

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201507009

陈志勇, 曲彩红, 卢静, 等. 木榄胚轴中一个新生物碱及其抗乙型肝炎病毒活性研究 [J]. 广西植物, 2016, 36(2): 236-239

CHEN ZY, QU CH, LU J, et al. A new antiviral alkaloid from the hypocotyl of *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Guihaia, 2016, 36(2): 236-239

木榄胚轴中一个新生物碱及其抗乙型肝炎病毒活性研究

陈志勇¹, 曲彩红¹, 卢静¹, 程刚¹, 高程海^{2*}

(1. 空军大连通信士官学校, 辽宁 大连 116600; 2. 广西科学院 广西近海海洋科学重点实验室, 南宁 530007)

摘要: 木榄为红树科木榄属植物, 其在广西沿海地区有用作食物的传统, 同时有消炎、治疟疾和清热解毒等功效。该研究以采自广西北仑河口国家级自然保护区的红树木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 胚轴为对象, 应用现代色谱方法 (硅胶柱色谱、制备液相及制备薄层色谱等), 从中分离获得 1 个生物碱类单体化合物。运用光谱分析技术 (HRMS、¹H NMR、¹³C NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC) 鉴定其化学结构, 发现为新化合物, 命名为 Gymnorrhizin A。运用 MTT 法, 发现该化合物在对乙型肝炎病毒表面抗原 (HbsAg) 和乙型肝炎 e 抗原 (HbeAg) 的 50% 抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 4.37 mmol · L⁻¹ 和 4.89 mmol · L⁻¹, 治疗指数 (TI) 分别为 2.68 和 2.40。通过对红树木榄胚轴化学成分进行深入研究, 阐明其中抗乙型肝炎病毒活性物质基础, 为相关新药研发提供了科学依据。

关键词: 天然产物研究, 生物碱, 乙型肝炎病毒表面抗原, 乙型肝炎 e 抗原, 治疗指数

中图分类号: Q946.88, R914.4 文献标识码: A 文章编号: 10000-3142 (2016) 02-0236-04

A new antiviral alkaloid from the hypocotyl of *Bruguiera gymnorrhiza*

CHEN Zhi-Yong¹, QU Cai-Hong¹, LU Jing¹, CHENG Gang¹, GAO Cheng-Hai^{2*}

(1. Dalian Air Force Sergeant School of Communication, Dalian 116600, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: *Bruguiera gymnorrhiza* is a common buttressed tree found in the mangrove forests. The hypocotyl of a mangrove *B. gymnorrhiza* are traditionally used as food and herbal medicine in Guangxi. A new alkaloid (**1**) was isolated from the hypocotyl of a mangrove *B. gymnorrhiza* and purified by repeated column chromatography on silica and HPLC. The structure of Compound **1** was elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis (HRMS, ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HSQC and HMBC). Compound **1** was a new compound by the method of SciFinder scholar, and it showed that anti-Hepatitis B virus (HBV) activity against HbsAg and HbeAg with IC₅₀ values of 4.37 mmol · L⁻¹ and 4.89 mmol · L⁻¹, and TI values of 2.68 and 2.40, respectively. The hypocotyl of a mangrove *B. gymnorrhiza* has been commonly used as crude material of herbal medicine for a long time, and this study would accumulate data for chemical constituents research of the genus.

Key words: natural product research, alkaloid, HbsAg, HbeAg, therapeutic index

木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 为红树科木榄属植物, 主要分布于非洲、东南亚、美洲加勒比海的海岸线沿岸, 在中国主要分布于广东、广西、海南、福建和台湾等地 (高程海等, 2011)。广西沿海城市

收稿日期: 2015-07-11 修回日期: 2015-11-30

基金项目: 广西自然科学基金 (2014GXNSFAA118048, 2015GXNSFBA139195); 广西近海海洋环境科学重点实验室开放基金 (GXKLHY13-06) [Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi (2014GXNSFAA118048; 2015GXNSFBA139195); Guangxi Open Fund For Key Laboratory of Marine Environmental Science (GXKLHY13-06)]。

作者简介: 陈志勇 (1969-), 男, 江苏丹阳人, 主治医师, 主要从事肿瘤和病毒疾病及相关药物的研究, (E-mail) czyyy-1@126.com。

*通讯作者: 高程海, 博士, 研究员, 主要从事海洋药物研究, (E-mail) gaochenghai@gxas.cn。

防城港、北海和钦州都分布有木榄，其在广西沿海地区有用作食物的传统，同时也有消炎、治疟疾和清热解毒的功效（邵长伦等，2009）。虽然对红树木榄根茎叶的化学成分已有研究，但文献调查发现仅有对木榄属植物 *B. parviflora* 的胚轴粗提物进行抗氧化活性评价（Bunyaphatsara et al, 2003）。

笔者之前报道了木榄胚轴含有苯丙素类化合物、醇苷类化合物（易湘茜等，2013，2015）。本文承接以上研究，继续深入研究红树木榄中次生代谢产物，从中获得1个新生物碱类化合物，并测试了其抗乙型肝炎病毒活性，为相关新药研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

Brucker Avance 600 型核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司），Waters e2695 Alliance 分析半制备高效液相色谱仪，N-1100V-W 旋转蒸发仪（日本东京理化株式会社），LCQ^{DECA}XP ESI 质谱仪（美国 Finnigan 公司），SIM-F140AY65 型制冰机（日本 Sanyo 公司），CO₂ 恒温细胞培养箱（HERA, German），Olympus 倒置相差显微镜（Japan CK-40-P200），MS3 型振荡器（德国 IKA 公司），IKA MS3 basic 圆周振荡器（广州艾卡仪器设备有限公司）。

柱层析正相硅胶（200~300 目，青岛海洋化工厂），高效薄层色谱预制板（烟台化学工业研究所），HepG2.2.15 细胞株（上海研域生物科技有限公司），胎牛血清（杭州四季青生物公司），1640 培养液（gibco, USA），胰蛋白酶（北京索莱宝生物），拉米夫定（葛兰素史克制药有限公司）。

2011 年 6 月在广西北仑河口红树林自然保护区采集研究样品，经王新助理研究员（广西红树林研究中心）鉴别为红树科（Rhizophoraceae）木榄属（*Bruguiera*）木榄（*B. gymnorrhiza*）的胚轴。木榄胚轴标本保藏于广西科学院广西北部湾海洋研究中心（编号：2011-GXAS-018）。

1.2 提取与分离

将新鲜的木榄胚轴（湿重约 12.0 kg）粉碎后使用有机溶剂（V_{CH₂Cl₂}:V_{C₂H₅OH}=1:2）在室温下浸泡 7 d，重复 3 次，每次获得的浸出液经减压浓缩得总提取物（915 g）。分别用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等溶剂对总提取物萃取，减压回收溶剂，依次得到氯仿萃

取物（干重 59.0 g）、乙酸乙酯萃取物（干重 52.0 g）和正丁醇萃取物（干重 171.0 g）和水相剩余物。

取适量硅胶粉至乙酸乙酯萃取物（52.0 g），充分搅拌干燥和研磨后装入正相硅胶柱。依次用氯仿-丙酮洗脱系统（CHCl₃:Me₂CO=10:0-5:4/V:V）和氯仿-甲醇洗脱系统（CHCl₃:MeOH=10:1-0:10/V:V）进行梯度洗脱，流分经薄层层析谱检测后合并为 12 个分离部位（Y1-Y12）。组份 Y7 用半制备型高效液相色谱 HPLC 分离纯化，在梯度 MeOH:H₂O=5:95/V:V 处，获得化合物 1（1.2 mg，t=19.02 min）。

1.3 化合物 1 的结构鉴定

运用 ¹H NMR、¹³C NMR、¹H-¹H COSY、HSQC、HMBC、¹H-¹H COSY、HRMS 等分析方法，对分离得到的化合物 1 进行结构鉴定。

1.4 化合物 1 抗乙型肝炎病毒活性筛选测试

采用孙静等（2014）的方法，用二甲基亚砜（DMSO）溶解化合物 1 为母液，临用前用细胞培养液将母液依次稀释成 10、5、2.5、1.25、0.625 mmol·L⁻¹ 等 5 个浓度梯度。阳性对照为拉米夫定，浓度 0.1 mmol·L⁻¹。

肝癌细胞 HepG2.2.15 复苏后，再传代，以每升 1×10⁷ 个接种于 96 孔培养板。培养 2 d 以等待细胞贴壁，然后加入上述所配不同浓度梯度的含药培养液，同时设仅加正常培养液的阴性对照组和含 1 mmol·L⁻¹ 拉米夫定的阳性对照组，每组设 3 个平行样，继续培养 6 d，分离上清液的低温保存待用，剩余部分加 5 g·L⁻¹ MTT 20 μL，在 37 °C 孵育 4 h，震荡 10 min，在吸收波长为 490 nm 处测试其吸光度值，计算得到细胞抑制率和 TC₅₀。用 ELISA 法对低温保存的上清液中 HbsAg 和 HbeAg 进行检测，出现显色反应后，用酶标仪读取在 A450 nm 的吸收值。利用公式计算获得抗原抑制率和半数有效浓度（IC₅₀）。治疗指数（TI）=TC₅₀（半数毒性浓度）/IC₅₀（半数有效浓度）。（其中 TI≤1 为毒性作用，1<TI<2 为低效有毒，TI≥2 为有效低毒）

2 结构鉴定和抗乙型肝炎病毒活性测试

2.1 结构鉴定

化合物 1 为墨绿色晶体，易溶于甲醇。三氯化铁溶液显色为紫色。比旋光度（[α]_D²⁰）为 -57.2°（c 0.54, MeOH）。IR 谱显示有羟基（3 428 cm⁻¹），酰胺

基(1 667 cm^{-1})和芳香环(1 604 cm^{-1})等官能团。HR-ESI-MS (m/z : 269.155 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$)提示分子量为 268.156 9,再结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱确定化合物 **1** 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_4$,具有 4 个不饱和度。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 谱,提示有 3 个不饱和度为三个碳碳双键,因此,该化合物存在 1 个苯环。UV 谱在 λ_{max} 237 和 348 nm 处有最大吸收。 ^1H NMR 谱在展示存在 3 个氧甲基 δ_{H} 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.82 (3H, s, 5-OCH₃), 3.73 (3H, s, 4-OCH₃)和 2 个氮甲基 3.35 (3H, s, NCH₃), 3.35 (3H, s, NCH₃), 2 个亚甲基 2.78 (1H, dd, 5.4, 13.8, H_b-1'), 2.62(1H, dd, 7.8, 13.8, H_b-1'), 3.50 (2H, m, H-3'), 3 个次甲基 6.56 (1H, s, H-2), 6.56 (1H, s, H-6), 3.80(1H, m, H-2')。 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱表明了五个甲基 δ_{C} 49.9 (N-CH₃), 49.9 (N-CH₃), 56.5 (OCH₃), 56.5 (OCH₃), 61.1 (OCH₃), 二个亚甲基(δ_{C} 41.2, 66.6), 三个次甲基(δ_{C} 74.4, 107.7, 107.7)和四个季碳的存在(δ_{C} 136.4, 137.4, 154.2, 154.2)。

以上这些数据类似于化合物 elemicin (Jayasinghe et al, 2003)和 3, 4, 5-trimethoxy- α -aminomethylbenzyl alcohol (Heacock & Hutzinger, 1962), 以上信息提示该分子具有四取代的芳香环母核。

在 HMBC 谱中,从 δ_{H} 3.82 (3H, s, OCH₃)到 δ_{C} 154.2 (C-3), δ_{H} 3.73 (3H, s, OCH₃)到 δ_{C} 137.4 (C-4), δ_{H} 3.82 (3H, s, OCH₃)到 δ_{C} 154.2 (C-5)之间的相关性表明了 3 个甲氧基分别与苯环上的 C-3、C-4 和 C-5 相连。从 δ_{H} 3.35 (2 \times NCH₃)与 δ_{C} 66.6 (C-3')相关表明,氮甲基结构单元与 C-3'相连。从 ^1H - ^1H COSY 可知,存在 H-2'和 H_a-1'/H_b-1'/H₂-3'相关,表明存在 -CH₂-CH(OH)-CH₂-结构片段。从 H_a-1' (2.78, dd, 5.4, 13.8)和 H_b-1' (2.62, dd, 7.8, 13.8)与 δ_{C} 136.4 (C-1)相关表明,揭示结构片段-CH₂-CH(OH)-CH₂-位于苯环骨架的 C-1 位置上。另外,2 \times NCH₃和 δ_{C} 66.6 (C-3')确定 2 \times NCH₃ 接连在 C-3'。基于以上数据,最终确定了化合物 **1** 的结构(图 1)。化合物 **1** 的 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱的数据归属通过 HSQC 和 HMBC 谱确定(见表 1),命名为 Gymnorrhizin A。

2.2 抗乙型肝炎病毒活性测试

MTT 法作为一种检测细胞存活和生长的方法,已经广泛应用于生物因子的活性检测、抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验及肿瘤放射敏感性测试。本实验应用该方法观察化合物 **1** 在具有抗 HBV 活性

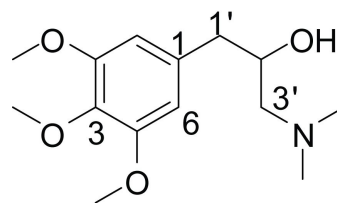


图 1 化合物 **1** 的结构

Fig. 1 Structure of Compound **1**

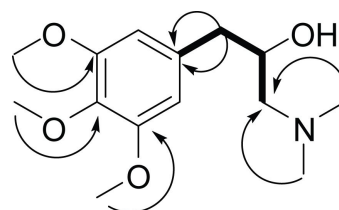


图 2 化合物 **1** 的关键 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关
Fig. 2 Key HMBC correlation and ^1H - ^1H COSY of Compound **1**

表 1 化合物 **1** 的 ^1H (600 MHz)和 ^{13}C (150 MHz) NMR 核磁数据 (氘代甲醇)

Table 1 ^1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data of Compound **1** (CD_3OD , δ in ppm)

编号 Code	H 信号化学位移和 耦合常数 δ_{H}	C 信号 化学位移 δ_{C}	H 的异核多量 子相关 HMBC(H \rightarrow C)
H		136.4	
2	6.56 (1H, s)	107.7	C-1', C-4, C-6
3		154.2	
4		137.4	
5		154.2	
6	6.56 (1H, s)	107.7	C-1', C-2, C-4
1'	2.78(dd, 5.4, 13.8)	41.2	C-1, C-2, C-6,
2'	3.80(m, 1H, CH)	74.4	C-3'
3'	3.50(m, 2H, CH ₂)	66.6	C-1', C-2'
3-OCH ₃	3.82(3H, s, OCH ₃)	56.5	C-3
4-OCH ₃	3.73(3H, s, OCH ₃)	61.1	C-4
5-OCH ₃	3.82(3H, s, OCH ₃)	56.5	C-5
NCH ₃	3.35 (6H, s, 2 \times NCH ₃)	49.9	C-3'

的同时对 HepG2.2.15 细胞本身的生长是否有影响。结果显示, 0.625 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时化合物 **1** 对细胞的抑制与阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$)。说明此浓度下的化合物 **1** 对 HepG2.2.15 细胞本身的生长没有影响, 即对细胞本身没有毒性作用。其他浓度下均对 HepG2.2.15 细胞正常生长有不同程度的抑制作用, 即对细胞本身有毒性作用。但 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,

表 2 化合物 1 对 HepG 2.2.15 的细胞毒活性及其分泌 HbsAg 和 HbeAg 的抑制作用
Table 2 Inhibition rate of Compound 1 on HbsAg and HbeAg secretion of HepG 2.2.15 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

浓度 Concentration (mmol · L ⁻¹)	细胞毒性 Cytotoxicity		乙肝表面抗原 HbsAg		乙型肝炎 E 抗原 HbeAg	
	抑制率	半数毒性浓度	抑制率	半数有效浓度	抑制率	半数有效浓度
	Inhibiton ratio (%)	TC ₅₀	Inhibiton ratio (%)	IC ₅₀ (mmol · L ⁻¹)	Inhibiton ratio (%)	IC ₅₀ (mmol · L ⁻¹)
Normal	0.00		0.00		0.00	
3TC	42.4		72.1		62.5	
10	37.8		72.5		68.4	
5	31.7		59.3		57.6	
2.5	28.2	11.75	48.5	4.37	46.9	4.89
1.25	19.7		34.1		34.1	
0.625	11.2		22.3		20.2	

化合物 1 和 0.1 mmol · L⁻¹ 拉米夫定组在细胞毒性上差异无统计学意义($P>0.05$)。

乙肝表面抗原 (HBSAg) 和乙型肝炎 E 抗原 (HBeAg) 是肝癌细胞株 HepG2.2.15 分泌到培养上清液中特异性的可溶性蛋白质, 能够间接反映病毒复制状况。因此, 通过检测用药后细胞上清液中 HBSAg 和 HBeAg 的活性, 观察化合物 1 对 HepG2.2.15 细胞分泌 HBSAg 和 HBeAg 的抑制作用, 能够确定其体外抗乙型肝炎病毒的活性。结果显示, 相对于阴性对照组, 各浓度实验组所测 A450 nm 值均降低, 且随着浓度的增加, 降低愈明显。培养 6 d 后, 化合物 1 对 HBSAg 的 IC₅₀ 为 4.37 mmol · L⁻¹, TI 为 2.68; H12 对 HBeAg 的 IC₅₀ 为 4.89 mmol · L⁻¹, TI 为 2.40。

3 结论

通过现代分离技术和结构鉴定方法, 从广西北仑河口采集从红树木榄 (*B. gymnorrhiza*) 胚轴中获得新的 1 个生物碱类单体化合物 gymnorrhizin A。活性测试发现, 化合物 gymnorrhizin A 具有抗 HBV 活性, 对 HbsAg 和 HBeAg 的 IC₅₀ 分别为 4.37 mmol · L⁻¹ (TI=2.68) 和 4.89 mmol · L⁻¹ (TI=2.40)。

参考文献:

BUNYAPRAPHATSARA N, JUTIVIBOONSUK A, SORNLEK P, et al, 2003. Pharmacological studies of plants in the mangrove forest [J]. Thai J Phytopharm, 10(2): 1-12.

HEACOCK RA, HUTZINGER O, 1962. Synthesis of potentially physiologically active β -phenylethylamines: Part I. 3, 4, 5-trimethoxy- α -aminomethylzyl alcohol and 4-acetoxy-3, 5-dimethoxy- α -aminomethylzyl alcohol derivatives [J]. C J Chem, 40:128-132.

GAO CH, YI XX, HE BJ, et al, 2011. Chemical compounds and their bioactivities of mangrove plant in Guangxi [J]. J Guangxi Acad Sci, 27(3):251-256. [高程海, 易湘茜, 何碧娟, 等, 2011. 广西红树植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 广西科学院学报, 27(3): 251-256.]

JAYASINGHE L, KUMARIHAMY BMM, JAYARATHNA KHRN, et al, 2003. Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa* [J]. Phytochemistry, 62(4): 637-641.

SHAO CL, FU XM, WANG CY, et al, 2009. Investigation on the status of mangrove resources and medicinal research in China III. Status of folk medicinal usage and medicinal research [J]. Period Ocean Univ Chin, 39(4): 712-718. [绍长伦, 傅秀梅, 王长云, 等, 2009. 中国红树林资源状况及其药用调查 III. 民间药用与药物研究状况[J]. 中国海洋大学学报, 39(4): 712-718.]

SUN J, ZHENG XL, CUI XJ, et al, 2014. A study of inhibition effects on hepatitis B virus of semi-cathayensis *in vitro* [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 25(4): 2391-2393. [孙静, 郑雪凌, 崔向珍, 等, 2014. 半枫荷抗乙型肝炎病毒的药理活性研究[J]. 时珍国医国药, 25(4): 2391-2393.]

YI XX, GAO CH, HE BJ, et al, 2013. Study on phenylpropanoids from hypocotyls of the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. Guizhou, 33(2):191-194. [易湘茜, 高程海, 何碧娟, 等, 2013. 红树植物木榄胚轴中苯丙素类化学成分研究[J]. 广西植物, 33(2):191-194.]

YI XX, GAO CH, LONG B, et al, 2015. Study on chemical constituents from hypocotyls of mangrove *Bruguiera gymnorrhiza* [J]. J Chin Med Mat, 38(1):86-89. [易湘茜, 高程海, 龙彬, 等, 2015. 红树木榄胚轴中化学成分研究[J]. 中药材, 38(1): 86-89.]