

辣椒净光合速率 Hayman 双列杂交分析

邹学校^{1,2*}, 张竹青^{1,2,3}, 陈文超^{1,2,3},
刘荣云^{1,2}, 戴雄泽^{1,2,3}, 马艳青^{1,2,3}, 李雪峰^{1,2,3}

(1. 湖南省蔬菜工程与技术重点实验室, 长沙 410125; 2. 湖南省蔬菜工程技术研究中心, 长沙 410125;
3. 湖南省农业科学院国家辣椒新品种研究推广中心, 长沙 410125)

摘要: 用辣椒(*Capsicum annuum* L.) 6 个亲本, 按(1/2)n(n-1)双列杂交法配制 15 个杂交组合, 用 Hayman 双列杂交分析法估算不同开花结果时期净光合速率的遗传参数。阵列协方差(Wr)对阵列方差(Vr)的回归分析结果表明, 辣椒开花结果前期、中期、后期净光合速率的遗传都不符合“加性-显性”模型。Wr+Vr 与亲本 Yr 间的相关分析表明含有更多高净光合速率, 显性基因的亲本具有较大的 Wr+Vr 值。遗传参数估算表明开花结果时期的净光合速率遗传是显性效应比加性效应更加重要, 同时还存在显著上位性效应。狭义遗传力较小, 开花结果中、后期杂种优势比前期明显。

关键词: 辣椒; 双列杂交; 净光合速率; 遗传参数

中图分类号: Q348

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0244-05

Hayman Diallel Cross Analysis of Net Photosynthetic Rate in Pepper (*Capsicum annuum* L.)

ZOU Xue-xiao^{1,2*}, ZHANG Zhu-qing^{1,2,3}, CHEN Wen-chao^{1,2,3},
LIU Rong-yun^{1,2}, DAI Xiong-ze^{1,2,3}, MA Yan-qing^{1,2,3}, LI Xue-feng^{1,2,3}

(1. Hunan Key Laboratory of Vegetable Engineering and Technology, Changsha 410125, China; 2. Hunan Vegetable Research and Development Center, Changsha 410125, China; 3. National Research and Extension Center of New Pepper Variety Technology, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China)

Abstract: Genetic parameters in net photosynthesis were determined by Hayman method during flowering and fruit set stages of 6 pepper (*Capsicum annuum* L.) parent cultivars and their 15 cross combinations established by the (1/2) n (n-1) diallel cross. The results of regression analysis of array covariance (Wr) and array variance (Vr) indicated that the net photosynthetic rate didn't genetically coincide with the additive-dominant model. The results of correlation analysis of Wr+Vr and parent Yr indicated that Wr+Vr values were larger in the parents with more dominant genes governing high net photosynthetic rate. The genetic parameters showed that the dominant effect variance was more importance than the additive one in the inheritance of net photosynthesis during the flowering and fruit set stages, and epistatic effect was found significant as well. The parents had low narrow heritability and the heterosis was less obvious at the early stages of the flowering and fruit set than the middle and late stages.

Key words: *Capsicum annuum* L.; Diallel cross; Net photosynthetic rate; Genetic parameter

收稿日期: 2006-07-17

接受日期: 2006-11-28

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAD01A07); 湖南省重大课题(2006NK2013)资助

* 通讯作者 Corresponding author

光合作用是农作物产量形成的基础, 研究作物光合作用的遗传, 有助于选育高产品种。国内外对辣椒(*Capsicum annuum* L.) 光合作用特性的研究报道较少, 霍振荣等^[1]研究了不同品种、不同叶位间净光合速率的差异和日变化规律。邹学校等^[2-3]研究了辣椒净光合速率配合力、杂种优势及遗传稳定性。这些研究结果对辣椒杂交品种的选育起了一定的指导作用。近年来, Hayman 双列杂交法已开始应用于蔬菜遗传育种研究中。顾兴芳等^[4]研究了保护地黄瓜苗期性状的遗传, 认为单株子叶面积、真叶面积和地上鲜样质量的遗传以显性效应为主, 株高和下胚轴长度的遗传以加性效应为主。封林林等^[5]研究了茄子青枯病抗性的遗传, 认为茄子对青枯病的抗性遗传规律符合“加性 - 显性”模型。阎淑珍等^[6]、邹学校等^[7]研究了辣(甜)椒烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、疮痂病和疫病抗性的遗传, 认为辣(甜)椒对 TMV、CMV 和疮痂病抗性遗传符合“加性 - 显性”模型, 为不完全显性, 加性效应更加重要; 疫病抗性遗传不符合“加性 - 显性”模型, 还存在显著上位性效应。但目前未见有关用 Hayman 双列杂交法研究辣椒净光合速率遗传规律的研究。为此本研究用 Hayman 双列杂交法, 探讨辣椒不同开花结果时期净光合速率的遗传, 为辣椒高光效育种提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

供试材料为辣椒(*Capsicum annuum* L.) 品种伏地尖、矮秆早、河西牛角椒、湘潭晚班椒、小矮秧和上海甜椒品种, 由湖南省农业科学院蔬菜研究所提供, 2001 年冬在海南岛用它们作亲本按 $(1/2)n(n-1)$ 双列杂交配制 15 个杂种 1 代。试验在长沙市湖南省蔬菜研究所试验示范农场进行。2003 年 12 月 27 日播种, 2004 年 3 月 10 日假植 1 次, 4 月 15 日定植于大田。随机区组设计, 3 次重复。每个小区面积 3.75 m^2 , 定植 20 株。田间管理同当地常规栽培。

1.2 测定项目及数据处理方法

在开花结果前期(5 月 18 日上午)、中期(6 月 10 日上午)、后期(6 月 28 日上午), 每小区随机取样 3 株, 选取植株顶部刚成熟的正常功能叶进行测定, 在田间分别用美国 CID 公司开放型 C1310 便携式

光合测定系统测定了 6 个亲本、15 个杂种 1 代叶片的净光合速率($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。统计分析按刘来福等^[8]的方法, 并用唐启义等^[9]的 DPS 数据处理系统进行计算处理。

2 结果和分析

方差分析结果表明, 开花结果前期、中期、后期净光合速率的遗传型(处理)变异达到了显著或极显著水平, 因此可继续按 Hayman 双列杂交分析方法估算辣椒净光合速率的遗传参数。

2.1 W_r 与 V_r 间的回归分析

根据双列表分别计算开花结果前期、中期、后期净光合速率的阵列方差(V_r)和阵列与非轮回亲本的协方差(W_r), 结果见表 1。然后根据 Hayman 的估算方法, 分别计算开花结果 3 个时期净光合速率的协方差 W_r 对方差 V_r 的回归系数(b)、回归截距(a)和回归系数的标准误(S_b), 结果见表 2。3 个时期净光合速率的 W_r 与 V_r 的回归方程分别是: 前期为 $W_r=0.0561-0.0267V_r$; 中期为 $W_r=0.2404-0.5003V_r$; 后期为 $W_r=0.0781+0.0848V_r$ 。经 t 测验, 开花结果前期、中期、后期净光合速率的回归系数 b 与 1 之间的差异达极显著水平, 因此 Hayman 假设不成立, 开花结果前期、中期、后期净光合速率遗传不符合“加性 - 显性”模型, 还存在显著上位性效应。根据回归方程, 开花结果前期、中期、后期净光合速率 W_r 对 V_r 的回归线在 W_r 轴线上的截距均大于 0, 可以推断, 3 个时期净光合速率的遗传均为部分显性。

2.2 W_r+V_r 与 Y_r 间的相关分析

利用表 1 中的数据对 W_r+V_r 与 Y_r 间进行相关分析, 结果见表 2。从表 2 可知, 开花结果前期、中期、后期净光合速率的 W_r+V_r 与 Y_r 间的相关系数分别为 0.7758、0.6277 和 0.2096, 呈正相关, 但都未达到显著水平, 说明含有更多高净光合速率显性基因数的亲本具有较大的 W_r+V_r 值, 因而得出开花结果前期、中期、后期净光合速率亲本中含有高净光合速率显性基因数由多到少的顺序分别是: 前期为湘潭晚班椒 > 河西牛角椒 > 上海甜椒 > 矮秆早 > 伏地尖 > 小矮秧; 中期为上海甜椒 > 小矮秧 > 伏地尖 > 矮秆早 > 湘潭晚班椒 > 河西牛角椒; 后期为湘潭晚班椒 > 矮秆早 > 上海甜椒 > 河西牛角椒 > 伏地尖 > 小矮秧。

2.3 遗传参数估算

按 Hayman 法估算了开花结果前期、中期、后期净光合速率的加性效应方差(D)、加性效应与显性效应协方差(F)、显性效应方差(H₁)、亲本中正负基因不对称引起的显性方差(H₂)、平均显性度(H₁/D)^{1/2}、亲本中显性和隐性基因的比例

($R=[(4DH_1)^{1/2}+F]/[(4DH_1)^{1/2}-F]$)、F₁ 显性效应之和(h²)、控制性状表现显性的基因组数(h²/H₂)、狭义遗传力(h²_N(%))和广义遗传力(h²_B(%))等遗传参数, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 在开花结果前期净光合速率遗传中, 显性效应方差(H₁)和亲本中正负基因不对称引起的显性方差(H₂)明显大于加性效应方差(D),

表 1 辣椒亲本开花结果时期净光合速率的遗传方差(Vr)和遗传协方差(Wr)
Table 1 Genetic variance (Vr) and genetic covariance (Wr) of net photosynthetic rate at flowering and fruit set stages of pepper parents

时期 Phase	亲本 Parent	Wr	Vr	Wr-Vr	Wr+Vr	Yr
前期 Early	伏地尖 Fudijian	-0.0044	0.5693	-0.5737	0.5649	2.4033
	矮杆早 Aiganzao	0.0700	0.5399	-0.4699	0.6099	2.2667
	河西椒 Hexijiao	0.0097	0.7605	-0.7508	0.7702	2.9100
	湘潭晚 Xiangtanwan	-0.0077	1.2315	-1.2392	1.2238	2.7133
	小矮秧 Xiaoiyang	-0.0346	0.1858	-0.2204	0.1512	1.9767
	上海甜椒 Shanghai Tianjiao	0.2015	0.5279	-0.3264	0.7294	2.3433
	总和 Total	0.2345	3.8149	-3.5804	4.0493	14.6133
	平均值 Average	0.0391	0.6358	-0.5967	0.6749	2.4356
中期 Middle	伏地尖 Fudijian	-0.1266	0.6206	-0.7472	0.4940	1.9667
	矮杆早 Aiganzao	0.0629	0.4296	-0.3667	0.4925	1.3333
	河西椒 Hexijiao	0.1454	0.1550	-0.0096	0.3004	1.0133
	湘潭晚 Xiangtanwan	0.1125	0.3502	-0.2378	0.4627	2.1777
	小矮秧 Xiaoiyang	0.1878	0.3448	-0.1570	0.5326	1.1567
	上海甜椒 Shanghai Tianjiao	-0.0244	1.1532	-1.1776	1.1288	2.0000
	总和 Total	0.3575	3.0534	-2.6959	3.4109	9.6477
	平均值 Average	0.0596	0.5089	-0.4493	0.5685	1.6079
后期 Late	伏地尖 Fudijian	0.0857	0.0728	0.0129	0.1586	0.1900
	矮杆早 Aiganzao	0.1459	0.4596	-0.3137	0.6055	0.7633
	河西椒 Hexijiao	0.1063	0.1209	-0.0146	0.2271	0.9467
	湘潭晚 Xiangtanwan	0.0898	0.5454	-0.4556	0.6352	0.9900
	小矮秧 Xiaoiyang	0.0397	0.0189	0.0208	0.0586	1.0567
	上海甜椒 Shanghai Tianjiao	0.1177	0.1547	-0.0370	0.2723	0.1467
	总和 Total	0.5850	1.3723	-0.7872	1.9573	4.0933
	平均值 Average	0.0975	0.2287	-0.1312	0.3262	0.6822

表 2 辣椒亲本开花结果时期净光合速率 Wr 与 Vr 回归分析
Table 2 Regression analysis of Wr and Vr of net photosynthetic rate at flowering and fruit set stages of pepper parents

参数 Parameter	Wr与Vr间回归系数 Regression coefficient of Wr and Vr (b)	回归截距 Regression intercept (a)	回归系数的标准误 Standard error of regression coefficient (SD)	t _{b-1}	t _{0.01}	Wr+Vr与Yr间相关系数 Correlation coefficient of Wr+Vr and Yr
前期 Early	-0.0267**	0.0561	0.1248	8.2247	4.6040	0.7758
中期 Middle	-0.2208**	0.1720	0.1255	9.7865	4.6040	0.4619
后期 Late	0.0848**	0.0781	0.0697	13.1256	4.6040	0.2096

说明开花结果前期净光合速率遗传是以显性效应为主,显性效应比加性效应更加重要。因此它的平均显性度大(2.4223),亲本中显性和隐性基因的比例大于3,广义遗传力中等,略大于50%,狭义遗传力较小,广义遗传力明显大于狭义遗传力。但它的F₁代杂种显性效应之和和控制性状表现显性的基因组数都少于0.5,进一步说明了辣椒开花结果前期净光合速率遗传不符合“加性-显性”模型,存在显著的上位性效应。

比较不同开花结果时期估算的净光合速率遗传参数差异(表3)发现,中、后期遗传参数反映的遗传规律与前期基本相似,但数据的绝对值大小有差异,加性效应方差、加性效应与显性效应协方差、显性效应方差、亲本中正负基因不对称引起的显性方差、平均显性度是前期最大,中期逐渐减小,后期最小;F₁所有位点显性效应之和、控制性状表现显性的基因组数和狭义遗传力是前期较小,中期逐渐增加,后期最大;亲本中显性和隐性基因的比例和广义遗传力前后期之间差异没有明显规律性。

3 讨论

邹学校等^[2]的研究表明,辣椒开花结果的前、中、后期都是特殊配合力方差明显大于一般配合力方差,说明辣椒控制开花结果期光合作用的基因效应是显性效应和上位性效应之和明显大于加性效应。本研究用 Hayman 双列杂交分析法估算的遗传结果与配合力分析的结果基本一致,辣椒开花结果前期加性效应方差、加性效应与显性效应协方差、显性效应方差、亲本中正负基因不对称引起的显性方差、平均显性度明显大于后期,这可能是植株在开花结果前期的光合作用旺盛,中、后期光合作用逐渐下降所致。我们在调查辣椒植株的净光合速率时发现,开花结果前期的净光合速率普遍较大,大部分在1-4 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之间,植株的个体差异大;开花结果中期,植株的净光合速率中等,大部分在1-2 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之间,个体间差异明显减小;开花结果后期,植株的净光合速率明显减小,大部分在1 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下,个体间差异也较小。但这些遗传参数反映的遗传趋势基本一致。

表3 辣椒开花结果的不同时期净光合速率的遗传参数

Table 3 Genetic parameters of net photosynthetic rate at flowering and fruit set stages of pepper parents

遗传参数 Genetic parameter	前期 Early	中期 Middle	后期 Late
加性效应方差 Additive effect variance (D)	0.3239**	0.2940**	0.1570**
加性效应与显性效应协方差 Covariance of additive and dominant effect (F)	0.8156	0.5856	0.1498
显性效应方差 Dominant effect variance (H ₁)	1.9002**	1.5014*	0.5004**
亲本中正负基因不对称引起的显性方差 Dominant variance due to asymmetry of genes (H ₂)	1.1415**	1.0572*	0.3056*
平均显性度 Average dominance (H ₁ /D) ^{1/2}	2.4223	2.2598	1.7853
亲本中显性和隐性基因的比例 Ratio of dominant genes: recessive genes in parents (R)	3.1654	2.5759	2.8211
F ₁ 所有位点显性效应的和 Sum of dominant effect of all loci of F ₁ progeny (h ²)	0.4846**	0.7066**	0.7627**
控制性状表现显性的基因组数 The number of genomes governing dominant traits (h ² /H ₂)	0.4245	0.6684	2.4953
狭义遗传力 Narrow heritability h ² _N (%)	14.42	16.78	22.38
广义遗传力 Broad heritability h ² _B (%)	56.71	59.61	58.04

*和**分别代表5%和1%的差异显著水平。* and ** represent significant differences at 5% and 1% levels, respectively.

邹学校等^[1]的研究表明,辣椒净光合速率杂种优势明显,但主要表现在开花结果的中后期。本研究表明辣椒开花结果前期 F_1 所有位点显性效应之和、控制性状表现显性的基因组数较少,中、后期逐渐增加,特别是控制性状表现显性的基因组数增加较多。进一步说明了辣椒净光合速率杂种优势在开花结果的中后期比前期明显。狭义遗传力后期比前期大,说明辣椒在开花结果前期控制光合作用的基因效应存在复杂上位性效应即非等位基因间互作。 W_r+V_r 与 Y_r 间相关分析表明,开花结果的前期、中期、后期在亲本中所含的高净光合速率显性基因数由多到少的顺序有明显差异,这可能是由于参试品种的熟性不同,不同熟性品种的植株在生长发育过程中达到最佳光合作用的时间有先后,因此导致启动全部高净光合速率显性基因的时间不同。

比较用 W_r 对 V_r 的回归截距推断的辣椒净光合速率基因显性情况与用平均显性度测验结果的差异,发现开花结果的前、中、后期的结果都是完全相反,这进一步说明了辣椒净光合速率的遗传不符合“加性-显性”模型,还存在显著的上位性效应。

参考文献

- [1] Huo Z R(霍振荣), Pang J A(庞金安), Du S L(杜胜利). Studies on the photosynthesis character of pepper [J]. Acta Agri Boreal-Sin (华北农学报), 1998, 13(3):121-124.(in Chinese)
- [2] Zou X X(邹学校), Ma Y Q(马艳青), Liu R Y(刘荣云), et al. Combining ability analyses of net photosynthesis rate in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Sci Agri Sin (中国农业科学), 2006, 39(11): 2300-2306.(in Chinese)
- [3] Zou X X(邹学校), Ma Y Q(马艳青), Chen W C(陈文超), et al. The analysis of heterosis and stability of net photosynthesis rate of pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Acta Agri Shanghai (上海农业学报), 2005, 21(3): 4-8.(in Chinese)
- [4] Gu X F(顾兴芳), Zhang C Z(张春震), Feng L L(封林林), et al. Genetic analysis of some seeding characters in protected cucumber [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2002, 29(5): 443-446.(in Chinese)
- [5] Feng L L(封林林), Qu D Y(屈冬玉), Jin L P(金黎平), et al. Genetic analysis of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2003, 30(2): 163-166.(in Chinese)
- [6] Yan S Z(阎淑珍), Ju L R(鞠丽荣), Xu X R(徐香瑞), et al. Genetic analysis on resistance of sweet (hot) pepper to CMV [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 1996, 23(1): 45-48.(in Chinese)
- [7] Zou X X(邹学校), Hou X L(侯喜林), Chen W C(陈文超), et al. Diallel crossing analyses of resistance to main diseases in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Sci Agri Sin (中国农业科学), 2004, 37(11): 1636-1640.(in Chinese)
- [8] Liu L F(刘来福), Mao S X(毛盛贤), Huang Y Z(黄远樟). Crop Quantitative Inheritance [M]. Beijing: Agricultural Press, 1984: 125-149.(in Chinese)
- [9] Tang Q Y(唐启义), Feng G M(冯明光). Practical Statistical Analysis and its DPS Digital Treatment System [M]. Beijing: Science Press, 2002: 256-259.(in Chinese)

红树林植物瓶花木中的细胞毒活性成分

曾艳波, 梅文莉, 庄 令, 洪 葵, 戴好富*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要:从红树林植物瓶花木 (*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. F.) 的乙醇提取物中分离得到 6 个化合物, 经波谱分析及与文献数据对照确定其结构分别为: betulone (1)、3,4,5-三甲氧基苯酚- β -D-吡喃葡萄糖苷(2)、 α -香树脂醇(3)、 β -香树脂醇(4)、 β -谷甾醇(5)和豆甾醇(6)。经 MTT 法活性测定, 结果表明化合物 1 对肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖显示生长抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ 。

关键词:瓶花木; 化学成分; 细胞毒活性; MTT; SMMC-7721

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2007)03-0249-04

Cytotoxic Components from Mangrove Plant *Scyphiphora hydrophyllacea*

ZENG Yan-bo, MEI Wen-li, ZHUANG Ling, HONG Kui, DAI Hao-fu*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Six compounds were isolated from the ethanol extract of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. F.. Their structures were identified as betulone (1), 3,4,5-trimethoxyphenol- β -D-glucopyranoside (2), α -amyrin (3), β -amyrin (4), β -sitosterol (5), and stigmasterol (6) by spectroscopic evidence (IR, NMR, MS, etc.) and comparison of their spectral data with those of the literatures. The cytotoxicity of all the compounds were tested by MTT assay, and compound 1 showed inhibitory activity towards human hepatoma cell line SMMC-7721 with the IC_{50} value of $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Key words: *Scyphiphora hydrophyllacea*; Chemical constituents; Cytotoxic activity; MTT; SMMC-7721

红树林是指自然分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落。由于其特殊的生长环境, 红树林植物富含结构新颖、具有生物活性的化合物, 部分红树林植物具有很高的药用价值, 已成为寻找天然生物活性成分的重要资源之一^[1-2]。

红树林植物瓶花木(*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. F.)属于茜草科(Rubiaceae)瓶花木属, 分布于亚洲南部至东南部, 南至加罗林群岛、澳大利亚和新喀里多尼亚, 在我国只分布于海南, 为组成红树林树种之一^[3]。为了有效开发我国红树林资源, 从中

找寻具有药用价值的生物活性成分, 我们曾对海南产的红树林植物提取物进行了细胞毒活性筛选^[4], 并报道了瓶花木的乙醇提取物对小鼠 B_{16} 细胞具有细胞毒活性并从中分离鉴定了 6 个化合物^[5]。进一步的研究表明采于海南文昌的瓶花木乙醇提取物对肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖显示了一定的生长抑制活性。为了寻找其中的肝癌细胞毒活性成分, 我们对瓶花木的乙醇提取物进行分离, 鉴定了部分化合物的结构, 并进行体外肝癌细胞毒活性测定。

收稿日期: 2006-11-13

接受日期: 2007-03-08

基金项目: 海南省自然科学基金项目(20502)资助

* 通讯作者 Corresponding author

1 材料和方法

1.1 材料

瓶花木于 2004 年 11 月采自海南省文昌市红树林保护站,并经中国热带农业科学院热带生物技术研究所代正福鉴定为茜草科瓶花木属瓶花木 (*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. F.), 凭证标本 (SG20411)存放于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.2 仪器和试剂

熔点用北京泰克仪器有限公司生产的 X-5 型显微熔点仪测定 (未校正); IR 用 Bio-Rad FTS 仪测定, KBr 压片; MS 用 VG Autospec-3000 型测定; NMR 用 Bruker AM-500 超导核磁仪测定, 以 TMS 为内标; CO₂ 培养箱 (Sheldon Manufacturing Inc.); 超净工作台 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); MK3 酶标仪 (上海雷勃分析有限公司)。

薄层层析硅胶和柱层析硅胶均为青岛海洋化工厂产品, Sephadex LH-20 为 Merck 公司产品。重蒸工业级氯仿、甲醇、乙酸乙酯和 95% 乙醇; 分析纯正丁醇; 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、MEM 和平衡盐溶液 PBS (北京欣经科公司); 丝裂霉素 C (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.)。

1.3 细胞株及培养条件

肝癌 SMMC-7721 细胞购自武汉大学培养物保藏中心。细胞培养在含有 10% 小牛血清的 MEM 培养基中, 于 5% CO₂、湿度 90% 以上、37°C 温箱中培养, 贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化。

1.4 提取和分离

瓶花木干燥枝条 (17.6 kg) 粉碎后, 用 95% 的乙醇室温浸提 3 次, 减压回收乙醇至无醇味。将乙醇提取物分散于水中成悬浊液, 经石油醚萃取得到石油醚部分, 水液经过滤后进行大孔吸附树脂 (D-101) 柱层析, 先后用水和甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 经浓缩得到甲醇部分 (421.0 g)。甲醇部分经硅胶柱层析, 用氯仿 - 甲醇梯度洗脱, 合并相同流份得到 26 个部分 (Fr.1 - Fr.26)。Fr.1 经硅胶柱层析以石油醚 - 乙酸乙酯 (6 : 4) 为洗脱液分成 4 个部分 (Fr.1-1 - Fr.1-4), Fr.1-2 经 TLC 检测为纯化合物, 即化合物 1 (167 mg); Fr.1-3 经 Sephadex LH-20 柱层析, 以 95% 乙醇洗脱, 主成分再经硅胶柱层析以石油醚 - 乙酸

乙酯 (1:1) 为洗脱液分离得到化合物 3 (252 mg) 和化合物 4 (217 mg)。Fr.10 经过硅胶柱层析, 以氯仿 - 甲醇 (13:1) 为洗脱液, 有结晶析出, 重结晶后纯化得到化合物 2 (1.6 g)。石油醚部分经减压硅胶柱层析, 以石油醚 - 乙酸乙酯梯度洗脱得到 10 个部分 (Fr.P-1 - Fr.P-10), Fr.P-4 经硅胶柱层析, 以石油醚 - 乙酸乙酯 (8:2) 为洗脱液得到化合物 5 (39 mg) 和 6 (58 mg)。

1.5 结构鉴定

Betulone (1) 无色针晶 (氯仿), mp 175-176°C; $[\alpha]_D^{20} = +16.4^\circ$ (CHCl₃, *c* 0.2); EI-MS (*m/z*): 440 [M]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.69 (1H, s, H-29a), 4.58 (1H, d, H-29b), 3.80 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-28a), 3.34 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-28b), 2.48 (2H, m, H-2), 2.40 (1H, m, H-19), 1.96 (1H, m, H-16a), 1.96 (1H, m, H-21a), 1.90 (1H, m, H-1a), 1.90 (1H, m, H-22a), 1.68 (3H, s, H-30), 1.42 (1H, m, H-21b), 1.38 (1H, m, H-1b), 1.22 (1H, m, H-16b), 1.07 (3H, s, H-23), 1.06 (3H, s, H-26), 1.04 (1H, m, H-22b), 1.02 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 218.1 (s, C-3), 150.4 (s, C-20), 109.7 (t, C-29), 60.4 (t, C-28), 54.8 (d, C-5), 49.7 (d, C-9), 48.6 (d, C-18), 47.7 (s, C-17), 47.7 (d, C-19), 47.3 (s, C-4), 42.7 (s, C-14), 40.8 (s, C-8), 39.5 (t, C-1), 37.4 (d, C-13), 36.8 (s, C-10), 34.1 (t, C-2), 33.9 (t, C-22), 33.5 (t, C-7), 29.7 (t, C-21), 29.1 (t, C-16), 27.0 (t, C-15), 26.6 (q, C-23), 25.2 (t, C-12), 21.3 (t, C-11), 21.0 (q, C-24), 19.6 (t, C-6), 19.0 (q, C-30), 15.9 (q, C-25), 15.8 (q, C-26), 14.9 (q, C-27)。上述数据与文献 [6] 报道的一致。

3,4,5-三甲氧基苯酚-β-D-吡喃葡萄糖苷 (2) 无色针晶 (甲醇), mp 201-203°C; $[\alpha]_D^{20} = -22.3^\circ$ (MeOH, *c* 0.38); FAB-MS (*m/z*): 345 [M-H]⁻, 183 [M-Glc]⁻; IR_{ν_{max}}^{KBr}, cm⁻¹: 3 410, 2 910, 1 650, 1 075; EI-MS (*m/z*): 346, 184, 169, 84; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 6.44 (1H, s, H-6), 6.44 (1H, s, H-2), 4.76 (1H, d, *J* = 7.32 Hz, H-1'), 3.87 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.0 Hz, H-6'a), 3.76 (3H, s, 3-OCH₃), 3.76 (3H, s, 5-OCH₃), 3.65 (3H, s, 4-OCH₃), 3.61 (1H, dd, *J* = 6.6, 12.0 Hz, H-6'b), 3.38-3.42 (3H, overlap, 2'-H, 3'-H, 5'-H), 3.26 (1H, m, 4'-H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 156.0 (s, C-1), 154.8 (s, C-3), 154.8 (s,

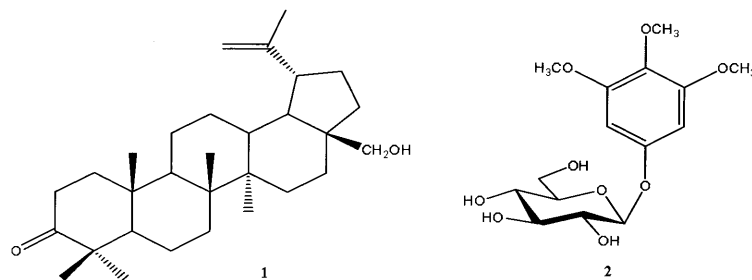


图1 化合物1和2的结构

Fig. 1 Structures of Compounds 1 and 2

C-5), 134.5 (s, C-4), 103.2 (d, C-1'), 96.2 (d, C-2), 96.2 (d, C-6), 78.4 (d, C-3'), 78.1 (d, C-5'), 75.0 (d, C-2'), 71.7 (d, C-4'), 62.7 (t, C-6'), 61.2 (q, 4-OCH₃), 56.6 (q, 3-OCH₃), 56.6 (q, 5-OCH₃)。上述数据与文献[7]报道的一致。

α-香树脂醇(3) 无色针晶(氯仿), mp 180–181 °C; EI-MS (m/z): 426 [M]⁺, 411 (M-CH₃), 218, 207, 203, 190, 189; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 85.30 (1H, brs, H-12), 3.22 (1H, dd, J = 4.2, 11.2 Hz, H-3), 1.14, 1.05, 0.98, 0.97, 0.93, 0.92, 0.77, 0.76 (各3H, 8×CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 139.2 (s, C-13), 124.4 (d, C-12), 79.0 (d, C-3), 59.0 (d, C-18), 55.3 (d, C-5), 47.6 (d, C-9), 42.0 (s, C-14), 41.7 (t, C-22), 40.1 (s, C-8), 39.8 (d, C-19), 39.8 (d, C-20), 38.8 (t, C-1), 38.8 (s, C-4), 36.9 (s, C-10), 33.8 (s, C-17), 32.7 (t, C-7), 31.4 (t, C-21), 28.8 (t, C-15), 28.1 (q, C-23), 28.1 (q, C-28), 27.2 (t, C-2), 26.8 (t, C-16), 23.4 (q, C-27), 23.3 (t, C-11), 21.6 (q, C-30), 18.3 (t, C-6), 17.5 (q, C-29), 17.0 (q, C-26), 15.5 (q, C-24), 15.5 (q, C-25)。上述数据与文献[8]报道的一致。

β-香树脂醇(4) 无色晶体(氯仿), mp 196–198 °C; EI-MS (m/z): 426 [M]⁺, 411, 393, 297, 257, 218, 189, 135, 109; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 5.30 (1H, brs, H-12), δ 3.22 (1H, dd, J = 4.2, 11.2 Hz, H-3), 1.14 (3H, s, CH₃), 1.03 (3H, s, CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.90 (3H, s, CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃), 0.87 (3H, s, CH₃), 0.80 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 145.2 (s, C-13), 121.7 (d, C-12), 79.0 (d, C-3), 55.3 (d, C-5), 47.6 (d, C-9), 47.2 (d, C-18), 46.5 (t, C-19), 41.7 (s, C-14), 39.3 (s, C-8), 38.8 (s, C-4), 38.5 (t, C-1), 37.1 (s, C-10), 37.1 (t, C-22), 34.7 (t, C-21), 33.1 (q, C-29), 32.7 (t, C-7),

32.5 (s, C-17), 31.0 (s, C-20), 28.1 (q, C-23), 28.1 (q, C-28), 27.7 (t, C-16), 27.2 (t, C-2), 26.5 (t, C-15), 25.9 (q, C-27), 23.6 (q, C-30), 23.3 (t, C-11), 18.3 (t, C-6), 16.6 (q, C-26), 15.5 (q, C-24), 15.5 (q, C-25)。上述数据与文献[8]报道的一致。

β-谷甾醇(5) 无色针晶(乙酸乙酯), mp 135–138 °C; EI-MS (m/z): 414 [M]⁺, 396, 381, 329, 303, 273, 255; 与对照品 β-谷甾醇进行 TLC 对照, 在 3 种溶剂系统下 R_f 值与显色行为完全一致, 故化合物 5 被鉴定为 β-谷甾醇 (β-sitosterol)。

豆甾醇(6) 无色针晶, mp 149–151 °C; EI-MS (m/z): 412 [M]⁺, 395, 379, 364, 351, 300, 283, 271, 255; 与对照品豆甾醇进行 TLC 对照, 在 3 种溶剂系统下 R_f 值与显色行为完全一致, 故化合物 6 被鉴定为豆甾醇(stigmasterol)。

1.6 细胞毒活性筛选

采用 MTT 法^[9]。

实验设阴性对照组(水)、DMSO 溶剂对照组、阳性对照组(丝裂霉素 C)和 8 个不同浓度(200, 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 μg ml⁻¹)的待测样品, 每个浓度设 2 个平行。

收集对数生长期细胞, 血球计数板计数, 按每孔 4 500 个癌细胞量接种于 96 孔平底细胞培养板中, 置于 5% CO₂、湿度 90% 以上、37 °C 温箱中培养。24 h 后取出加入一定量的待测样品, 继续培养 3 d 后取出置于显微镜下观察每孔细胞形态, 记录细胞形态变化情况, 接着每孔加入 5 mg ml⁻¹ 的 MTT 溶液(溶于平衡盐溶液 PBS)50 μl, 37 °C 反应 4 h 后, 将细胞培养液吸出, 每孔加入 100 μl DMSO 将 Formazane 充分溶解, 将细胞培养板置于 MK3 酶标仪上, 用 570 nm 波长测各孔的吸光度(A), 按下列公式求生长抑制率。而后以样品浓度为横坐标, 以抑

制率为纵坐标,作图并求出抑制率为 50%时样品的浓度(IC_{50}),样品活性结果即以半数抑制浓度(IC_{50})表示。

$$\text{生长抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{用药组平均 A 值}}{\text{阴性对照组平均 A 值}}\right) \times 100\%$$

2 结果

2.1 化合物的分离与鉴定

从红树林植物瓶花木的乙醇提取物中分离得到 6 个化合物,经波谱分析及与文献数据对照确定

其结构分别为:betulone(1)、3,4,5-三甲氧基苯酚- β -D-吡喃葡萄糖苷(2)、 α -香树脂醇(3)、 β -香树脂醇(4)、 β -谷甾醇(5)和豆甾醇(6)。以上化合物均为首次从该植物中分离得到。

2.2 细胞毒活性筛选结果

以 MTT 法对以上化合物进行了肝癌体外细胞毒活性筛选,其中化合物 1 对肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖显示出生长抑制作用,在测定浓度范围内呈现良好的剂量依赖性,其 IC_{50} 值为 $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (图 2)。其它化合物对肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖无明显生长抑制活性。

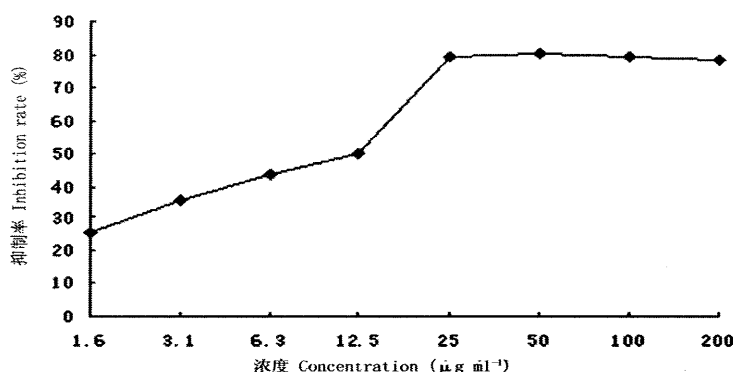


图 2 化合物 1 对 SMMC-7721 细胞生长的抑制

Fig. 2 The inhibition of Compound 1 towards SMMC-7721 cells

参考文献

- [1] Zhao Y(赵亚), Guo Y W(郭跃伟). The proceeding of chemical constituents and pharmacological activities of mangrove [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2004, 2(3): 137-140.(in Chinese)
- [2] Wang Y S(王友绍), He L(何磊), Wang Q J(王清吉), et al. Study on the chemical composition and its pharmacology of the medicinal mangrove plant [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2004, 23(2): 26-31.(in Chinese)
- [3] The Chinese Academy of Science Flora of China Editorial Board (中国科学院中国植物志编委会). Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 71 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 368-370. (in Chinese)
- [4] Dai H F(戴好富), Mei W L(梅文莉), Hong K(洪葵), et al. Screening of the tumor cytotoxic activity of sixteen species of mangrove plants in Hainan [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2005, 24(6): 44-46.(in Chinese)
- [5] Dai H F(戴好富), Mei W L(梅文莉), Wu J(吴娇), et al. Studies on the chemical constituents of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2006, 41(19): 1452-1454.(in Chinese)
- [6] Tinto W F, Blair L C, Alli A, et al. Lupane triterpenoids of *Salacia cordata* [J]. J Nat Prod, 1992, 55(3): 395-398.
- [7] Verotta L, Agli M D, Giolito A, et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Tristanopsis* species and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5-trimethoxyphenyl-(6'-O-galloyl)-O- β -D-glucopyranoside [J]. J Nat Prod, 2001, 64(5): 603-607.
- [8] Seo S, Tomita Y, Tori K. Biosynthesis of oleanene- and ursene-type triterpenes from [4- ^{13}C] mevalonolactone and [1,2- $^{13}\text{C}_2$] acetate in tissue cultures of *Isodon japonicus* Hara [J]. J Amer Chem Soc, 1981, 103: 2075-2080.
- [9] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.