

红树林植物瓶花木中的细胞毒活性成分 (II)

曾艳波^{1,2,3}, 梅文莉^{2,3}, 刘寿柏^{2,3}, 杨涛^{2,3}, 李小娜^{2,3}, 戴好富^{2,3*}

(1. 海南大学园艺园林学院, 海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室, 海口 571101; 3. 海口市热带天然产物研究与利用重点实验室, 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5个化合物,通过波谱分析,鉴定其结构分别为: shanzhigenin methyl ester (1)、1-epishanzhigenin methyl ester (2)、山柰酚 (3)、芹菜素 (4)和 5,7,2'-trihydroxy-3,6,8,4',5'-pentamethoxyflavone (5)。以上化合物均为首次从瓶花木中分离得到。细胞毒活性测试结果表明,化合物1和2的混合物对人肝癌细胞(SMMC-7721)的增殖有较强的生长抑制活性。

关键词: 红树林植物; 瓶花木; 环烯醚萜; 细胞毒活性

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)04-0561-04

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.013

Cytotoxic Components from Mangrove Plant *Scyphiphora hydrophyllacea* (II)

ZENG Yan-bo^{1,2,3}, MEI Wen-li^{2,3}, LIU Shou-bai^{2,3}, YANG Tao^{2,3}, LI Xiao-na^{2,3}, DAI Hao-fu^{2,3*}

(1. Horticultural and Garden College, Hainan University, Danzhou 571737, China; 2. Hainan Key Laboratory for Research and Development of Natural Products from Li Folk Medicine, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Haikou Key Laboratory for Research and Development of Tropical Natural Products, Haikou 571101, China)

Abstract: Five compounds were obtained from the EtOH extract of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn. f.. On the basis of spectral data (NMR, MS, etc.), they were identified as shanzhigenin methyl ester (1), 1-epishanzhigenin methyl ester (2), kaempferol (3), apigenin (4), and 5,7,2'-trihydroxy-1-3,6,8,4',5'-pentamethoxyflavone (5). All the compounds were isolated from *S. hydrophyllacea* for the first time. The mixture of compounds 1 and 2 showed inhibitory activities towards human hepatoma (SMMC-7721) cell line.

Key words: Mangrove plant; *Scyphiphora hydrophyllacea*; Iridoid; Cytotoxicity

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,在我国仅分布于海南^[1]。对瓶花木的化学成分和生物活性进行了研究,其中环烯醚萜类化合物为其主要成分,此外还分离到一些黄酮、三萜、苯丙素、甾体等类型的化合物^[2-10]。以往报道的13个环烯醚萜类化合物中有6个为环烯醚萜葡萄糖苷,在其余7个不带糖的环烯醚萜类化合物中有3个具有明显的细胞毒活性。本研究从瓶花木中分离鉴定出5个化合物,这5个化合物均为首

次从瓶花木中分离得到,并首次对化合物 shanzhigenin methyl ester 和 1-epishanzhigenin methyl ester 的混合物对人肝癌细胞毒活性进行报道。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料瓶花木于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副研究员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

收稿日期: 2011-03-04

接受日期: 2011-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20862020)资助

作者简介: 曾艳波(1977~),男,湖南桃江人,博士研究生,南药学, email: zengyanbo@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: hfdai2001@yahoo.com.cn

热带生物技术研究所。

1.2 仪器和试剂

北京泰克 X-5 型显微熔点仪(温度未校正); API QSTAR Pulsar 质谱仪; Bruker AV-400 型超导核磁仪(TMS 为内标); Rudolph Autopol III 旋光仪; 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)。柱层析硅胶(200~300 目)和薄层层析硅胶(青岛海洋化工厂), Sephadex LH-20 (Merck 公司)。四甲基偶氮唑盐(MTT)、RPMI1640 培养基和平衡盐溶液 PBS (北京欣经科公司); 丝裂霉素 C (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), DMSO 为分析纯。

1.3 提取和分离

瓶花木干燥枝条 17.6 kg 粉碎后,用 95% 的乙醇冷浸提取 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,用石油醚萃取后,水溶液经过滤后用大孔吸附树脂(D-101)进行柱层析,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)。甲醇部分上硅胶柱,用氯仿-甲醇梯度洗脱 [CHCl₃: MeOH, 50:1 (2.6 L), 20:1 (21.5 L), 10:1 (17.5 L), 5:1 (21.5 L), 2:1 (21.0 L)], 根据薄层色谱检视合并得到 26 个流份(Fr.1~Fr.26)。Fr.14 (1.508 g)经硅胶柱层析(氯仿:甲醇=12:1)后有结晶析出,重结晶后纯化得到化合物 1 和化合物 2

的混合物(176.9 mg); Fr.4 (3.043 g)经硅胶柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:4)得到 12 个流分(Fr.4-1~Fr.4-12), Fr.4-4 经过 Sephadex LH-20 柱层析(乙醇)得到化合物 3 (11.2 mg), Fr.4-5 经过 Sephadex LH-20 柱层析(乙醇)得到化合物 4 (23.7 mg); Fr.1 (15.7 g)经过反复的硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 柱层析得到化合物 5 (9.7 mg)。

1.4 细胞毒性筛选方法

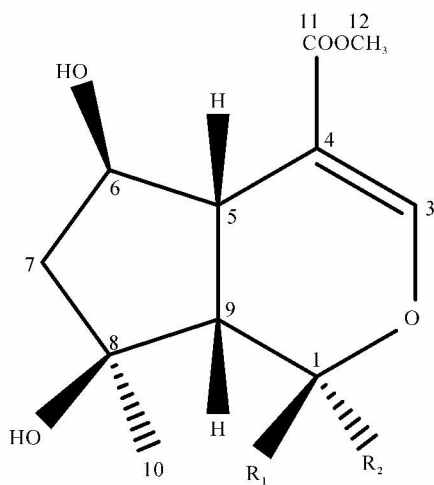
采用 MTT 法^[11]。实验设阴性对照组(DMSO 溶剂)、阳性对照组(丝裂霉素 C)和 6 个不同浓度(0.2, 0.6, 1.8, 5.4, 16.2 和 48.6 μg mL⁻¹)的待测样品,每个浓度设 3 个平行。

选取对数生长期细胞,用 RPMI 1640 完全培养基制成单细胞悬浮液,血球计数板计数,按 5 × 10⁴ 个 mL⁻¹接种 90 μL 于 96 孔平底细胞培养板,置于 5% CO₂、湿度 90% 以上、37℃ 温箱中培养。将 K562 直接加入待测样品 10 μL, 而 SMMC-7721 和 SGC-7901(肿瘤细胞均购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库)培养 24 h 后加入待测样品 10 μL, 继续培养 72 h 后取出,置于显微镜下观察每孔细胞形态。然后每孔加入 5 mg mL⁻¹ 的 MTT 溶液(溶于平衡盐溶液 PBS) 15 μL, 37℃ 反应 4 h 后,吸弃上清液,再向各孔加入 100 μL DMSO, 充分溶解,将细胞培养板置于酶标仪上,用 490 nm 波长测量各孔的吸光度(A),求生长抑制率:生长抑制率(%) = (1 - 用药组平均 A 值/阴性对照组平均 A 值) × 100%。

以样品浓度为横坐标,以抑制率为纵坐标,根据浓度梯度利用 Origin 软件拟合出抑制率的曲线图,求出抑制率为 50% 时样品的浓度(IC₅₀)。

1.5 结构鉴定

化合物 1 白色粉末, C₁₁H₁₆O₆; 在 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 中,化合物 1 和 2 的信号成对出现并且信号强弱相当,根据 2D-NMR (HMQC, HMBC, COSY)分别对其 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据进行了归属。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.43 (1H, s, H-3), 5.44 (1H, d, J=2.0 Hz, H-1), 4.25 (1H, m, H-6), 3.76 (3H, s, H-OMe), 3.07 (1H, m, H-5), 2.32 (1H, dd, J=9.6, 14.0 Hz, H-7β), 2.19 (1H, dd, J=2.1, 5.9 Hz, H-9), 1.70 (1H, br d, J=14.0 Hz, H-7α), 1.32 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 170.2 (C, C-11), 153.0 (CH, C-3), 110.0 (C, C-4), 92.4 (CH, C-1), 80.9 (C, C-8), 80.3 (CH, C-6), 53.2 (CH₃, C-12), 52.0 (CH, C-9), 49.3 (CH₂,



- 1 R₁=OH, R₂=H
2 R₁=H, R₂=OH

图 1 化合物 1 和 2 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1 and 2

C-7), 43.2 (CH, C-5), 25.0 (CH₃, C-10)。上述波谱数据与文献[12]报道的基本一致,因此鉴定化合物**1**为 shanzhigenin methyl ester。

化合物 2 白色粉末, C₁₁H₁₆O₆; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.43 (1H, s, H-3), 5.19 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-1), 4.02 (1H, m, H-6), 3.78 (3H, s, H-OMe), 3.03 (1H, m, H-5), 2.05 (1H, dd, *J* = 7.2, 13.6 Hz, H-7β), 1.83 (1H, dd, *J* = 5.6, 13.6 Hz, H-7α), 2.19 (1H, dd, *J* = 6.2, 9.3 Hz, H-9), 1.37 (3H, s, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 171.4 (C, C-11), 153.8 (CH, C-3), 110.1 (C, C-4), 94.2 (CH, C-1), 79.5 (C, C-8), 78.2 (CH, C-6), 53.0 (CH₃, C-12), 51.9 (CH, C-9), 48.6 (CH₂, C-7), 42.6 (CH, C-5), 24.0 (CH₃, C-10)。上述波谱数据与文献[12]报道的基本一致,因此鉴定化合物**2**为 1-epishanzhigenin methyl ester。

化合物 3 无色针晶(甲醇), C₁₅H₁₀O₆, mp 276°C ~ 278°C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.98 (2H, d, *J* = 1.6, 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.80 (2H, d, *J* = 1.4, 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.29 (1H, s, H-8), 6.08 (1H, s, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 177.4 (C, C-4), 165.7 (C, C-7), 162.5 (C, C-5), 160.6 (C, C-4'), 158.3 (C, C-9), 148.1 (C, C-2), 137.1 (C, C-3), 130.7 (2 × CH, C-2', 6'), 123.8 (C, C-1'), 116.3 (2 × CH, C-3', 5'), 104.5 (C, C-10), 99.3 (CH, C-6), 94.5 (CH, C-8)。上述数据与文献[13]基本一致。因此鉴定化合物**3**为山柰酚。

化合物 4 白色固体, C₁₅H₁₀O₅; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.85 (2H, dd, *J* = 3.2, 8.8 Hz, H-2', H-6'), 6.94 (2H, dd, *J* = 2.2, 8.8 Hz, H-3', H-5'), 6.58 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 184.0 (C, C-4), 166.3 (C, C-2), 165.7 (C, C-7), 162.9 (C, C-9), 162.3 (C, C-4'), 159.3 (C, C-5), 129.5 (2 × CH, C-2', C-6'), 122.2 (C, C-1'), 117.1 (2 × CH, C-3', C-5'), 103.9 (C, C-10), 103.0 (CH, C-3), 100.4 (CH, C-6), 95.2 (CH, C-8)。上述数据与文献[14]基本一致。因此鉴定化合物**4**为芹菜素。

化合物 5 白色固体, C₂₀H₂₀O₁₀; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.53 (1H, s, H-6'), 6.64 (1H, s, H-3'), 4.07 (3H, s, OMe-8), 4.06 (3H, s, OMe-4'), 4.04 (3H, s, OMe-5'), 4.04 (3H, s, OMe-3), 3.99 (3H, s, OMe-6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 179.1 (C, C-4),

157.7 (C, C-7), 153.2 (C, C-9), 151.1 (C, C-4'), 150.9 (C, C-2), 148.2 (C, C-5), 145.5 (C, C-2), 142.3 (C, C-5'), 138.9 (C, C-3), 131.8 (C, C-6), 128.0 (C, C-8), 114.7 (CH, C-6'), 108.7 (CH, C-1'), 104.4 (C, C-10), 101.8 (CH, C-3')。上述数据与文献[15]基本一致。因此鉴定化合物**5**为 5,7,2'-trihydroxy-3,6,8,4',5'-pentamethoxyflavone。

1.6 细胞毒活性

经 MTT 法进行细胞毒活性筛选,化合物**1**和化合物**2**的混合物对人肝癌细胞(SMMC-7721)的增殖显示了一定的生长抑制活性,其 IC₅₀ 值为 35.2 μg mL⁻¹。

2 结果和讨论

本研究对红树林植物瓶花木化学成分及其细胞毒活性进行研究,从中分离鉴定出 5 个化合物,分别为 shanzhigenin methyl ester (**1**)、1-epishanzhigenin methyl ester (**2**)、山柰酚 (**3**)、芹菜素 (**4**)和 5,7,2'-trihydroxy-3,6,8,4',5'-pentamethoxy-flavone (**5**)。以上化合物均为首次从瓶花木中分离得到。细胞毒活性测试结果表明,化合物**1**和**2**的混合物对人肝癌细胞(SMMC-7721)的增殖显示出了一定的生长抑制活性。2001年郭守军等首次从中药糙苏(*Phlomis umbrosa* Turcz)中分离到化合物**1**和**2**的混合物^[12],但未对其活性进行报道,本研究首次对化合物**1**和**2**的混合物对人肝癌细胞毒活性进行了报道。据报道,瓶花木的主要生物活性成分为环烯醚萜类化合物^[2-10],环烯醚萜类化合物**1**和**2**的报道丰富了瓶花木的生物活性成分。

参考文献

- [1] Chun W Y(陈焕镛). Flora Hainanica Tome. 2 [M]. Beijing: Science Press, 1965: 1-384.(in Chinese)
- [2] 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(中国药理学杂志), 2006, 41(19): 1452-1454.(in Chinese)
- [3] Zeng Y B(曾艳波), Mei W L(梅文莉), Zhuang L(庄令), et al. Cytotoxic components from mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2007, 15(3): 249-252.(in Chinese)
- [4] Zeng Y B, Mei W L, Zhao Y X, et al. Two new epimeric pairs of iridoid from mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. Chin Chem Lett, 2007, 18: 1509-1511.

- [5] Zeng Y B, Mei W L, Zhao Y X, et al. Two new noriridoids from *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *Z Naturforsch*, 2008, 63: 108–110.
- [6] Feng C L, Gong M F, Zeng Y B, et al. Scyphiphin C: A new iridoid from *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *Molecules*, 2010, 15: 2473–2477.
- [7] Zeng Y B, Mei W L, Wang H, et al. Scyphiphin D: A new iridoid glucoside dimer from *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(11): 1010–1014.
- [8] Tao S H, Wu J, Qi S H, et al. Scyphiphorins A and B: Two new iridoid glycosides from the stem bark of a Chinese mangrove *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90: 1718–1722.
- [9] Tao S H(陶曙红), Pan J Y(潘剑宇), Qi S H(漆淑华), et al. Studies on the chemical constituents of *Scyphiphora hydrophyllacea* [J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)*, 2007, 38(3): 348–350.(in Chinese)
- [10] Tao S H(陶曙红), Gao G C(高广春), Qi S H(漆淑华), et al. Studies on the chemical constituents of *Scyphiphora hydrophyllacea* (II) [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2009, 32(5): 712–714.(in Chinese)
- [11] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1/2): 55–63.
- [12] Guo S J, Gao L M, Chen D L. Iridoids from *Phlomis umbrosa* [J]. *Pharmazie*, 2001, 56(2): 178–180.
- [13] Mei W L(梅文莉), Yang Y(杨勇), Ni W(倪伟), et al. Flavonoids from *Knema globularia* [J]. *Acta Bot Yunnan(云南植物研究)*, 2000, 22(3): 358–360.(in Chinese)
- [14] Tan X Q(谭兴起), Guo L J(郭良君), Chen H S(陈海生), et al. Study on the flavonoids constituents of *Trachelospermum jasminoides* [J]. *J Chin Med Mater(中药材)*, 2010, 33(1): 58–60.(in Chinese)
- [15] Nianbai F, Mark L, Mabry T J, et al. Six 2'-hydroxyflavonols from *Gutierrezia microcephala* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(12): 3029–3034.