D*-[6'-*O*-(3",4",5"-三羟基苯甲酰)]吡喃葡萄糖苷(4)^[13]。

1 仪器与试剂

¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱用 JEOL ECP-500 测定。制备型高效液相色谱仪为 JASCO PU-2080 型,配有 Shodex RI-101 示差检测器,色谱柱为 Senshupak pegasil ODS 柱。硅胶 Kieselgel 60(E.

Merck 公司), ODS 反相硅胶(Fuji Silysia Chemical Ltd.), AB-8 型大孔树脂(天津南开大学化工厂), Sephadex LH-20(日本三菱化学公司)。Immuno-Mini NJ-2300 酶标仪(日本 Inter Med), 96 孔平板(日本 Iwaki Glass), RPMI 1640(美国 GIBCO BRL), 噻唑蓝(MTT)(Sigma)。BGC803 胃癌细胞来自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。药材于 2006 年采自黑龙江省五常县,经黑龙江省药品检验所何丽主管药师鉴定为北青龙衣,凭证标本(2006008)保存在黑龙江大学天然产物研究室。

2 细胞毒活性的测定

2.1 提取物的制备

新鲜的北青龙衣(5 kg) 乙醇 (10 L)浸泡 3 次,每次 2 d,浸渍液浓缩过滤,滤液经 AB-8 大孔树脂柱层析(60 cm×11 cm),依次用水、30%乙醇,70%乙醇,95%乙醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂,所得部位分别为 130, 14, 10, 1.1 g。

2.2 细胞培养及细胞毒活性的测定

BGC803 胃癌细胞培养于 RPMI 1640 基质(含有 10% *L*-谷氨酰胺的胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 盘尼西林, 100 μ g·mL⁻¹ 链霉素)中,细胞被清洗后重新悬浮于上述介质中,浓度为 3×10⁴ 个·mL⁻¹。取 180 μ L 的细胞悬浮液置于 96 孔平板中,在 37℃ 的条件下,5% CO₂ 饱和湿度培养 24 h。然后,把含有样品的 20 μ L 的 EtOH-H₂O(1:9) 溶液加入平板中。空白组中加入 20 μ L 的 EtOH-H₂O(1:9)溶液。细胞再继续培养 72 h,之后采用改良 3-(4,5-二-甲基噻唑-2)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑 (MTT) 还原实验

来测定细胞的生长情况^[14]。10 μL 的 MTT 磷酸盐缓冲液(5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)加到每孔中, 细胞继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 5% CO_2 饱和湿度培养 4 h, 取出后离心 (1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)5 min 以沉淀细胞和 MTT 结晶物。离心后从每孔中取出悬浮液 150 μL , 然后加入 175 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 以溶解 MTT 结晶物。平板置于微型振荡器上混合 10 min, 然后置于酶标仪上在 550 nm 测定。结果见表 1。大孔树脂 4 个洗脱部位在低浓度时水洗脱液的抑制率最弱, 其次是 70%乙醇洗脱液, 30%乙醇洗脱液抑制作用最强。随着浓度的增加, 水洗脱液、70%乙醇洗脱液和 95%乙醇洗脱液的抑制率分别有不同程度的增加, 而 30%乙醇洗脱液变化不大, 说明其 IC_{50} 低于最低浓度 0.63 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其抑制作用最强。95%乙醇洗脱液的抑制效果与 30%乙醇洗脱液相近, 但其回收后所得质量太少, 故选用 30%乙醇洗脱部位进行下一步的化学分离。

表 1 大孔树脂 4 个洗脱部位的细胞毒抑制活性

Tab 1 The cytotoxicity of four elutes from macro-porous resin chromatography

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%			
	水洗 脱部位	30%乙醇 洗脱部位	70%乙醇 洗脱部位	95%乙醇 洗脱部位
0.63	18.8	81.2	24.4	66.2
1.26	23.6	82.8	61.0	80.9
2.52	33.2	81.2	84.3	82.7
5.04	39.8	79.7	86.7	83.2

3 细胞毒活性部位的分离及结构鉴定

3.1 细胞毒活性部位的分离

将前文得到的 30%乙醇洗脱液蒸干(14 g), 经硅胶柱色谱(34 $\text{cm}\times 2\text{ cm}$), 用 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (60 : 30 : 2)洗脱后分为 2 个组分, 组分 1(4 g)经 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱, 用甲醇洗脱得 E(150 mg)、F(1 g)、G(250 mg)、H(500 mg)4 个组分, 分别经反相高效液相色谱进行纯化(20 $\text{mm}\times 150\text{ mm}$, Senshupak pegasil ODS)得到 3 (300 mg), 4(50 mg)。组分 2(8 g)经反相 ODS 柱色谱(36 $\text{cm}\times 2.5\text{ cm}$), 用 40% MeOH 洗脱, 洗脱液分为 A、B、C、D4 个部分, 组分 A(1 g)经硅胶柱色谱, 用 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (60 : 30 : 2)洗脱, 得到 1(80 mg), 2(15 mg)。

3.2 化合物的结构鉴定

化合物 1 为黄色无定形粉末(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): 7.12(1H, d, $J=8.5\text{ Hz}$, H-2),

7.27(1H, d, $J=8.5\text{ Hz}$, H-3), 6.86(1H, dd, $J=7.7, 1.1\text{ Hz}$, H-6), 7.32(1H, dd, $J=8.4, 7.7\text{ Hz}$, H-7), 7.88(1H, dd, $J=8.4, 1.1\text{ Hz}$, H-8), 5.01(1H, d, $J=7.7\text{ Hz}$, H-1'), 3.62(1H, dd, $J=9.0, 7.7\text{ Hz}$, H-2'), 3.51(1H, dd, $J=9.0, 8.8\text{ Hz}$, H-3'), 3.45(1H, overlapped, H-4'), 3.44(1H, m, H-5'), 3.71 (1H, dd, $J=11.7, 5.8\text{ Hz}$, H-6'), 3.89(1H, br.d, $J=11.7\text{ Hz}$, H-6'), 5.04(1H, d, $J=7.7\text{ Hz}$, H-1''), 3.57(1H, dd, $J=9.0, 7.7\text{ Hz}$, H-2''), 3.50(1H, dd, $J=9.0, 8.5\text{ Hz}$, H-3''), 3.45(1H, overlapped, H-4''), 3.46(1H, m, H-5''), 3.74(1H, dd, $J=12.2, 5.2\text{ Hz}$, H-6''), 3.93(1H, dd, $J=12.2, 1.8\text{ Hz}$, H-6'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 150.6(C-1), 111.0(C-2), 112.0(C-3), 150.9(C-4), 154.8(C-5), 112.5(C-6), 128.0(C-7), 114.8(C-8), 130.2(C-9), 117.6(C-10), 103.1(C-1'), 75.1(C-2'), 78.2(C-3'), 71.4(C-4'), 78.2(C-5'), 62.6(C-6'), 105.0(C-1''), 75.1(C-2''), 78.2(C-3''), 71.4(C-4''), 78.7(C-5''), 62.6(C-6'')。

以上数据经与文献对照, 确定其为 1,4,5-三羟基萘-1,4-二-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷^[8]。结构见图 1。

化合物 2 为黄色无定形粉末(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): 7.19(1H, d, $J=8.3\text{ Hz}$, H-2), 6.73(1H, d, $J=8.3\text{ Hz}$, H-3), 7.39(1H, dd, $J=7.8, 1.6\text{ Hz}$, H-6), 7.35(1H, dd, $J=8.1, 7.8\text{ Hz}$, H-7), 8.11(1H, dd, $J=8.1, 1.6\text{ Hz}$, H-8), 4.90(1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, H-1'), 3.59(1H, dd, $J=8.7, 7.8\text{ Hz}$, H-2'), 3.48(1H, overlapped, H-3'), 3.46(1H, overlapped, H-4'), 3.42(1H, m, H-5'), 3.72(1H, dd, $J=12.2, 5.1\text{ Hz}$, H-6'), 3.90(1H, dd, $J=12.2, 2.0\text{ Hz}$, H-6'), 5.10(1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, H-1''), 3.57(1H, dd, $J=9.2, 7.8\text{ Hz}$, 2''), 3.49(1H, overlapped, H-3''), 3.43(1H, overlapped, H-4''), 3.52(1H, m, H-5''), 3.75(1H, dd, $J=12.2, 5.8\text{ Hz}$, H-6''), 3.95(1H, dd, $J=12.2, 2.1\text{ Hz}$, H-6'')。 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 147.5(C-1), 113.9(C-2), 110.8 (C-3), 150.2(C-4), 155.7(C-5), 112.7(C-6), 126.7(C-7), 119.2(C-8), 130.2(C-9), 117.3(C-10), 104.0(C-1'), 75.2(C-2'), 78.2(C-3'), 71.4(C-4'), 78.2(C-5'), 62.6(C-6'), 104.6(C-1''), 75.2(C-2''), 78.2(C-3''), 71.4(C-4''), 78.8(C-5''), 62.6(C-6'')。以上数据经与文献对照, 确定其为 1,4,5-三羟基萘-1,5-二-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷^[8]。结构见图 1。

化合物 3 为白色无定形粉末(甲醇)。 $^1\text{H-NMR}$

(CD₃OD, 500 MHz): 6.69(1H, d, J = 8.5 Hz, H-2), 7.21(1H, d, J = 8.5 Hz, H-3), 6.81(1H, dd, J = 7.7, 1.1 Hz, H-6), 7.26(1H, dd, J = 8.5, 7.7 Hz, H-7), 7.64(1H, dd, J = 8.5, 1.1 Hz, H-8), 4.97(1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.53(1H, dd, J = 9.0, 7.8 Hz, H-2'), 3.49(1H, overlapped, H-3'), 3.42(1H, overlapped, H-4'), 3.48(1H, overlapped, H-5'), 3.73(1H, dd, J = 12.1, 5.8 Hz, H-6'), 3.94(1H, dd, J = 12.1, 2.1 Hz, H-6'). ¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz): 150.6(C-1), 108.4(C-2), 113.0(C-3), 148.7(C-4), 154.8(C-5), 112.2(C-6), 127.1(C-7), 114.7(C-8), 129.0(C-9), 117.9(C-10), 105.4(C-1'), 75.2(C-2'), 78.3(C-3'), 71.5(C-4'), 78.8(C-5'), 62.7(C-6'). 以上数据经与文献对照, 确定其为 1,4,8-三羟基萘-1-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷(**3**)^[10]。结构见图 1。

化合物 **4** 为白色无定形粉末(甲醇)。¹H-NMR

(CD₃OD, 500 MHz): 6.48(1H, d, J = 8.2 Hz, H-2), 7.14(1H, d, J = 8.2 Hz, H-3), 7.63(1H, dd, J = 8.2, 3.1 Hz, H-5), 7.23(1H, dd, J = 8.2, 7.8 Hz, H-6), 6.79(1H, dd, J = 8.2, 3.1 Hz, H-7), 4.95(1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.56(1H, m, H-2'), 3.50(1H, m, H-3'), 3.32(1H, m, H-4'), 3.79(1H, m, H-5'), 4.50(1H, dd, J = 12.0, 6.9 Hz, H-6'), 4.63(1H, dd, J = 12.0, 2.1 Hz, H-6'), 7.16(2H, s, H-2'', H-6'')。 ¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz): 148.6(C-1), 108.4(C-2), 113.4(C-3), 150.6(C-4), 114.7(C-5), 127.1(C-6), 112.2(C-7), 154.7(C-8), 117.8(C-9), 128.9(C-10), 105.3(C-1'), 78.2(C-2'), 75.1(C-3'), 72.0(C-4'), 76.2(C-5'), 64.9(C-6'), 168.3(C-7''), 121.5(C-1''), 110.4(C-2'', C-6''), 146.6(C-3'', C-5''), 140.0(C-4'')。以上数据经与文献对照, 确定其为 1,4,8-三羟基萘-1-*O*-β-*D*-[6'-*O*-(3'',4'',5''-三羟基苯甲酰)]吡喃葡萄糖苷(**4**)^[11]。结构见图 1。

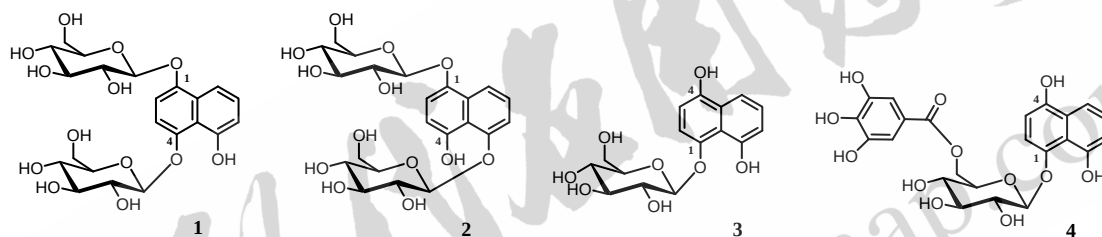


图 1 化合物 1~4 的结构

Fig 1 The structures of compound 1~4

3 讨论

北青龙衣在民间的抗肿瘤应用历史悠久, 经过二十多年的临床验证效果显著, 然而其药效物质基础的研究并没有深入展开。笔者以北青龙衣醇提取物经大孔树脂洗脱的不同组分对 BGC803 胃癌细胞的抑制活性为参考, 初步研究了其活性最强组分的化学组成, 为进一步研究北青龙衣的药效物质基础提供依据。

REFERENCES

- [1] LI Z Y, GAO K B. Clinical observation of Qinglongyi in treatment of 120 cases of esophageal cardia cancer [J]. Info Tradit Chin Med(中医药信息), 1988, (3): 31.
- [2] ZHANG Y P, SU J Z, YANG Z B, et al. Studies on the antitumor effect of juglone [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 1987, 4(3): 166-168.
- [3] JI Y B, MA H T. Effect of Qinglongyi extracts on cell membrane fluidity of tumor-bearing mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35(12): 1387-1390.
- [4] JI C F, XIAO F, JI Y B. Effect of Qinglongyi polysaccharide on sialic acid level, ATPase activity, and membrane potential

in erythrocytes of S₁₈₀ mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(11): 1685-1687.

- [5] DU X, SONG Y X, PENG J H, et al. Study on the analgesic mechanism of the traditional Chinese medicine Qinglongyi [J]. J Harbin Med Univ(哈尔滨医科大学学报), 1997, 31(1): 30-32.
- [6] HAN L K, LI W, NARIMATSU S, et al. Inhibitory effects of compounds isolated from fruit of *Juglans mandshurica* on pancreatic lipase [J]. J Nat Med, 2007, 61(2): 184-186.
- [7] LIU L J, LI W, KOIKE K, et al. New tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(5): 566-569.
- [8] LIU L J, LI W, KOIKE K, et al. Two new naphthalenyl glucosides and a new phenylbutyric acid glucoside from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. Heterocycles, 2004, 63(6): 1429-1436.
- [9] LIU L J, SATO T, KOIKE K, et al. Studies on the cytotoxicity of compounds from fruits of *Juglans mandshurica* [J]. Nat Med, 2004, 58(5): 226-229.
- [10] LIU L J, GAO S Y, LI Q. Isolation of Juglanoside B from the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica* and establishment of its content determination method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 46-48.
- [11] LIU L J, QI F Q, GONG X F. Studies on the cytotoxicity of naphthoquinone derivatives from the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代

应用药), 2010, 27(7): 574-577.

- [12] MIN B, NAKAMURA N, MIYASHIRO H, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and ribonuclease H activities by constituents of *Juglans mandshurica* [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(2): 194-200.
- [13] JOE Y, SON J, PARK S, et al. New naphthalenyl glucosides

from the roots of *Juglans mandshurica* [J]. J Nat Prod, 1996, 59(2): 159-160.

- [14] SARGENT J M, TAYLOR C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. Br J Cancer, 1989, 60(2): 206-210.

收稿日期: 2009-11-19