

通光藤化学成分及抗肿瘤活性研究

何立巍, 陆兔林*, 毛春芹, 杨婧妍(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

摘要: 目的 提取分离并筛选通光藤中具有抗肿瘤活性的化学成分, 并研究其化学结构。方法 系统溶剂法对通光藤药材进行化学部位分离, 并利用色谱法对正丁醇部位中的化学成分进行分离和纯化, 利用波谱学方法鉴定其化学结构。MTT法筛选所得化学成分体外对 8 种人癌细胞增殖的抑制作用。结果 在通光藤正丁醇部位中得到 3 个化学成分单体分别为: 牛奶菜醇(化合物 1)、通光藤苷元 B(化合物 2)、大叶牛奶菜苷丁(化合物 3), 化合物 2 对于 MGC-803 肿瘤细胞抑制作用较强, IC_{50} 为 $80.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而化合物 3 对于 ISMMC-7721 肿瘤细胞液表现出较强抑制作用, IC_{50} 为 $40.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 化合物 2 为首次在该植物中分离到的苷元成分。化合物 2、3 体外对肿瘤细胞具有显著的抑制活性。

关键词: 通光藤; 化学成分; 抗肿瘤

中图分类号: R282.5; R962

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0821-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.012

作者简介: 何立巍, 男, 博士, 副教授 Tel: (025)85811512
((025)85811512 E-mail: lutulin2005@163.com

E-mail: he_lw@163.com

*通信作者: 陆兔林, 男, 博士, 教授 Tel:

中国现代应用药学 2014 年 7 月第 31 卷第 7 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2014 July, Vol.31 No.7

• 821 •

HE Liwei, LU Tulin*, MAO Chunqin, YANG Jingyan(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To isolate and screen the chemical constituents which have anti-tumor activity from *Marsdenia tenacissima*, and to study their structure. **METHODS** Separate chemical site by systemic solvent extraction, then isolate and purify the parts of *n*-butanol by chromatography to identify their chemical structure by spectroscopic methods. Finally, from the obtained constituents, screened the bioactive compounds which had inhibitory effects on eight kinds of human cancer cells proliferation by MTT assay. **RESULTS** Three compounds were separated from *n*-butanol extract portion of *Marsdenia tenacissima*, and were identified as conduritol(compound 1), tenacigenin B(compound 2), marsdekoiside(compound 3). Compound 2 had a strong inhibitory effect to MCG-803 tumor cell, IC_{50} was $80.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Compound 3 had a strong inhibitory effect to ISMMC-7721 tumor cell, IC_{50} was $40.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **CONCLUSION** Compound 2 was first aglycone isolated from *Marsdenia tenacissima*. Compounds 2 and 3 have significant inhibitory activity to tumor cells *in vitro*.

KEYWORDS: *Marsdenia tenacissima*; chemical constituents; antitumor

通光藤始载于《滇南本草》，为萝藦科植物通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥茎、藤、根、叶，具有止咳平喘、消炎镇痛、利乳通尿等功效。现代药理及临床研究结果表明，通光藤具有显著的抗肿瘤活性，对胃癌、肺癌、肝癌等恶性肿瘤具有确切的临床疗效，目前在通光藤中分离得到的化学成分包括 C_{21} 甾体类、多糖类、环醇类和三萜类^[1]等 40 多种。为进一步阐明通光藤抗肿瘤作用的物质基础，本研究对通光藤有效部位中的主要化学成分进行了提取分离和体外抗肿瘤活性研究。

1 仪器与材料

通光藤药材产地为云南建水，经南京中医药大学鉴定教研室陈建伟教授鉴定为萝藦科植物通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥茎、藤。AC-500 型核磁共振仪(瑞士 BRUKER 公司); X-4 型显微熔点测定仪(河南豫华仪器有限公司); D101 大孔吸附树脂(天津农药树脂有限公司); 200-300 目柱层析硅胶(青岛海洋化工分厂)。人癌细胞株: HepG2(人肝癌细胞株), ISMMC-7721(人肝癌细胞株), MGC-803(人胃癌细胞株), BGC-823(人低分化胃腺癌细胞株), A549(人肺癌细胞株), NCI-H460(人大细胞肺癌细胞株), Eca-109(人食道癌细胞株), CaEs-17(人食道癌细胞株), 以上细胞株均由南京中医药大学海洋药物中心药理毒理室细胞库提供。DM1L 型倒置显微镜(德国莱卡公司); SW-CJ-ZFD 型超净工作台(苏净集团安泰公司); Powerwave340 型酶联免疫检测仪(国营华东电子管厂); 3111 型 CO_2 孵箱(Thermo); 96 孔培养板(Corning); RPMI-1640 培养基(美国

Invitrogen 公司, 批号: 20110313); 新生小牛血清(FCS, 中美合资兰州民海生物工程有限公司, 批号: 20110621); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Amresco 公司, 批号: 20101203); 胰蛋白酶(Amresco 公司, 批号: 20110112)。

2 方法与结果

2.1 提取分离

通光藤干燥药材 20 kg, 经适当破碎, 15 倍量 95%乙醇回流提取 2 次, 合并提取液, 回收乙醇, 所得浸膏分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取。取正丁醇层提取物 200 g 进行硅胶柱色谱分离, 氯仿-甲醇梯度洗脱, 各流份反复分离、纯化, 得到化合物 1~3, 重量分别为 15, 8, 32 mg。利用核磁共振波谱学方法进行结构测定。

2.2 结构鉴定

化合物 1: mp $142\sim 143^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_5D_5N): 4.75(2H, d, $J=4.5$ Hz, 2, 3-H), 4.99(2H, d, $J=2.6$ Hz, 4, 1-H), 6.20(2H, br s, 5, 6-H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (C_5D_5N): 130.9(5-C, 6-C), 74.7(2-C, 4-C), 70.9(1-C, 3-C)。经与文献[2]对照, 波谱数据一致, 鉴定为牛奶菜醇(环己烯四醇, conduritol), 结构式见图 1。

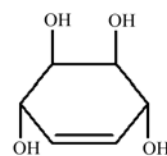


图 1 环己烯四醇结构式

Fig. 1 Structure of conduritol

化合物 2: mp $156\sim 158^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO)中, $\delta 4.8\sim 0$ 可见 32 个质子信号, 结合

^{13}C -NMR(DMSO)21 个碳信号, 其中包括 δ 211.1 羰碳, δ 90~60 间 5 个连氧碳, δ 55~0 间 15 个饱和烷烃信号, 初步推测为 C_{21} 甾体类化合物。 ^1H -NMR: δ 0.90(3H, s), 1.02(3H, s)提示为甾体母核 18, 19 甲基信号, δ 2.18(3H, s)给出另外一孤立甲基信号, 且应与 sp^2 杂化碳相连, δ 4.38(1H)、4.38(1H)、4.13(1H)在 HSQC 中无法找到碳信号的归属, 且在 HMBC 谱中与分别与 δ 73.0, 68.9, 65.2 这 3 个连氧碳远程相关, 提示为甾核 3 个羟基质子信号; δ : 70.9, 69.3 连氧碳在 HMBC、HSQC 谱中均找不到相关点, 提示具有环氧结构。综合以上分析, 并对照文献[3]中报道的波谱数据, 确定该结构为通光藤苷元 B。此苷元为在植物中首次分离得到, 以往报道均为皂苷水解获得, 波谱数据见表 1, 结构式见图 2。

表 1 化合物 2 的 ^{13}C -NMR 数据及文献数据

Tab. 1 ^{13}C -NMR and literature data for compound 2

C	化合物 2(DMSO)	通光藤苷元 B($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
1	37.9	38.3
2	31.9	32.0
3	69.9	69.8
4	38.3	39.4
5	44.1	44.3
6	26.8	27.0
7	24.6	25.1
8	65.3	66.8
9	53.4	51.8
10	38.5	39.4
11	67.9	68.9
12	73.0	75.2
13	46.9	46.2
14	70.9	71.6
15	32.3	32.1
16	27.4	27.2
17	59.4	60.0
18	12.6	13.2
19	17.3	17.0
20	211.0	209.8
21	31.0	29.8

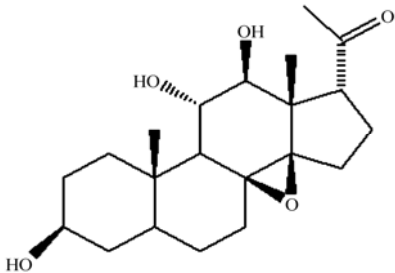


图 2 通光藤苷元 B 结构式

Fig. 2 Structure of tenacigenin B

化合物 3: mp156~158 $^{\circ}\text{C}$, ^1H -NMR(300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 1.16(3H, s, $\text{C}_{19}\text{-CH}_3$), 1.42(3H, d, $J=6.3$ Hz, $\text{C}_{21}\text{-CH}_3$), 1.48, 1.55, 1.59(各 3H, d, $J=6.3$ Hz, 糖上 $\text{C}_6\text{-CH}_3$), 1.86(3H, s, $\text{C}_{18}\text{-CH}_3$), 3.58, 3.61, 3.88(各 3H, s, 糖上 3 位- OCH_3), 4.43(1H, q, $J=6.1$ Hz, $\text{C}_{20}\text{-H}$), 4.71(1H, d, $J=7.5$ Hz, 糖上端基 H), 5.10, 5.19(各 1H, dd, $J=10.0, 2.0$ Hz, 糖上端基 H), 表明有 2 个去氧糖, 且 3 个糖均为 β 构型。将化合物的光谱数据与文献报道[4]对照, 其 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 数据与大叶牛奶菜苷丁(marsdekoiside D)完全一致, 故确定其结构为大叶牛奶菜苷丁, 波谱数据见表 2, 结构式见图 3。

表 2 化合物 3 的 ^{13}C -NMR 数据及文献数据

Tab. 2 ^{13}C -NMR and literature data for compound 3

C	化合物 3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	大叶牛奶菜苷丁	C	化合物 3 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	大叶牛奶菜苷丁
1	37.9	38.3	Cym-1	95.8	96.2
2	29.1	29.7	2	26.5	37.2
3	76.2	77.0	3	77.4	78.2
4	34.3	34.8	4	82.8	83.3
5	45.1	45.5	5	68.0	68.1
6	25.8	25.3	6	18.5	18.5
7	24.6	24.7	OCH3	57.0	58.9
8	76.3	76.0	Cym-1	100.1	100.4
9	47.3	47.1	2	37.0	37.5
10	37.0	36.6	3	77.8	78.2
11	33.5	34.8	4	83.1	83.3
12	73.0	74.0	5	70.2	70.6
13	56.9	57.7	6	18.9	18.7
14	87.2	88.9	OCH3	57.3	58.9
15	32.4	32.9	Cym-1	106.1	106.2
16	33.4	33.9	2	75.0	75.2
17	89.1	87.9	3	88.2	88.5
18	12.5	12.1	4	75.2	75.9
19	14.6	13.0	5	68.9	69.5
20	73.5	72.9	6	18.7	18.7
21	17.7	18.4	OCH3	60.3	60.8

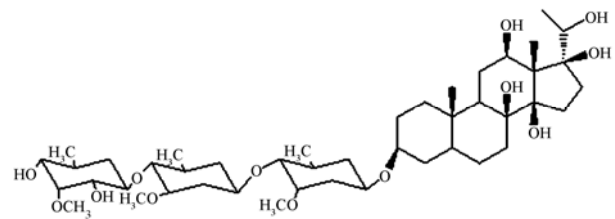


图 3 大叶牛奶菜苷丁结构式

Fig. 3 Structure of marsdekoiside D

2.3 抗肿瘤活性

称取化合物 1~3 各 100 mg, 加入 1 mL 生理

盐水, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min·L⁻¹, 吸取上清液, 浓度为 100 mg·mL⁻¹, 用培养液依次稀释至 2.5 mg·mL⁻¹, 250, 25 μg·mL⁻¹ 备用。MTT 法测定化合物 1~3 样品对 HepG2、ISMMC-7721、

MCG-803、BGC-823、A549、NCI-H460、Eca-109、CaEs-17 8 种细胞株增殖的影响, 以肿瘤细胞抑制率为指标观察其抗肿瘤作用, 计算 IC₅₀, 结果见表 3。

表 3 化合物对 8 种人癌细胞增殖的抑制作用

Tab. 3 The inhibitory effects of chemical constituents on eight kinds of human cancer cells proliferation

化合物	IC ₅₀ /μg·mL ⁻¹							
	HepG2	ISMMC-7721	MCG-803	1BGC-823	A549	NCI-H460	Eca-109	CaEs-17
1	—	—	1 344.0	—	—	6 899.5	—	—
2	855.4	285.9	80.3	489.2	127.7	215.1	—	9 278.3
3	153.8	40.7	157.2	—	427.4	1 903.2	49.6	314.9

3 讨论

通光藤的抗肿瘤疗效确切, 但其抗肿瘤活性物质基础研究报道较少。本次实验在通光藤的主要活性部位中提取得到了 3 个化合物, 分别为 C₂₁ 甾体类和环醇类。通过体外抗肿瘤活性筛选研究结果表明, C₂₁ 甾体类化合物(2, 3)对 7 种人癌细胞均有显著的抑瘤活性($P<0.01$); 说明通光藤 C₂₁ 甾体类化合物具有明显的抗肿瘤活性。对 BGC-823 瘤株作用不明显, 可能与 BGC-823 细胞株为低分化型腺癌有关。本次研究首次在通光藤植物中得到了通光藤昔元 B, 并证明了其抗肿瘤活性, 说明通光藤 C₂₁ 甾体类抗肿瘤的药效团在于其昔元部分, 其构效关系有待深入研究。

REFERENCES

[1] LI H Y, WANG W, DONG F Y. Advances in studies on chemical constituents in stem of *Marsdenia tenacissima* and their pharmacological effects [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(7): 1101-1104.

[2] YUÁN J L, HUANG Y Z. Studies on the constituents of *Marsdenia tenacissima* [J]. Acta Univ Med Tongji(同济医科大学学报), 1997, 26(3): 229-231.

[3] CHEN J J, ZHANG Z X, ZHOU J. New C₂₁ steroidal glycosides from *Marsdenia tenacissima* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 1999, 21(3): 369-377.

[4] BOHN M, HEINZ E, LUTHJE S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn(*Zea mays* L.) roots [J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 387(1): 35-40.

收稿日期: 2013-11-08