

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℃ 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℃; $[\alpha]_D^{20} = +16.4^\circ$ (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℃; $[\alpha]_D^{20} = -22.3^\circ$ (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,

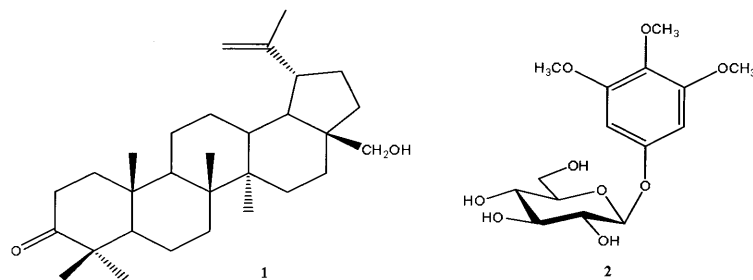


图1 化合物1和2的结构

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(IC₅₀),样品活性结果即以半数抑制浓度(IC₅₀)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 IC₅₀ 值为 12.5 μg 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。

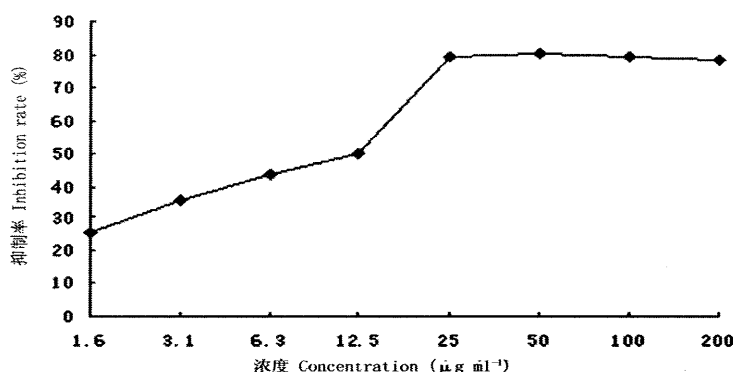


图 2 化合物 1 对 SMMC-7721 细胞生长的抑制

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 [4-¹³C] mevalonolactone and [1,2-¹³C₂] 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.