

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202012043

胡丹, 丁同同, 李江, 等. 雷公藤提取物中主要物质基础及其抗肿瘤活性研究 [J]. 广西植物, 2022, 42(9): 1514–1521.
HU D, DING TT, LI J, et al. Main material basis and anti-tumor activities of *Tripterygium wilfordii* extract [J]. *Guihaia*, 2022, 42(9): 1514–1521.



雷公藤提取物中主要物质基础及其抗肿瘤活性研究

胡丹^{1,2,3}, 丁同同^{1,2,3}, 李江^{1,2}, 邓璐璐^{1,2}, 吴树燕², 穆淑珍^{1,2*}

(1. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 3. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550025)

摘要: 为进一步阐明雷公藤中的主要物质基础, 并评价其抗肿瘤活性。该研究采用柱层析、HPLC 等技术, 对雷公藤提取物进行研究。结果表明: (1) 从雷公藤 95% 乙醇提取物中分离得到 12 个化合物, 根据理化性质及波谱数据鉴定各化合物的结构分别为 α 、 β -amyrenone (1)、3 β -acetoxyolean-12-en-28-oic acid (2)、antriplotactone (3)、 ω -hydroxypropioquaiacone (4)、3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal (5)、3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol (6)、vanillin (7)、3, 4, 5-三甲氧基苯酚 (8)、对羟基苯甲酸 (9)、对羟基苯甲醛 (10)、vanillyl alcohol (11)、2, 6-dimethoxy-1, 4-benzoquinone (12)。其中, 化合物 1、2、5、12 为首次在该属植物中分离得到。(2) 采用噻唑蓝 (MTT) 法对 12 个化合物进行抗 SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株和 HeL 细胞株 3 种肿瘤细胞系细胞增殖活性的筛选, 并对活性较好的化合物 12 进行 Hoechst 荧光染色和促凋亡作用的检测发现, 化合物 2、3、5、12 具有一定的抗肿瘤活性, 其中化合物 12 的抗肿瘤活性最为显著 (SH-SY5Y 细胞、HeL 细胞、K562 细胞的 IC₅₀ 值分别为 35.6、14.3、28.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。该研究结果进一步丰富了雷公藤的化学成分, 发现了 1 个具有明显抗肿瘤活性的单体物质, 为雷公藤的进一步开发提供了科学依据。

关键词: 雷公藤, 物质基础, 分离纯化, 结构鉴定, 抗肿瘤活性

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2022)09-1514-08

Main material basis and anti-tumor activities of *Tripterygium wilfordii* extract

HU Dan^{1,2,3}, DING Tongtong^{1,2,3}, LI Jiang^{1,2}, DENG Lulu^{1,2}, WU Shuyan², MU Shuzhen^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China; 2. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to clarify the main material basis of *Tripterygium wilfordii* and evaluate its anti-tumor activity. This study used column chromatography, HPLC and other separation materials and techniques. The results were as follows:

收稿日期: 2021-04-19

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK [2021]一般 516); 贵阳市科技计划项目([20151001]药 14 号) [Supported by Guizhou Province Science and Technology Plan Project(QKH-ZK [2021] General 516); Guiyang Science and Technology Plan Project([20151001] Medicine No.14)]。

第一作者: 胡丹(1996-), 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究, (E-mail) 1041163584@qq.com。

*通信作者: 穆淑珍, 博士, 研究员, 主要从事天然产物化学研究, (E-mail) muzi0558@126.com。

(1) A total of 12 compounds were isolated from 95% ethanol extract of *T. wilfordii*, and according to the physicochemical properties and spectral data, the structures of the compounds were identified as α,β -amyrenone (**1**), 3 β -acetoxylean-12-en-28-oic acid (**2**), antriptolactone (**3**), ω -hydroxypropioquaiacone (**4**), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal (**5**), 3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol (**6**), vanillin (**7**), 3, 4, 5-trimethoxyphenol (**8**), *p*-hydroxybenzoic acid (**9**), *p*-hydroxybenzaldehyde (**10**), vanillyl alcohol (**11**) and 2, 6-dimethoxy-1, 4-benzoquinone (**12**). Among them, compounds **1**, **2**, **5** and **12** were isolated from this genus for the first time. (2) In terms of biological activity, their anti-tumor activities *in vitro* were screened for the SH-SY5Y cell line, K562 cell line and Hel cell line by MTT method, and Compound **12** with better activity was subjected to Hoechst fluorescent staining to detect its proapoptotic effect. The results showed that compounds **2**, **3**, **5** and **12** had certain anti-tumor activity, of which Compound **12** had the most significant anti-tumor activity (IC_{50} values of SH-SY5Y, Hel, K562 were 35.6, 14.3, 28.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). This study further enriches the chemical components of *T. wilfordii*, and discovers a monomer substance with obvious anti-tumor activity, which provides a scientific basis for the further development of *T. wilfordii*.

Key words: *Tripterygium wilfordii*, material basis, separation and purification, structure identification, anti-tumor activity

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 是卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤属 (*Tripterygium*) 植物, 又名莽草、黄藤木、断肠草等, 主要分布于中国长江中下游地区、西南地区以及韩国、日本等地 (利剑余, 2017)。雷公藤以根、叶、花及果入药, 其味辛、苦, 性寒, 有大毒, 具有祛风除湿、消肿止痛、杀虫解毒等功效 (马哲等, 2011), 主要用于治疗类风湿性关节炎、肾小球肾炎红斑狼疮等自身免疫性疾病及各种皮肤病 (刘为萍等, 2010)。国内外学者对雷公藤植物的根、叶及果实等部分进行了化学成分研究。迄今为止, 从雷公藤中分离得到单体化合物 200 多种, 主要包括倍半萜、二萜、三萜、木质素、生物碱类、黄酮类等 (马伟光等, 2006)。其中, 二萜、三萜、生物碱类化合物是其主要活性成分。在药理及临床研究方面, 雷公藤具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗菌、抑制生育等生物活性 (Chou & Mei, 1936)。随着生命科学和分子生物学的飞速发展, 有些新发现使雷公藤物质基础的研究备受关注。Liu 等 (2015) 发现雷公藤红素能降低小鼠 45% 的体重, 并可能对 2 型糖尿病、脂肪肝等疾病有治疗效果; Chang 等 (2021) 研究发现雷公藤内酯酮是一种极具转化应用前景的非激素类男性避孕候选药。雷公藤的临床疗效显著, 利剑余 (2017) 发现雷公藤具有一定的生理毒性, 通常在几小时内脏器会发生严重的功能障碍以及严重的器质性损害, 对肝、肾的毒性最为明显, 有时甚至会导致死亡。经研究发现雷公藤中产生毒性反应的成分是其活性成分二萜类, 二萜是雷公藤中目前研究较多的化学成分。然而, 对

雷公藤中其他成分的研究较少, 其广泛的生物活性依然有待继续挖掘。

鉴于雷公藤高效的生物活性, 为提高雷公藤临床上的利用度, 探究雷公藤中主要物质基础及其他成分的生物活性显得尤为重要。因此, 我们对雷公藤提取物进行了化学成分分离与鉴定, 并对得到的化合物进行了抗肿瘤的活性筛选。本研究从雷公藤提取物中共分离出 12 个单体化合物 (图 1), 结构类型涉及萜类、酚酸类和醌类。并且, 在体外活性筛选方面, 首次发现雷公藤提取物中醌类化合物 (化合物 **12**) 具有明显的抗神经母瘤细胞增殖活性。

1 材料与仪器

1.1 材料和试剂

雷公藤药材购自贵阳市花果园药材中药市场, 经贵州中医药大学董丽莎教授鉴定为雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 的根部。

SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株 (上海奥陆生物科技有限公司); 甲氨蝶呤水合物 (Enegy Chemical, 批号: DJ210110); 细胞凋亡荧光 Hoechst 33342/PI 双染试剂盒 (Solarbio Life Sciences, 批号: CA1120); 双抗 (青霉素+链霉素, HyClone, 批号: J140032); DMEM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清 (Gibco 公司); 甲醇、乙醇、氯仿、乙酸乙酯、石油醚 (国药集团化学试剂有限公司)。Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶 (40 ~ 70

μm , 瑞士 Amersham Pharmacia Biotech AB 公司); 柱层析硅胶(200 ~ 300 目和 300 ~ 400 目), 硅胶 H (10 ~ 40 μm) 和薄层层析硅胶 GF254 (0.20 ~ 0.25 mm) (青岛海洋化工厂)。

1.2 仪器

Sim-HPLC 半制备色谱仪 (Wasters, Delta 600); 酶标仪 (Therm scientific, VARIOSKANLUX); 显微镜 (Leica, Dmi8); 流式细胞仪 (ACEABIO, Novocyte); ESI-MS 电喷雾质谱仪 (布鲁克道尔顿公司); 600 MHz 型超导核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司)。

2 研究方法

2.1 提取分离

称取雷公藤药材 20 kg, 用 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h。收集提取液浓缩至原体积的 1/3, 少量多次加水, 浓缩至无醇味。乙酸乙酯萃取至无颜色, 浓缩旋干萃取液, 取适量溶剂溶解, 中性氧化铝拌样, 洗脱剂为乙酸乙酯过中性氧化铝层析柱 (100 ~ 200 目), 浓缩回收溶剂得到雷公藤多苷粗品 104 g。

雷公藤多苷粗品用 40 ~ 80 目硅胶拌样, 使其均匀吸附于硅胶上, 10 倍量的硅胶柱层析 (200 ~ 300 目) 粗分段, 以不同体积比的氯仿: 甲醇 (70:1 ~ 1:1) 进行梯度洗脱。通过薄层层析 (TLC) 跟踪观察组分在紫外分析仪下的荧光及显色情况, 合并相似部分, 共分为 6 段, 标记为 Fr.1 (400 mg)、Fr.2 (2.5 g)、Fr.3 (40 g)、Fr.4 (20 g)、Fr.5 (40 g) 和 Fr.6 (4.1 g)。将 Fr.5 段先通过 MCI 柱, 用不同体积比的甲醇: 水混合溶剂进行梯度洗脱, 洗脱比例为 50:1、70:1、90:10、100:0。使用 TLC 跟踪观察组分在紫外分析仪下的荧光及显色情况, 合并相似部分, 标记为 Fr.5.1 (200 mg)、Fr.5.2 (1.5 g)、Fr.5.3 (12.9 g)、Fr.5.4 (21.7 g)。将 Fr.5.1 段经葡聚糖凝胶柱层析及反复重结晶得到化合物 **12** (8 mg)。将 Fr.5.4 经半制备分离技术得到化合物 **7** (8 mg)、**8** (6 mg)、**9** (12 mg)、**10** (9 mg) 和 **11** (15 mg)。将 Fr.1 经反复重结晶、正相硅胶柱层析得到化合物 **3** (88 mg)。将 Fr.2 经 MCI 柱层析、葡聚糖凝胶柱层析及半制备高效液相色谱等分离手段得到化合物 **1** (32 mg)、**2** (25 mg)。将 Fr.4 经葡聚糖凝胶粗分段后过半制备得到化合物 **4** (9 mg)、**5** (15 mg) 和 **6** (12 mg)。

2.2 生物活性测试

2.2.1 用 MTT 法筛选化合物活性 收集对数生长期的 SH-SY5Y 细胞、K562 细胞、Hel 细胞, 重悬得到细胞悬液并进行细胞计数, 按照每孔 90 μL 的体积将细胞接种于 96 孔板中, 在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下的细胞培养箱中培养过夜待其细胞贴壁后, 加入 10 μL 含药培养基, 使得药物终浓度为 100、50、20、10、5、2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个浓度 3 个复孔。于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 48 h。每孔加入 10 μL 浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 放置在培养箱中继续培养 4 h。弃掉上清液, 每孔加入 DMSO 160 μL , 震荡 15 min 使得甲臞紫色结晶完全溶解。将 96 孔板按要求放置于酶标仪中, 选择的波长为 490 nm, 在此条件下测定吸光度 OD 值。根据测得的 OD 值计算细胞抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [\text{OD}_{\text{空白组}} - \text{OD}_{\text{给药组}}] / \text{OD}_{\text{空白组}} \times 100.$$

2.2.2 Hoechst 染色 收集对数生长期 SH-SY5Y 细胞、K562 细胞、Hel 细胞, 重悬得到细胞悬液并进行细胞计数, 均匀铺于 6 孔板中, 在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下的细胞培养箱中培养待其贴壁, 细胞密度长至 70% ~ 80% 时加入不同浓度的药物 (终浓度为 10、20、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续培养 24 h, 弃去培养液, 先加入 0.8 mL 细胞染色缓冲液, 再加入 5 μL Hoechst 染色液, 最后加入 5 μL PI 染色液, 混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育 25 min, 弃去染色液, 用 PBS 洗涤 1 次, 在荧光显微镜下观察并拍照。对 K562 细胞和 Hel 细胞每个样品收集 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞于 1.5 mL 离心管内, 离心, 弃去上清液。细胞沉淀用 0.8 mL 细胞染色液重悬, 先加入 5 μL Hoechst 染色液, 再加入 5 μL PI 染色液, 混匀, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育 25 min, PBS 洗涤 1 次, 流式细胞仪检测。

2.2.3 统计学方法 所有数据均用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较多用 F 检验。

3 化合物结构鉴定结果

化合物 **1** 无色油状液体, ESI-MS m/z : 447 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.15/5.21 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-12), 1.10 (s, 3H, H-23), 1.06 (s, 3H, H-24), 1.08/1.07 (s, 3H, H-25), 1.06/1.02 (s, 3H, H-26), 1.08/1.15 (s, 3H, H-27), 0.81/0.84 (s, 3H, H-

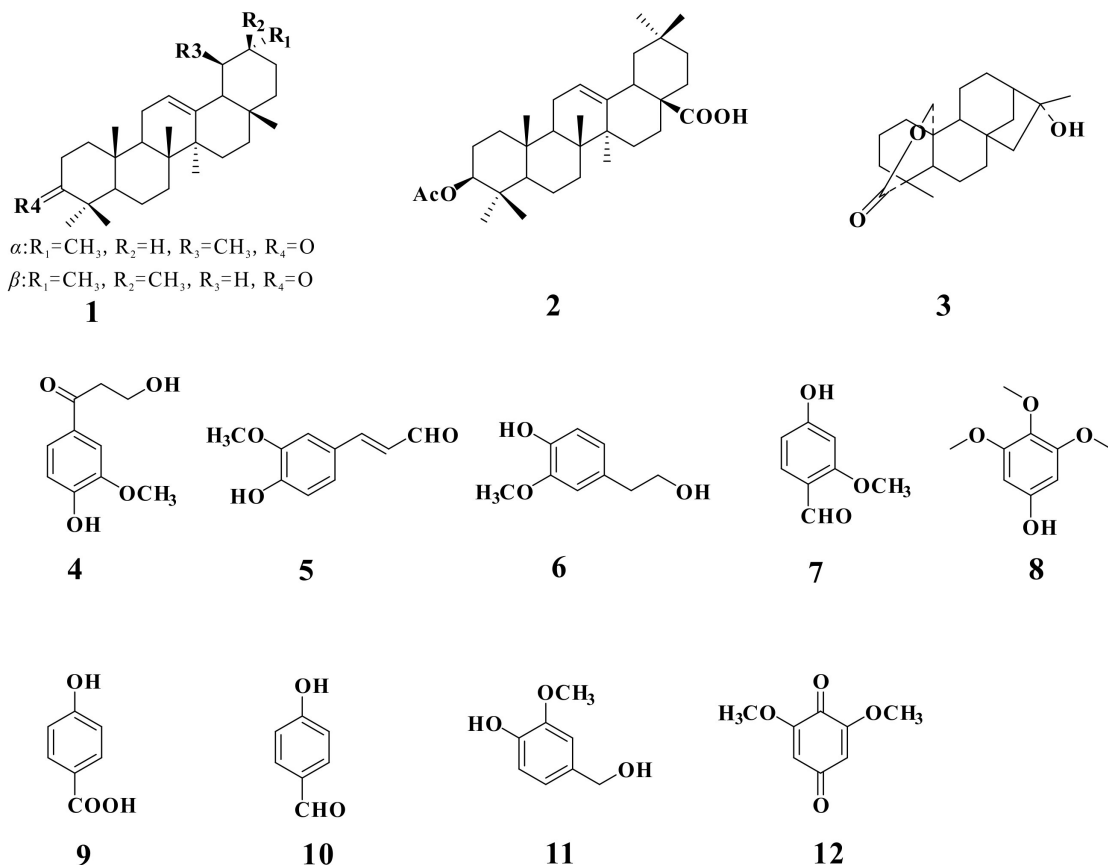


图 1 化合物 1-12 结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1-12

28), 0.80/0.87(s, 3H, H-29), 0.92/0.87(s, 3H, H-30); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 218.02 (C-3), 145.43/139.88 (C-13), 124.36/121.67 (C-12), 59.30/47.62 (C-18), 55.41 (C-5), 47.59/47.47 (C-4), 47.08/47.03 (C-9), 46.94/39.85 (C-19), 42.39 (C-22), 42.01/41.66 (C-14), 40.16/39.94 (C-8), 39.75/31.25 (C-20), 39.65/39.46 (C-1), 37.27/36.84 (C-10), 34.88/31.40 (C-21), 34.38 (C-2), 33.95/32.68 (C-17), 33.49/17.64 (C-29), 32.62/32.33 (C-7), 28.94/28.58 (C-28), 28.24 (C-15), 27.09/26.75 (C-16), 26.64/26.29 (C-23), 26.04/23.71 (C-27), 23.85/23.81 (C-11), 23.35/21.67 (C-30), 21.55 (C-24), 19.82 (C-6), 16.99/16.89 (C-26), 15.63/15.39 (C-25)。以上数据与 Quintão 等 (2014) 报道一致, 故鉴定该化合物为 α, β -amyrenone。

化合物 2 白色固体粉末, ESI-MS m/z : 521 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz,

CDCl_3) δ : 5.28 (s, 1H, H-12), 4.51 (s, 1H, H α -3), 2.83 (dd, $J = 13.7, 3.9$ Hz, 1H, H β -18), 2.06 (s, 3H, Me-OAc), 1.27 (s, 3H, Me), 1.14 (s, 3H, Me), 0.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 6H, 2Me), 0.94 (s, 3H, Me), 0.92 (s, 3H, Me), 0.76 (s, 3H, Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 184.49 (C-28), 171.08 (C=O acetate), 143.61 (C-13), 122.54 (C-12), 80.94 (C-3), 55.29 (C-5), 47.55 (C-9), 46.56 (C-19), 45.83 (C-17), 41.53 (C-14), 40.88 (C-15), 39.27 (C-8), 38.06 (C-1), 37.69 (C-4), 36.99 (C-10), 33.79 (C-21), 33.07 (C-30), 32.51 (C-7), 32.44 (C-22), 30.67 (C-20), 28.04 (C-23), 27.66 (C-15), 25.92 (C-27), 23.59 (C-29), 23.52 (C-2), 23.39 (C-16), 22.85 (C-11), 21.32 (CH₃-acetate), 18.17 (C-6), 17.18 (C-26), 16.66 (C-24), 15.39 (C-25)。以上数据与 Carvalho 和 Seita (1993) 报道一致, 故鉴定该化合物为 3 β -acetoxyolean-12-en-28-oic acid。

化合物 3 白色固体粉末,ESI-MS m/z : 341 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{20}H_{30}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.22(dd, $J=12.0, 2.3$ Hz, 1H, H-20), 4.15(d, $J=12.0$ Hz, 1H, H-20), 2.23~0.83(m, 27H, $-CH_3$); ^{13}C -NMR(150 MHz, $CDCl_3$) δ : 175.57 (C-19), 78.06 (C-16), 72.97 (C-20), 56.75 (C-15), 50.13 (C-5), 49.22 (C-9), 47.16 (C-13), 43.77(C-8), 41.97(C-10), 39.60(C-14), 38.69(C-7), 37.66(C-4), 36.91(C-3), 24.96(C-12), 23.48 (C-17), 22.09(C-18), 21.37(C-6), 19.91(C-2), 16.47(C-11)。以上数据与 Yu 等(1992)报道一致,故鉴定该化合物为 antriptolactone。

化合物 4 淡黄色固体粉末,ESI-MS m/z : 219 $[M + Na]^+$,分子式 $C_{10}H_{12}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.53(t, $J=8.5$ Hz, 1H, H-6'), 7.50 (s, 1H, H-2'), 6.82(d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.91(m, 2H, H-3), 3.86(s, 3H, OCH_3), 3.10 (m, 2H, H-2); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 198.30 (C-1), 152.07 (C-4'), 147.71 (C-3'), 129.18 (C-1'), 123.36 (C-6'), 114.43 (C-5'), 110.47 (C-2'), 57.54 (C-3), 54.98 (OCH_3), 40.26(C-2)。以上数据与 Fu 等(2008)报道一致,故鉴定该化合物为 ω -hydroxypropioquaiacone。

化合物 5 黄色固体粉末,ESI-MS m/z : 177 $[M-H]^-$,分子式 $C_{10}H_{10}C_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.54(t, $J=6.5$ Hz, 1H, H-3), 7.37~7.31(m, 1H, H-2'), 7.04(dd, $J=8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.00(d, $J=1.9$ Hz, 1H, H-5'), 6.88 (dd, $J=11.6, 7.4$ Hz, 1H, H-1), 6.52(dd, $J=15.8, 7.8$ Hz, 1H, H-2), 3.87 (d, $J=4.2$ Hz, 3H, OCH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 194.10 (C-3), 153.75 (C-3'), 149.35 (C-4'), 147.27 (C-1'), 126.43 (C-2), 126.08 (C-1), 124.15 (C-6'), 115.18 (C-5'), 109.77 (C-2'), 55.97(OCH_3)。以上数据与 Wang 等(2012)报道一致,故鉴定该化合物为 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propenal。

化合物 6 白色固体粉末,ESI-MS m/z : 167 $[M-H]^-$,分子式 $C_9H_{12}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.72(d, $J=1.7$ Hz, 1H, H-2), 6.63 (d, $J=8.0$ Hz, 1H, H-6), 6.57(dd, $J=8.0, 1.8$ Hz, 1H, H-5), 3.75(s, 3H, OCH_3), 3.63(t, $J=7.2$ Hz, 2H, H-2'), 2.65(t, $J=7.1$ Hz, 2H, H-

1'); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 147.44 (C-3), 144.48 (C-4), 130.44 (C-1), 121.01 (C-6), 114.72 (C-5), 112.29 (C-2), 63.15 (C-2'), 54.96 (OCH_3), 38.44 (C-1')。以上数据与 Liu 和 Luo (2012)报道一致,故鉴定该化合物为 3-methoxy-4-hydroxy phenylethanol。

化合物 7 白色无定性粉末,ESI-MS m/z : 151 $[M-H]^-$,分子式 $C_8H_8O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 9.68(s, 1H, CHO), 7.37(d, $J=6.5$ Hz, 2H, H-2, 6), 6.89(d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-5), 3.86 (s, 3H, OCH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 191.43 (C-7), 153.38 (C-4), 148.25 (C-3), 128.94 (C-1), 126.66 (C-6), 115.17 (C-5), 109.73 (C-2), 54.99 (C-8)。以上数据与 Kwon 等(2001)报道一致,故鉴定该化合物为 vanillin。

化合物 8 白色无定性粉末,ESI-MS m/z : 185 $[M + H]^+$,分子式 $C_9H_{12}O_4$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 6.01(s, 2H, H-2, 6), 3.68(s, 6H, 3, 5- OCH_3), 3.58 (s, 3H, 4- OCH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 154.04 (C-3, 5), 153.56 (C-1), 130.74 (C-4), 92.54 (C-2, 6), 59.92 (4- OCH_3), 54.98 (3, 5- OCH_3)。以上数据与柳庆龙等(2017)报道一致,故鉴定该化合物为 3, 4, 5-三甲氧基苯酚。

化合物 9 白色固体粉末,ESI-MS m/z : 137 $[M-H]^-$,分子式 $C_7H_6O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.76(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), 6.74(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 168.86 (COOH), 161.88 (C-4), 131.66 (C-2, 6), 121.34 (C-1), 114.71 (C-3, 5)。以上数据与王洪平等(2013)报道一致,故鉴定该化合物为对羟基苯甲酸。

化合物 10 淡黄色固体粉末,ESI-MS m/z : 123 $[M + H]^+$,分子式 $C_7H_6O_2$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 9.66(s, 1H, CHO), 7.67(d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-2, 6), 6.82(d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-3, 5); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 191.52 (CHO), 163.79 (C-4), 132.11 (C-2, 6), 128.87 (C-1), 115.53 (C-3, 5)。以上数据与钱群刚等(2019)报道一致,故鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。

化合物 11 淡黄色固体粉末,ESI-MS m/z : 153 $[M-H]^-$,分子式 $C_8H_{10}O_3$ 。 1H -NMR (600 MHz,

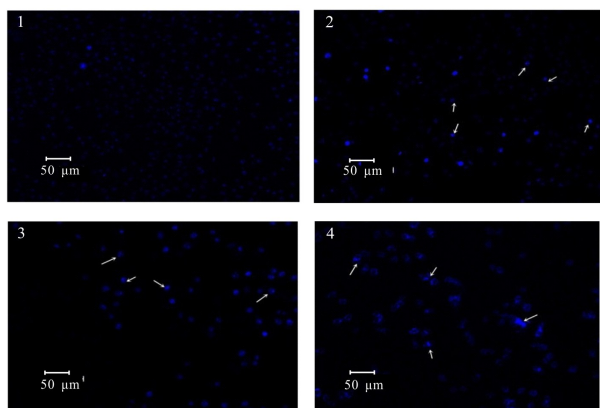
表 1 化合物 1-12 在不同给药浓度下对各种肿瘤细胞系的抑制率 (单位: %)

Table 1 Inhibition rates of compounds 1-12 against various cancer cell lines at different dosing concentrations (Unit: %)

编号 No.	给药浓度 Dosing concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)					
	K562		Hel		SH-SY5Y	
	50	100	50	100	50	100
1	17.18±6.5	30.34±5.3	8.50±3.1	15.74±7.2	—	9.17±7.1
2	—	—	47.73±2.5	58.47±4.1	—	18.09±1.1
3	12.84±7.7	19.16±14.8	36.47±1.8	61.41±2.1	16.27±9.0	39.05±4.0
4	—	12.26±7.7	—	15.97±4.6	—	—
5	19.47±5.8	29.26±3.1	32.51±4.7	41.74±6.1	—	13.45±0.8
6	—	—	7.78±9.7	14.13±1.6	—	—
7	—	—	—	18.48±2.2	—	13.78±3.5
8	—	—	23.00±1.4	20.67±3.9	—	10.86±9.9
9	10.91±10.2	18.64±8.6	—	14.60±3.4	—	—
10	—	—	12.45±3.4	17.45±7.3	—	—
11	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
12	91.76±0.1	Δ	94.39±0.1	Δ	67.84±1.6	Δ

注: — 表示没活性; Δ 表示未检测。

Note: — indicates not active; Δ indicates not detected.



1 为空白组; 2,3,4 的给药浓度分别为 10,20,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1 in the figure is the blank group; Administration concentrations of 2, 3, and 4 are 10, 20 and 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively.

图 2 SH-SY5Y 细胞在化合物 12 作用下 Hoechst 荧光染色图

Fig. 2 Hoechst fluorescence staining image of SH-SY5Y cells under the action of Compound 12

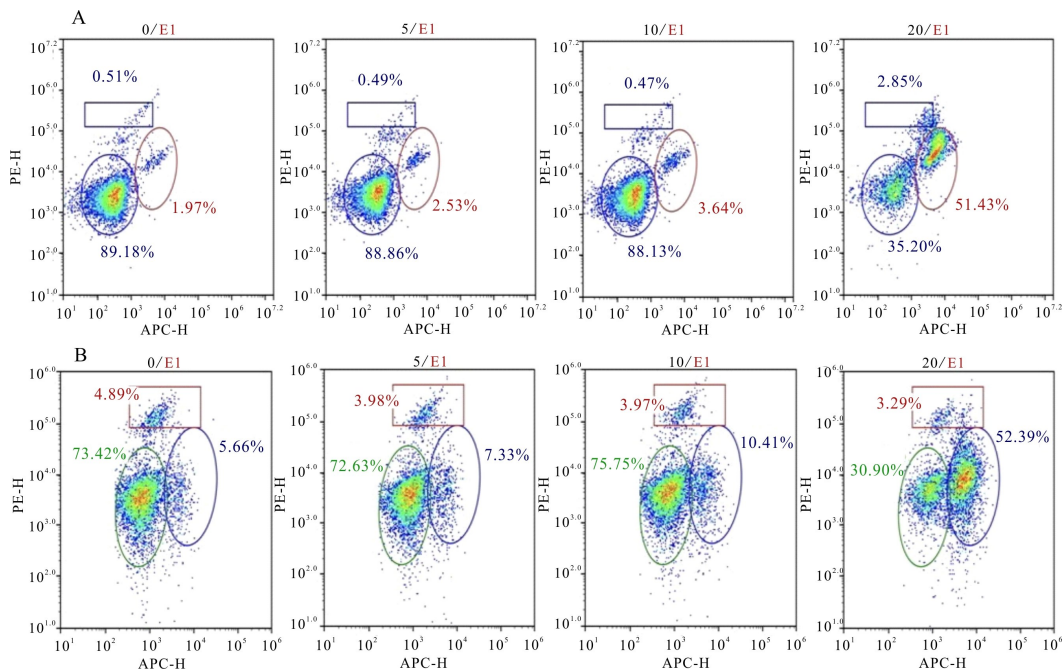
CD_3OD) δ : 6.97(s, 1H, H-5), 6.78(s, 2H, H-3, 6), 4.53(s, 2H, H-1'), 3.85(s, 3H, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 147.56(C-3), 145.54(C-5), 132.84(C-1), 119.71(C-4), 114.59(C-2), 110.73(C-6), 63.93(C-7), 54.95(OCH_3)。以上数据与 Challice 等(1980)报道一致,故鉴定该化合物为 vanillyl alcohol。

化合物 12 黄色固体粉末,ESI-MS m/z :191 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,分子式 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.88(s, 2H, H-3, 5), 3.84(s, 6H, $\text{OCH}_3 \times 2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ : 176.70(C-1), 186.48(C-4), 157.33(C-2, 6), 107.43(C-3, 5), 56.50($\text{OCH}_3 \times 2$)。以上数据与 Kwon 等(2001)报道一致,故鉴定该化合物为 2, 6-dimethoxy-1, 4-benzoquinone。

4 生物活性测试结果

4.1 用 MTT 法筛选化合物活性

本研究首先对分离得到的化合物进行抗肿瘤活性筛选。采用 SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株检测化合物的抗肿瘤作用,表 1 结果表明,给药浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时化合物 12 对 K562 细胞株和 Hel 细胞株具有很强的抑制作用,对 SH-SY5Y 细胞株具有较强的抑制作用。由于化合物 12 给药浓度 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株均具有很强的抑制作用,因此对其 IC_{50} 值进行了测定(阳性药为甲氨蝶呤水合物,给药浓度为 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),结果显示化合物 12 对 SH-SY5Y 细胞株、K562 细胞株、Hel 细胞株均有较强的抑制率, IC_{50} 值分别为 (35.6±2.8)、(28.8±0.5)、(14.3±0.9) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



A. Hel 细胞在化合物 **12** 作用下的流式检测图; **B.** K562 细胞在化合物 **12** 作用下的流式检测图。0、5、10、20 分别代表药浓度为 0、5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同, 其中 E1 为进样细胞中的活细胞, PE 和 APC 分别代表藻红蛋白与别藻蓝蛋白, H 代表电脉冲信号高度。

A. The flow cytometry diagram of Hel cells under the action of compound **12**; **B.** The flow cytometry diagram of K562 cells under the action of Compound **12**. 0, 5, 10, and 20 respectively represent the drug concentration of 0, 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the same below, where E1 is the live cell in the injection cell, PE and APC represent phycoerythrin and allophycocyanin, H represents the height of the electrical pulse signal.

图 3 Hel 细胞和 K562 细胞在化合物 **12** 作用下流式检测图

Fig. 3 Flow cytometric image of Hel cell and K562 cell under the action of Compound **12**

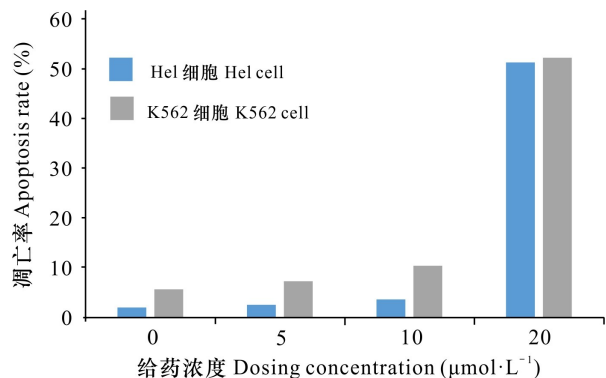


图 4 不同浓度药物对两种细胞的凋亡柱状图

Fig. 4 Histogram of apoptosis of two kinds of cells with different concentrations of drugs

4.2 Hoechst 染色

为进一步检测化合物 **12** 的促凋亡作用, 我们分别对不同浓度化合物 **12** 作用的细胞用细胞凋亡荧光 Hoechst 33344/PI 双染试剂盒进行了染色处理, SH-SY5Y 细胞株为贴壁细胞, 染色后用荧光显微镜

拍摄染色剂对细胞核的染色情况。图 2 结果显示, 与空白组相比, 给药组细胞皱缩变圆、核膜破裂、核质流出, 且具有明显的剂量依赖性。由于 K562 细胞株和 Hel 细胞株为半贴壁细胞, 其染色后难以用荧光显微镜拍出清晰的图片, 因此采用流式细胞仪检测其凋亡情况。从图 3 和图 4 的结果可以看出, 与空白组相比, 随着化合物浓度的增加, 两种细胞凋亡比例也随之增加, 表明化合物可以促进 2 种细胞的凋亡, 且该作用和浓度呈剂量依赖关系。

5 讨论与结论

本研究从雷公藤醇提取物中共分离鉴定了醌类化合物 1 个, 萜类化合物 3 个以及酚酸类化合物 8 个, 并对这些化合物进行了抗肿瘤活性筛选发现, 化合物 **2**、**3**、**5**、**12** 对不同肿瘤细胞均呈现出一定的抑制活性, 其中醌类化合物 **12** 的抗肿瘤活性最为显著, 对 SH-SY5Y 细胞株、Hel 细胞株、K562 细胞株的

IC₅₀值分别为 35.6、14.3、28.8 μmol · L⁻¹(文献值 IC₅₀ = 25.5 μmol · L⁻¹)(刘睿等, 2005)。这是化合物 **12** 首次报道对 SH-SY5Y 细胞株和 He1 细胞株的增殖影响,其作用机制还有待进一步确认。

雷公藤的生物活性研究主要集中于二萜、三萜和生物碱,大量研究表明,这些活性物质均有一定的毒性,其中二萜类成分毒性最大,如雷公藤甲素对人乳腺癌、结肠癌、卵巢癌均有明显的抑制作用,特别是对卵巢癌,平均半数生长(G150)显著低于紫杉醇(Guan et al., 1989),但其对肝细胞却具有明显的损伤作用且具有一定的剂量依赖性(Zhang et al., 2016);雷公藤红素的抑瘤率为 65%~93%,超过了紫杉醇(翟边,2016),而雷公藤红素对心血管系统却有着潜在的危害。这一原因大大限制了雷公藤在临床上的推广与应用。本研究发现的醌类化合物 **12** 具有较强的抗肿瘤活性,而关于该植物中醌类化合物的生物活性尚未见报道。这一研究表明了雷公藤中的醌类化合物在抗神经母瘤细胞方面具有很大的潜力,这为后续雷公藤中其他活性成分的开发提供了实验基础。

参考文献:

CARVALHO LM, SEITA J, 1993. A new oleanolic acid derivative from *Securinega tinctoria* [J]. *Planta Med*, 59: 369-372.

CHALLICE JS, LOEFFLER RST, WILLIAMS AH, 1980. Structure of calleryanin and its benzylic esters from *Pyrus* and *Prunus* [J]. *Phytochemistry*, 19: 2435-2437.

CHANG ZL, QIN WB, ZHENG HL, et al., 2021. Triptonide is a reversible non-hormonal male contraceptive agent in mice and non-human primates [J]. *Nat Commun*, 12(1): 1-14.

CHOU T, MEI P, 1936. Study on Chinese herb Lei Gong Teng, *Tripterygium wilfordii* Hook f. I: The coloring substance and the sugars [J]. *Chin J Physiol*, 10: 529-534.

FU ZH, ZHANG YM, TAN NH, et al., 2008. Chemical constituents of *Keteleeria evelyniana* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 20: 257-261.

KWON HC, CHOI SU, LEE KR, 2001. Phytochemical constituents of *Artemisia stolonifera* [J]. *Arch Pharm Res*, 24: 312-315.

LIU SY, LUO DQ, 2010. Study on the chemical constituents of *Trollius chinensis* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 41(3): 370-373. [刘召阳, 罗都强, 2010. 金莲花的化学成分研究 [J]. *中草药*, 41(3): 370-373.]

LIU J, LEE J, HERNANDEZ M, et al., 2015. Treatment of obesity with celastrol [J]. *Cell*, 161(5): 999-1011.

LI JY, 2017. Study on the chemical constituents of *Tripterygium wilfordii* root [J]. *Strait Pharm J*, 29(11): 21-23. [利剑余, 2017. 雷公藤根的化学成分研究 [J]. *海峡药学*,

29(11): 21-23.]

LIU QL, CHEN AH, TANG JY, et al., 2017. Chemical constituents from stems and leaves of *N-auclea officinalis* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 48(1): 52-57. [柳庆龙, 陈阿虹, 唐进英, 等, 2017. 胆木枝叶的化学成分研究 [J]. *中草药*, 48(1): 52-57.]

LIU R, GU QQ, CUI CB, et al., 2005. Chemical constituents of *Schefflera venulosa* and their antitumor activities [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 36(3): 328-332. [刘睿, 顾谦群, 崔承彬, 等, 2005. 密脉鹅掌柴的化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. *中草药*, 36(3): 328-332.]

LIU WP, LIU SX, TANG HZ, et al., 2010. New progress in the study of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 41(7): 1215-1218. [刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等, 2010. 雷公藤研究新进展 [J]. *中草药*, 41(7): 1215-1218.]

MA Z, LIANG MX, ZHANG Y, et al., 2011. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Asia-Pacific Trad Med*, 7(3): 157-160. [马哲, 梁茂新, 张颖, 等, 2011. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 7(3): 157-160.]

MA WG, ZHANG T, ZHANG C, et al., 2006. Research and prospect of the toxic drug *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin J Trad Chin Med Pharm*, 21(2): 117-120. [马伟光, 张滔, 张超, 等, 2006. 有毒药物雷公藤的研究及展望 [J]. *中华中医药杂志*, 21(2): 117-120.]

QUINTAO NLM, ROCHA LW, SILVA GF, et al., 2014. Contribution of α,β -Amyrenone to the anti-inflammatory and antihypersensitivity effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. [J]. *Biomed Res Int*, (2): 636839.

QIAN QG, CAI L, YANG SH, et al., 2019. Chemical constituents from *Carpesium abrotanoides* [J]. *Chin Trad Pat Med*, 41(11): 2671-2673. [钱群刚, 蔡亮, 杨胜辉, 等, 2019. 天名精化学成分的研究 [J]. *中成药*, 41(11): 2671-2675.]

WANG LQ, WU MM, HUANG J, et al., 2012. Chemical constituents of *Eria spicata* [J]. *Chem Nat Compd*, 48: 168-169.

WANG HP, CAO F, YANG XW, 2013. Study on chemical constituents of the aerial parts of *Polygonum capitatum* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 44(1): 24-30. [王洪平, 曹芳, 杨秀伟, 2013. 头花蓼地上部分的化学成分研究 [J]. *中草药*, 44(1): 24-30.]

YU DD, XIE FZ, LIANG XT, 1992. A new diterpene lactone from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin Chem Lett*, 3: 435-436.

ZHAI B, 2006. Wuhan scientists discovered for the first time that *Tripterygium wilfordii* is expected to become a new anti-cancer drug [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 22(9): 15. [翟边, 2006. 武汉科学家首次发现雷公藤有望成为抗癌新药 [J]. *中国制药信息*, 22(9): 15]

ZHANG L, WANF TT, LI Q, et al., 2016. Fabrication of novel vesicles of triptolide for antirheumatoid activity with reduced toxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomed*, 11: 2663-2673.

ZHENG JX, WANG NL, CHEN HF, et al., 2007. Isolation and identification of phenolic constituents from *Selaginella uncinata* (Desv.) Spring [J]. *Chin J Med Chem*, 17: 302-305.