

doi: 10.16112/j.cnki.53-1223/n.2020.02.014

昆明山海棠茎叶中的二萜类成分及生物活性研究

王思焱, 汪 丽, 陈宣钦, 李蓉涛

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 利用羟丙基葡聚糖凝胶、正相硅胶、反相硅胶等色谱层析材料及半制备高效液相色谱 (semi-PHPLC) 等色谱层析技术, 从昆明山海棠茎叶的 95% 甲醇水提取液中分离鉴定了 9 个二萜类化合物(包括对映贝壳杉烷型 **1**、松香烷型 **2~8** 和异海松烷型 **9**)。其中化合物 **3**、**5** 和 **8** 为首次从该植物分离得到。采用 MTT 法、Griess 法和 CellTiter-Glo 化学发光法评价了肝癌细胞毒、NO 生成抑制和抗流感病毒活性, 化合物 **8** 对肝癌 HepG2 ($IC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$) 和肝癌阿霉素耐药株 HepG2/Adr ($IC_{50} = 2.7 \mu\text{M}$) 具有显著的细胞毒活性; **2**、**3**、**7** 和 **8** 具有显著的抑制 NO 生成活性 (IC_{50} 范围: $0.0019 \sim 15.4 \mu\text{M}$); 化合物 **4** 和 **7** 具有抗 A/PR/8/34 (H1N1) 流感病毒(达菲耐药株) 活性, EC_{50} 分别为 $38.6 \pm 10.7 \mu\text{M}$ 和 $22.9 \pm 6.4 \mu\text{M}$; 化合物 **7** 还具有显著的抗 A/Hong Kong/8/68 (H3N2) 流感病毒(敏感株) 活性, EC_{50} 为 $21.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 。

关键词: 昆明山海棠; 二萜; 细胞毒; NO 生成抑制; 生物活性; 抗流感

中图分类号: Q501 文献标志码: A 文章编号: 1007-855X(2020)02-0108-07

Diterpenoids of the Stem and Leaf of *Tripterygium hypoglaucum* and Their Biological Activities

WANG Siyi, WANG Li, CHEN Xuanqin, LI Rongtao

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Nine diterpenoids, one kaurane-type (**1**), six abietane-type (**2-8**), and one isopimarane-type (**9**), were isolated from 95% MeOH/H₂O extract of *Tripterygium hypoglaucum* by column chromatography using Sephadex LH-20, normal phase silica gel and reversed phase silica gel, as well as semi-preparative high performance liquid chromatography (semi-PHPLC). Compounds **3**, **5**, and **8** were isolated from *T. hypoglaucum* for the first time. The cytotoxicity, NO production inhibitory activity, and anti-influenza activity were evaluated by using the MTT, Griess, and Cell Titer-Glo chemiluminescence methods, respectively. Compound **8** showed significant cytotoxicity against HepG2 ($IC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$) and HepG2/Adr cells ($IC_{50} = 2.7 \mu\text{M}$). Compounds **2**, **3**, **7**, and **8** exhibited significant activity in inhibiting NO production (IC_{50} from 0.0019 to 15.4 μM). Compounds **4** and **7** have anti A/PR/8/34 (H1N1) influenza virus (oseltamivir-resistance) activity with EC_{50} values of $38.6 \pm 10.7 \mu\text{M}$, and $22.9 \pm 6.4 \mu\text{M}$, respectively. Compound **7** exhibited anti A/Hong Kong/8/68 (H3N2) influenza virus (sensitivity) activity with EC_{50} value of $21.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$.

Key words: *Tripterygium hypoglaucum*; diterpenoids; cytotoxicity; NO production inhibitory activity; bioactivity; anti-influenza

收稿日期: 2019-04-09. 基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1602222, 31660102); 云南省自然科学基金项目 (2018FB034).

作者简介: 王思焱 (1992-) 男, 硕士研究生. 主要研究方向: 天然药物化学. E-mail: 1126437553@qq.com

通信作者: 李蓉涛 (1971-) 女, 博士, 教授. 主要研究方向: 天然药物化学. E-mail: rongtao@163.com

0 引言

昆明山海棠(*T. hypoglaucum*) 属于卫矛科(Celastraceae) 雷公藤属(*Tripterygium*) 植物. 雷公藤属全属只有雷公藤(*T. wilfordii*), 昆明山海棠(*T. hypoglaucum*) 和东北雷公藤(*T. regelii*) 三个种. 雷公藤属植物在临床中主要用于类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和红斑狼疮等疾病的治疗^[1-2]. 该属植物主要含倍半萜(二氢沉香呋喃型)、二萜(松香烷型和贝壳杉烷型)、三萜、黄酮和大环内酯类生物碱等^[2]. 其中高度氧化的三元环氧松香烷型二萜(如雷公藤甲素) 是雷公藤属植物特有的化学成分. 现代药理学研究表明, 雷公藤属植物中三元环氧松香烷型二萜具有显著抗炎和抗肿瘤活性^[6].

昆明山海棠(*T. hypoglaucum*) 主要分布在我国广西、云南、贵州、四川、湖南、浙江、安徽等地. 文献报道昆明山海棠含有丰富的倍半萜(如二氢沉香呋喃型倍半萜)、二萜(如松香烷型二萜)、三萜、黄酮和大环内酯类生物碱等类型的化合物^[1]. 这些化学成分具有广泛的生物活性, 如抗炎、抗肿瘤、抗菌和免疫调节等^[1, 3-5]. 但是, 鲜有三元环氧松香烷型二萜的报道. 该属植物中报道发现的 20 多个三元环氧松香烷型二萜^[2] 均来自雷公藤属植物雷公藤(*T. wilfordii*). 因此, 基于三元环氧松香烷型二萜高度氧化的结构特点和显著广泛的生物活性, 从生物亲缘关系考虑, 本课题组前期对采自大理的昆明山海棠茎叶中的三元环氧松香烷型二萜进行了系统研究^[7], 首次从该植物中发现了一个三元环氧松香烷型二萜 2-表雷公藤乙素, 并发现其对多种肿瘤细胞有显著的细胞毒活性^[7-8]. 为了进一步研究昆明山海棠中的三元环氧松香烷型二萜成分及其生物活性, 我们扩大样本采集量, 对采自大理的昆明山海棠茎叶的二萜类成分进行了分离、纯化和结构鉴定, 并对分离得到的二萜类成分进行了抗肿瘤、抗炎和抗甲型流感活性筛选.

1 材料与方法

1.1 植物来源

昆明山海棠的茎叶于 2015 年 7 月采自云南省大理市苍山, 并由昆明理工大学生命科学与技术学院陈宣钦副教授鉴定. 标本存放在昆明理工大学生命科学与技术学院资源药物化学重点实验室, 标本号为: KMUST201507.

1.2 实验仪器与材料

NMR 数据由 Bruker AM-500 或 Bruker AM-600 核磁共振仪测定; 旋转蒸发仪为瑞士 BUCHI 公司 R-II 型及德国 Heidolph 公司 Hei-VAP Value G3 型; 样品分析及半制备在 Agilent 1200 和 Agilent 1260 标准系列高效液相色谱仪中完成, 检测器为 DAD 检测器; 分析色谱柱为 ZORBAX SB-C18, Agilent, 4.6 mm × 250 mm, 流速为 1 mL/min; 半制备色谱柱为 ZORBAX SB-C18, Agilent, 9.4 mm × 250 mm, 流速为 3 mL/min; 色谱纯试剂甲醇和乙腈由默克公司生产; 薄层硅胶板(GF₂₅₄) 为青岛海洋化工厂生产; 反相硅胶材料(Li Chroprep RP-18, 40~63 μm) 为 Merck 公司生产; 羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20) 为 Pharmacia 公司生产.

1.3 提取和分离

干燥的昆明山海棠的茎叶 35 kg, 经粉碎后在室温下用 95% 甲醇水提取 3 次(每次约 60 L, 每次 24 h), 合并提取液, 用旋转蒸发仪减压浓缩至无乙醇味, 再分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇各萃取四次, 回收溶剂后得石油醚相 1 kg, 乙酸乙酯相 840 g 和正丁醇相 2 kg.

乙酸乙酯相样品用硅胶柱以氯仿/丙酮(10:0.4) 进行梯度洗脱, 通过薄层色谱(TLC) 监测, 合并相似馏分, 将乙酸乙酯相划分为 5 个部分: Fr1~Fr5. Fr2(5 g) 先用 MCI 柱(90%~100% 甲醇水) 去除色素, 然后用硅胶(纯石油醚) 进行脱脂, 再以石油醚/丙酮(5:1, 3:1, 1:1) 梯度洗脱后分成 6 个部分: Fr2-1~Fr2-6. Fr2-4(1 g) 用凝胶柱色谱(甲醇) 层析, 分成 3 个部分: Fr2-4-1~Fr2-4-3. Fr2-4-2(390 mg) 和 Fr2-4-3(150 mg) 分别经硅胶柱(氯仿/甲醇 80:1) 层析, 再经半制备 HPLC(70% 甲醇水) 纯化分别得到 3(1.7 mg) 和化合物 6(7 mg). Fr2-5(375 mg) 经过凝胶柱(甲醇) 纯化, 然后 HPLC(72% 甲醇水) 半制备后得到 5(2.4 mg).

Fr3(34 g) 先经 MCI 柱以 90%~100% 甲醇水去除色素,再用硅胶(石油醚/丙酮 5:1, 3:1, 1:1) 层析为三个组分: Fr3-1~Fr3-3. Fr3-2(11 g) 用反相硅胶(RP-18) 柱(30%, 60% 和 90% 甲醇水) 梯度洗脱, 得到三个馏分: Fr3-2-1~Fr3-2-3. Fr3-2-1 用反相硅胶(RP-18) 层析, 然后凝胶柱色谱(甲醇) 纯化, 得到三个组分: Fr3-2-1-1~Fr3-2-1-3. Fr3-2-1-3(530 mg) 先经硅胶柱(石油醚/丙酮 3:1) 洗脱, 然后用凝胶柱(氯仿/甲醇 1:1) 纯化, 最后通过 HPLC 半制备(75% 甲醇水) 进一步纯化得到化合物 1(28.6 mg) 和 2(17 mg).

Fr3-2-2(2.3 g) 首先进行硅胶柱纯化(石油醚/丙酮 8:1-1:1), 得到三个组分: Fr3-2-2-1~Fr3-2-2-3. Fr3-2-2-2(580 mg) 经过重结晶获得化合物 8(11 mg). Fr3-2-2-3(234 mg) 先经硅胶制备薄层层析(氯仿/甲醇 50:1) 纯化, 然后用凝胶柱(氯仿/甲醇 1:1) 纯化, 最后通过半制备 HPLC(75% 甲醇水) 得化合物 4(2.8 mg) 和 7(11 mg).

Fr3-3(7 g) 先用硅胶柱划段(石油醚/乙酸乙酯 10:1-1:1), 得到四个组分: Fr3-3-1~Fr3-3-4. Fr3-3-3(1.5 g) 以氯仿/甲醇(1:1) 凝胶柱纯化后, 通过反相硅胶柱(甲醇水 30%~100%) 梯度洗脱, 再用半制备 HPLC(55% 乙腈水) 纯化得化合物 9(1.8 mg).

1.4 体外抗肿瘤实验方法

取对数生长期的肿瘤细胞(HepG2 或 HepG2/Adr 细胞) 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 将细胞分成对照组和实验组, 每组设 3 个复孔, 其中空白对照组不做任何处理, 实验组加入不同浓度的样品, 继续培养 48 h 后, 每孔加入 $20 \mu\text{L}$ 5 mg/mL MTT(噻唑啉) 溶液 37°C 孵育 4 h, 然后每孔加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO(二甲基亚砷) 避光震荡 12 min, 并且用多功能读板机于 490 nm 处检测 96 孔板的 OD 值, 最后按如下公式进行数据处理: 抑制率% = (空白组平均 OD 值 - 实验组 OD 值) $\times 100$ / 空白组平均 OD 值, 并运用 SPSS 软件计算化合物的 IC_{50} 值.

1.5 体外抗炎实验方法

取对数生长期的 RAW264.7 细胞以 8×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 将细胞分成空白对照组、LPS(内脂多糖) 组和实验组, 每组设 3 个复孔, 其中空白对照组不做任何处理, LPS 组加入终浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 LPS, 实验组加入一系列浓度梯度的样品(0.39、1.56、6.25、25 和 $100 \mu\text{M}$) 培养 24 h 后吸取上清, 然后分别加入 Gress A 液和 Gress B 液于 540 nm 处检测 96 孔板的 OD 值, 最后按如下公式进行数据处理: NO 生成抑制率% = $100 \times (\text{LPS 组平均 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / (\text{LPS 组平均 OD 值} - \text{空白对照组平均 OD 值})$, 并运用 SPSS 软件计算化合物的 IC_{50} 值.

1.6 体外抗流感实验方法

取对数生长期的 MDCK 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 将细胞分成空白对照组、病毒对照组和实验组, 每组设 4 个复孔, 其中空白对照组不做任何处理, 病毒对照组加入 MOI(感染复数) = 1 的 A/PR/8/34(H1N1) 病毒, 实验组加入 MOI = 1 的 A/PR/8/34(H1N1) 病毒或 A/Hong Kong/8/68(H3N2) 流感病毒和不同浓度的样品, 培养 48 h 后加入 Promega 公司的 CellTiter-Glo 试剂测 96 孔板的化学发光值, 最后按如下公式进行数据处理: 保护率% = (实验组 RLU 值 - 病毒对照组平均 RLU 值) / (空白对照组平均 RLU 值 - 病毒对照组平均 RLU 值), 并用软件计算出 IC_{50} 值^[9].

2 结果

2.1 结构鉴定

Tripterifordin (1), $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, 白色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 1.36 (3H, s, 17- CH_3), 1.15 (3H, s, 18- CH_3), 5.26 (1H, dd, $J=12.0, 2.1$ Hz, H-20 β), 4.23 (1H, d, $J=12.06$ Hz, H-20 α); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_{C} 40.6 (t, C-1), 20.9 (t, C-2), 40.5 (t, C-3), 42.9 (s, C-4), 51.1 (d, C-5), 22.3 (t, C-6), 39.6 (t, C-7), 44.7 (s, C-8), 50.2 (d, C-9), 38.6 (s, C-10), 17.4 (t, C-11), 25.9 (t, C-12), 48.1 (d, C-13), 37.9 (t, C-14), 57.7 (t, C-15), 77.1 (s, C-16), 24.4 (q, C-17), 23.1 (q, C-18), 176.5

(q, C-19) 73.9 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献 [10] 报道的 tripterifordin 波谱数据一致.

雷酚内酯/山海棠素/triptophenolide (**2**), $C_{20}H_{24}O_3$, 白色粉末, ^1H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 2.53 (2H, m, H-2), 2.86 (2H, m, H-7), 6.93 (1H, d, $J=8.16$ Hz, H-11), 7.02 (1H, d, $J=8.16$ Hz, H-12), 3.10 (1H, m, H-15), 1.27 (6H, d, $J=7.0$ Hz, 16/17- CH_3), 4.80 (2H, m, H-18), 1.01 (3H, s, 20- CH_3); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 33.5 (t, C-1), 20.1 (t, C-2), 164.4 (s, C-3), 122.4 (s, C-4), 27.2 (d, C-5), 23.7 (t, C-6), 18.9 (t, C-7), 144.8 (s, C-8), 132.7 (s, C-9), 36.8 (s, C-10), 116.7 (d, C-11), 123.8 (d, C-12), 124.8 (s, C-13), 152.5 (s, C-14), 41.7 (d, C-15), 23.2 (q, C-16), 23.1 (q, C-17), 71.1 (q, C-18), 174.2 (s, C-19), 22.6 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献 [11] 报道的 triptophenolide 波谱数据一致.

Triptobenzene E (**3**), $C_{20}H_{24}O_4$, 白色粉末, ^1H-NMR (CD_3COCD_3 , 600 MHz): δ_H 1.90 (2H, m, H-1), 2.34 (2H, m, H-2), 2.74 (2H, m, H-5/6), 2.53 (1H, dd, $J=12.9, 5.8$ Hz, H-6), 2.80 (1H, m, H-7), 2.88 (1H, dd, $J=18.3, 7.4$ Hz, H-7), 6.85 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-11), 6.96 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-12), 1.67, 1.69 (each 3H, s, H-16/17), 4.86 (2H, dd, $J=17.2$ Hz, H-19), 1.01 (3H, s, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3COCD_3 , 150 MHz): δ_C 33.3 (t, C-1), 20.1 (t, C-2), 124.7 (s, C-3), 164.5 (s, C-4), 41.8 (d, C-5), 18.9 (t, C-6), 23.3 (t, C-7), 123.6 (s, C-8), 146.4 (s, C-9), 36.9 (s, C-10), 115.3 (d, C-11), 123.4 (d, C-12), 129.2 (s, C-13), 154.8 (s, C-14), 75.8 (s, C-15), 30.8 (q, C-16), 30.8 (q, C-17), 174.2 (s, C-18), 71.1 (d, C-19), 22.5 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献 [12] 报道的 triptobenzene E 波谱数据一致.

Triptobenzene J (**4**), $C_{20}H_{30}O_3$, 油状, ^1H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 3.52 (1H, dd, $J=11.8, 4.3$ Hz, H-3), 1.43 (1H, dd, $J=12.7, 1.9$ Hz, H-5), 2.05 (1H, m, H-6), 1.66 (1H, m, H-6), 6.76 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-11), 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-12), 3.14 (1H, dt, $J=13.7, 6.8$ Hz, H-15), 1.22, 1.24 (each 3H, d, $J=6.8$ Hz, H-16/17), 1.32 (3H, s, H-18), 3.46, 4.20 (each 1H, d, $J=11.2$ Hz, H-19), 1.16 (3H, s, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 38.4 (t, C-1), 29.3 (t, C-2), 81.0 (d, C-3), 43.7 (s, C-4), 51.8 (d, C-5), 19.9 (t, C-6), 26.8 (t, C-7), 123.5 (s, C-8), 148.8 (s, C-9), 38.3 (s, C-10), 117.5 (d, C-11), 124.1 (d, C-12), 132.9 (s, C-13), 152.1 (s, C-14), 27.6 (d, C-15), 23.3 (q, C-16/17), 23.4 (s, C-18), 65.1 (t, C-19), 26.2 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献 [13] 报道的 triptobenzene J 波谱数据一致.

Wilforol F (**5**), $C_{21}H_{30}O_4$, 白色粉末, ^1H-NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_H 3.48 (1H, td, $J=14.3, 7.2$ Hz, H-15), 3.57 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-18), 4.10 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-19), 6.42 (1H, s, H-11), 1.42 (3H, s, H-18), 1.25 (6H, dd, $J=7.0, 3.7$ Hz, H-16/17), 1.20 (3H, s, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 39.5 (t, C-1), 36.9 (t, C-2), 217.7 (s, C-3), 55.2 (s, C-4), 53.5 (d, C-5), 20.7 (t, C-6), 26.2 (t, C-7), 116.8 (s, C-8), 147.3 (s, C-9), 38.6 (s, C-10), 101.2 (d, C-11), 158.4 (s, C-12), 122.2 (s, C-13), 153.0 (s, C-14), 25.7 (d, C-15), 21.2 (q, C-16), 21.3 (q, C-17), 20.8 (q, C-18), 65.7 (t, C-19), 25.3 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献 [14] 报道 wilforol F 波谱数据一致.

Triptobenzene A (**6**), $C_{20}H_{28}O_3$, 白色粉末, ^1H-NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_H 2.43 (1H, ddd, $J=14.9, 5.0, 3.2$ Hz, H-1), 1.82 (1H, m, H-1), 2.92 (2H, m, H-7/2), 2.60 (2H, m, H-7/2), 2.01 (1H, dd, $J=11.8, 8.0$ Hz, H-5), 1.80 (2H, m, H-6), 6.81 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-11), 6.95 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-12), 3.23 (1H, dt, $J=13.7, 6.9$ Hz, H-15), 1.17 (each 3H, dd, $J=10.9, 6.9$ Hz, H-16/17), 1.40 (3H, s, H-18), 3.57 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-19), 4.11 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-19), 1.20 (3H, s, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 39.6 (t, C-1), 36.9 (t, C-2), 217.7 (s, C-3), 55.2 (s, C-4), 53.5 (d, C-5), 20.6 (t, C-6), 26.5 (t, C-7), 123.4 (s, C-8), 147.6 (s, C-9), 38.3 (s, C-10), 117.5 (d, C-11), 124.2 (d, C-12), 133.4 (s, C-13), 152.2 (s, C-14), 27.6 (d, C-15), 23.2 (q, C-16), 23.3 (q, C-17), 20.8 (q, C-18), 65.7 (t, C-

19) 25.5 (q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献[14]报道的 triptobenzene A 波谱数据一致.

对醌 21 (quinone 21 **7**), $C_{20}H_{22}O_4$, 橘黄色针晶, ^1H-NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_H 6.42(1H, d, $J=1.2$ Hz, H-12), 1.12(3H, d, $J=6.9$ Hz, H-16), 1.13(3H, d, $J=6.9$ Hz, H-17), 4.71(1H, ddd, $J=17.2, 3.5, 2.0$, 1.7 Hz, H-19 α), 4.81(1H, ddt, $J=17.2, 2.9, 1.7$ Hz, H-19 β), 1.16(3H, d, $J=0.6$ Hz, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 19.1(t, C-1), 31.9(t, C-2), 125.5(s, C-3), 165.3(s, C-4), 43.6(d, C-5), 19.3(t, C-6), 25.3(t, C-7), 144.4(s, C-8), 148.8(s, C-9), 37.8(s, C-10), 188.5(s, C-11), 132.6(d, C-12), 154.8(s, C-13), 189.1(s, C-14), 27.7(d, C-15), 21.6(q, C-16/17), 176.5(s, C-18), 72.2(t, C-19), 18.9(q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献[14]报道的 quinone 21 波谱数据一致.

雷公藤甲素 (triptolide, **8**), $C_{20}H_{24}O_6$, 白色粉末, ^1H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 3.36(1H, d, $J=5.52$ Hz, H-7), 3.89(1H, d, $J=3.0$ Hz, H-11), 3.51(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-12), 3.48(1H, s, H-14), 4.67(2H, d, $J=1.5$ Hz, H-19), 1.01(3H, d, $J=7.0$ Hz, 16- CH_3), 1.15(3H, d, $J=7.0$ Hz, 17- CH_3), 1.11(3H, s, 20- CH_3); $^{13}C-NMR$ ($CDCl_3$, 150 MHz): δ_C 29.7(t, C-1), 17.1(t, C-2), 125.5(d, C-3), 160.0(s, C-4), 40.4(d, C-5), 23.6(t, C-6), 60.1(d, C-7), 60.7(s, C-8), 65.7(s, C-9), 35.7(s, C-10), 56.7(d, C-11), 54.5(d, C-12), 66.2(s, C-13), 73.4(d, C-14), 28.1(d, C-15), 17.6(q, C-16), 16.8(q, C-17), 173.3(s, C-18), 69.9(t, C-19), 13.6(q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献[15]报道的 triptolide 波谱数据一致.

Isopimar-8, 14, 15-diene-11 β , 19-diol (**9**), $C_{20}H_{32}O_2$, 白色粉末, ^1H-NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_H 5.19(1H, s, H-14), 5.76(1H, dd, $J=17.2, 10.7$ Hz, H-15), 4.90(2H, m, H-16), 0.95(3H, s, H-17), 0.99(3H, s, H-18), 3.29(1H, m, H-19), 3.75(1H, m, H-19), 0.75(3H, s, H-20); $^{13}C-NMR$ (CD_3OD , 150 MHz): δ_C 41.7(t, C-1), 19.7(t, C-2), 36.4(t, C-3), 39.7(s, C-4), 57.1(d, C-5), 23.9(t, C-6), 37.6(t, C-7), 139.4(s, C-8), 60.8(d, C-9), 40.9(s, C-10), 66.7(d, C-11), 47.0(t, C-12), 40.1(s, C-13), 128.7(d, C-14), 147.6(d, C-15), 113.1(t, C-16), 30.2(q, C-17), 27.9(q, C-18), 64.9(q, C-19), 17.4(q, C-20). 综合以上数据, 发现与文献[7]报道的 isopimar-8(14), 15-diene-11 β , 19-diol 波谱数据一致.

昆明山海棠茎叶中分离得到的化合物见图 1.

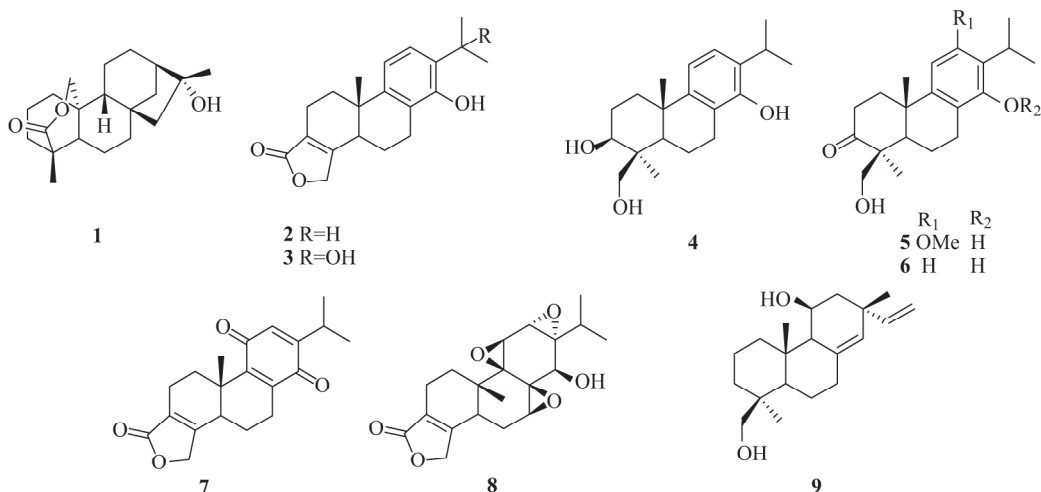


图1 昆明山海棠茎叶中分离得到的化合物
Fig.1 Compounds from the stems and leaves of *T. hypoglaucum*

2.2 抗肿瘤活性

如表 1 所示, 雷公藤甲素(8)对 HepG2 肝癌细胞株具有显著的细胞毒活性($IC_{50} = 0.2 \mu\text{M}$), 其活性高于阳性对照 Dox($IC_{50} = 6.3 \mu\text{M}$)。化合物 8 对肝癌阿霉素耐药株 HepG2/Adr 也显示了显著的细胞毒活性($IC_{50} = 2.7 \mu\text{M}$), 与文献报道一致^[16, 17]。

2.3 NO 生成抑制活性

如表 2 所示, 化合物 4~6 均显示了微弱的抑制 NO 生成活性, 而 2, 3, 7 和 8 显示了显著的抑制 NO 生成活性, 其中化合物 2($IC_{50} = 4.9 \mu\text{M}$)、7($IC_{50} = 2.6 \mu\text{M}$) 和 8($IC_{50} = 1.9 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) 的活性显著优于阳性对照 L-NMMA($IC_{50} = 11.3 \mu\text{M}$)。

表 1 化合物 1~9 对 HepG2 和 HepG2/Adr 的细胞毒活性

Tab.1 Cytotoxic activity of 1-9 on HepG2 cells and HepG2/Adr cells

| 化合物 | $IC_{50} / \mu\text{M}$ | |
|-----|-------------------------|---------------------|
| DOX | 6.3 ^a | >20.0 ^b |
| 1 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 2 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 3 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 4 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 5 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 6 | >20.00 ^a | >20.00 ^b |
| 7 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |
| 8 | 0.2 ^a | 2.7 ^b |
| 9 | >20.0 ^a | >20.0 ^b |

注: DOX(阿霉素)为阳性对照; ^aHepG2 细胞;

^bHepG2/Adr 细胞。

表 2 化合物 1~9 的 NO 生成抑制活性

Tab.2 The inhibitory activity of 1-9 on NO production in vitro

| 化合物 | $CC_{50} / \mu\text{M}$ | $IC_{50} / \mu\text{M}$ |
|--------|-------------------------|-------------------------|
| L-NMMA | >50.0 | 11.3 |
| 1 | >50.0 | >50.0 |
| 2 | >50.0 | 4.9 |
| 3 | >50.0 | 15.4 |
| 4 | >50.0 | 38.1 |
| 5 | >50.0 | 46.9 |
| 6 | >50.0 | 34.3 |
| 7 | >50.0 | 2.58 |
| 8 | 2.5×10^{-1} | 1.9×10^{-2} |
| 9 | >50.0 | >50.0 |

注: L-NMMA(iNOS 抑制剂)为阳性对照。

2.4 抗流感活性

化合物 4 和 7 具有抗 A/PR/8/34 (H1N1) 流感病毒(达菲耐药株)活性, EC_{50} 分别为 $38.6 \pm 10.7 \mu\text{M}$ 和 $22.9 \pm 6.4 \mu\text{M}$, 且具有较高的选择系数(>2)。进一步检测了化合物 4 和 7 对甲型流感病毒敏感株(A/Hong Kong/8/68 (H3N2)) 的抗流感病毒活性, 其中化合物 7 仍具较好的抗流感病毒作用($EC_{50} = 21.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$)。见表 3。

表 3 化合物的体外抗甲型流感活性

Tab.3 Anti-influenza A activity of compounds in vitro

| 化合物 | 达菲耐药株 | | 敏感株 |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | $CC_{50} / \mu\text{M}$ | $EC_{50} / \mu\text{M}$ | $EC_{50} / \mu\text{M}$ |
| 3 | >60.0 | >60.0 | - |
| 4 | >60.0 | 38.6 ± 10.7 | >60.0 |
| 5 | - | * - | - |
| 6 | - | * - | - |
| 7 | 55.1 ± 6.4 | 22.9 ± 6.4 | 21.6 ± 0.6 |
| 9 | >60.0 | >60.0 | - |

注: * - 选择系数低于 2 (选择系数 = CC_{50} / EC_{50})。

3 讨论

结合本课题组前期对三种雷公藤属植物(雷公藤、东北雷公藤、昆明山海棠)的研究发现^[7-8, 18], 昆明山海棠与雷公藤属植物雷公藤化学成分种类具有较大的相似性, 都含有二氢沉香呋喃型倍半萜、二萜和三萜类。东北雷公藤化学成分与昆明山海棠和雷公藤有较大差异, 主要为黄酮、木脂素和二氢沉香呋喃型倍半萜。从形态学特征和转录间隔区(ITS)和 5s rDNA 的分子角度分析^[19], 雷公藤和昆明山海棠这两个种亲缘上也更为接近。雷公藤甲素(8)对肝癌阿霉素敏感株和耐药株均显示了显著的细胞毒活性, 表明三元环氧松香烷型二萜是雷公藤属植物抗肿瘤的主要活性成分, 而三元环氧结构可能是其抗肿瘤活性的必须结构片段, 与文献报道一致^[2, 16]。

4 结 论

本实验主要对昆明山海棠的 95% 甲醇/水提取物的乙酸乙酯相进行分离纯化,并从中分离得到的 9 个二萜类成分,其中 3、5 和 8 为首次从昆明山海棠中分离得到。化合物 2、3、7 和 8 均显示了显著的抑制 NO 生成活性,且雷公藤甲素(8)的活性比化合物 2、3、7 和阳性对照药的 IC_{50} 值低两个数量级。初步的构效关系分析提示五元不饱和内酯环可能是其抗炎活性的关键基团,而高度氧化的 B 环和 C 环(三元环氧结构)是助效基团。化合物 4 和 7 具有显著的抗耐奥司他韦(oseltamivir)甲型流感病毒 PR8 病毒株(A/PR/8/34(H1N1))的作用;化合物 7 还具有较好的抗甲型流感病毒敏感株(A/Hong Kong/8/68(H3N2))活性。

参考文献:

- [1] 谢晨琼,周萍,李祥,等. 昆明山海棠化学成分及药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1996-2010.
- [2] BRINKER A M, MA J, LIPSKY P E, et al. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(6): 732-766.
- [3] CHEN X L, LIU F, XIAO X-R, et al. Anti-inflammatory abietanes diterpenoids isolated from *Tripterygium hypoglaucum* [J]. *Phytochemistry (Elsevier)*, 2018, 156: 167-175.
- [4] ZHAO Q, LI H M, CHEN X-Q, et al. Terpenoids from *Tripterygium hypoglaucum* and their anti-inflammatory activity [J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54(3): 471-474.
- [5] LI C. Diterpene compound extracted from *Tripterygium hypoglaucum* and application for prepg. immunosuppressive drugs, CN104478832A [P/OL]. 2015.
- [6] QIU D, KAO P N. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f [J]. *Drugs in R&D*, 2003, 4(1): 1-18.
- [7] LI X L, GAO L H, LI H M, et al. Diterpenoids from the stems of *Tripterygium hypoglaucum* (Celastraceae) and cytotoxic evaluation [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 12, 84-89.
- [8] 李晓蕾. 昆明山海棠化学成分、生物活性及相关指纹图谱初探 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015.
- [9] DANG Z, JUNG K, ZHU L, et al. Identification and synthesis of quinolizidines with anti-influenza a virus activity [J]. *Acs Med Chem Lett*, 2014, 5(8): 942-946.
- [10] CHEN K, SHI Q, FUJIOKA T, et al. Anti-AIDS agents, 4. Tripterifordin, a novel anti-HIV principle from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation [J]. *Journal of Natural Products*, 1992, 55(1): 88-92.
- [11] 刘珍珍,赵荣华,邹忠梅. 昆明山海棠根皮化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2503-2506.
- [12] TAKAISHI Y, WARIISHI N, TATEISHI H, et al. Phenolic diterpenes from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(5): 979-984.
- [13] MORITA H, WEI L, GONDA A, et al. A taxoid from *Taxus cuspidata* var. *nana* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(3): 583-586.
- [14] MOROTA T, QIN W Z, TAKAGI K, et al. Diterpenoids from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(40): 865-870.
- [15] KUPCHAN S M, COURT W A, DAILEY R G, et al. Triptolide and triptidiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Journal of the American Society*, 1972, 94(20): 7194-7195.
- [16] LUO Y, SHI C, LIAO M. Advance in the anti-tumor mechanism of triptolide [J]. *China journal of Chinese materia medica*, 2009, 34(16): 2024-2026.
- [17] CUI J, CHEN X, SU J C. Advanced progress of main pharmacology activities of triptolide [J]. *China journal of Chinese materia medica*, 2017, 42(14): 2655-8.
- [18] 戴伟锋,朱雅竹,李洪梅,等. 东北雷公藤中萜类化学成分研究 [J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2016, 41(1): 82-87.
- [19] LAW K Y, SIMMONS M P, TECHEN N, et al. Molecular analyses of the Chinese herb *Leigongteng* (*Tripterygium wilfordii* Hook.f.) [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(1): 21-26.