

走马胎中大叶紫金牛酚的分离鉴定与生物活性评价

陈锦兰¹, 吴浩祥^{2*}, 胡锐红³, 肖文静⁴, 袁捷⁴

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405; 3. 佛山市气象局, 广东 佛山 528000; 4. 广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广州 510006)

摘要: 为了解走马胎(*Ardisia gigantifolia*)的化学成分, 从其乙酸乙酯提取物中分离鉴定出大叶紫金牛酚。体外活性评价结果表明, 大叶紫金牛酚具有良好的抗炎、抗肿瘤活性以及一定的神经保护作用。这是首次对大叶紫金牛酚进行系统研究, 为综合开发与利用走马胎提供科学依据。

关键词: 紫金牛科; 走马胎; 大叶紫金牛酚; 生物活性

doi: 10.11926/jtsb.4018

Isolation, Identification and Biological Evaluation of Gigantifolinol from *Ardisia gigantifolia*

CHEN Jin-lan¹, WU Hao-xiang^{2*}, HU Rui-hong³, XIAO Wen-jing⁴, YUAN Jie⁴

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Foshan Meteorological Bureau, Foshan 528000, Guangdong, China; 4. Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to understand the chemical constituents of *Ardisia gigantifolia*, the gigantifolinol were isolated and identified from EtOAc extract. *In vitro* activity screening, gigantifolinol showed potent anti-inflammatory and anti-tumor activities, and moderate neuroprotection activities. This is the first systematic study of gigantifolinol, which might provide a scientific basis to the development and utilization of *A. gigantifolia*.

Key words: Myrsinaceae; *Ardisia gigantifolia*; Gigantifolinol; Biological activity

大叶紫金牛酚^[1]是具有顺式取代的十七碳直链烯烃的间苯二酚衍生物, 因大量存在于紫金牛科(Myrsinaceae)植物大叶紫金牛(*Ardisia gigantifolia*)中, 并成为其特征性成分。大叶紫金牛酚结构独特, 母体为苯酚结构, 连接长链烯烃取代基, 致使化合物脂溶性显著提高; 此外苯环结构上带有易发生氧化反应的酚羟基活泼基团, 同时侧链烯烃基团处于不稳定的顺式取代模式。大叶紫金牛酚独特新颖的结构吸引了药物化学家们的研究兴趣。Guan 等^[2]对大叶紫金牛酚进行了抗肺结核活性研究, 并揭示

其具有潜在的抗肺结核活性。然而目前对大叶紫金牛酚的研究还是严重不足的, 继续深入研究、开发与评价其新颖生物活性将具有显著意义。

大叶紫金牛在我国广东、广西、江西、云南等地有分布; 其干燥根及根茎即为跌打损伤良药走马胎。作为岭南民间常用中药, 走马胎始载于清代《生草药性备要》^[3], 有祛风除湿、壮筋骨、活血化瘀等功效, 主治风湿筋骨疼痛、产后血瘀、痈疽溃疡等^[4]。可见, 走马胎具有多方面的生物活性; 此外, 近年来的现代药理学研究发现, 走马胎还具有多种

收稿日期: 2018-11-13 接受日期: 2018-12-21

基金项目: 广东省中药新药研发重点实验室开放运行费(2017B030314096)资助

This work was supported by the Open Operation Cost of Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Research of Chinese Medicine (Grant No. 2017B030314096).

作者简介: 陈锦兰, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。E-mail: mizi04@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: gzhwx2010@163.com

药理作用, 如抗肿瘤、抗血栓和抗氧化作用等^[5-6]。

鉴于走马胎多种药理活性已被证实, 现代临床将之用于痛风性关节炎^[7]、类风湿关节炎^[8]、骨质增生症^[9]、骨伤骨折^[10]等疾病的治疗, 效果显著, 引起了对走马胎包括化学成分和药理学在内全面研究的热潮。随着研究的深入, 走马胎多种化学成分被陆续报道, 主要包括苯酚类、香豆精类、三萜皂苷类、甾醇类等成分^[5]。然而目前国内外学者对走马胎化学成分的研究, 一直侧重于三萜皂苷类和岩白菜素类化学成分, 未见基于走马胎临床药效对大叶紫金牛酚进行全面和深入的研究。同时, 大叶紫金牛酚作为走马胎的主要活性成分, 阐明其药理活性, 将为明确走马胎的药效物质基础, 同时合理使用走马胎提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和耗材

质谱: Waters 3100 SQDMS (低分辨 ESI); 核磁共振谱: Bruker Avance III 500 型核磁共振仪, 以氘代试剂残留溶剂峰为内标; 液相色谱与质谱联用仪: Waters 2695 LC 偶联 Waters Acquity ELSD、Waters 3100 SQDMS, 分析色谱柱型号: Waters Sunfire® RP C-18, 3.5 μm , 4.6 mm \times 100 mm; CO₂ 细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司); 垂直超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); 低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司); MK3 型酶标仪(美国 Thermo fisher 公司); 超低温冰箱(日本三洋 SANYO 公司); FM-500 型倒置荧光生物显微镜(上海普丹光学仪器有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

Cell Counting Kit-8 (CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒(日本同仁化学研究所); Greiss NO 试剂盒(碧云天生物技术研究所); MTT 噻唑兰(美国 Sigma 公司); 叔丁基过氧化氢(t-BHP)(成都格雷西亚化学技术有限公司); 200~300、300~400 目柱层析硅胶(青岛海洋化工厂生产); HSGF254 TLC 预制薄层板(德国 Merck 公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden); CHP20P MCI 树脂(75~150 μm) (Mitsubishi Chemical Corporation); 96 孔细胞培养板(美国 CORNING 公司); 胎牛血清(FBS)(澳大利亚 Gibco 公司); 青-链霉素(P/S)(Thermo 公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); RPMI-1640

培养基(德国 Biological Industries 公司); DMSO 溶液(美国 Sigma 公司); HPLC 分析用乙腈(Merck 公司); 实验用水由美国 Millipore 公司纯水、超纯水系统提供; 其他有机溶剂均为国产分析纯产品; TLC 显色剂为 5% 香兰素乙醇液。

1.2 材料

走马胎 15 kg, 2017 年 12 月购于中山市健禾中药饮片有限公司, 标本号 No. 20171201。

1.3 细胞株

炎症细胞株: 脂多糖诱导的小鼠单核细胞 RAW264.7; 肿瘤细胞株: 人非小细胞肺癌 A549 和人大细胞肺癌 NCI-H460; 神经细胞株: 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y。均来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.4 大叶紫金牛酚的提取和分离

走马胎(15 kg), 粉碎后用 95% 工业酒精室温浸泡 3 次, 每次 5 d, 合并提取液, 减压浓缩至无乙醇味。将得到的总浸膏用水悬浮, 然后用乙酸乙酯萃取, 减压浓缩萃取液, 得到乙酸乙酯部位 800 g。将乙酸乙酯部位用 MCI 柱层析处理, 以乙醇-水(50%、70%、95% 乙醇)为流动相梯度洗脱, 得到 3 个组分 A、B 和 C。

结合化合物结构特征, 首先对组分 C (605 g) 用硅胶(200~300 目)柱层析, 正己烷: 乙酸乙酯[10: 1~1: 1, V/V(下同)]梯度洗脱, 薄层(TLC)检测合并, 共获到 6 个子组分 B1~B6。

组分 B2 经凝胶柱层析, 氯仿: 甲醇(1: 1)洗脱, 得到 3 个子组分 B2A~B2C; B2B 经硅胶(300~400 目)柱层析, 正己烷: 乙酸乙酯(10: 1~1: 1)洗脱, 最后获得化合物 1 (102 g), 含量约为 0.68%。

1.5 结构鉴定

化合物 1 棕色油状物, ESI-MS m/z : 347.28 $[M + H]^+$, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_{H} 6.18 (1H, s, H-2), 6.24 (1H, s, H-4), 6.24 (1H, s, H-6), 2.35 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-1'), 1.56 (2H, m, H-2'), 1.27 (2H, overlapped, H-3'), 1.27 (2H, overlapped, H-4'), 1.27 (2H, overlapped, H-5'), 1.27 (2H, overlapped, H-6'), 2.01 (2H, overlapped, H-7'), 5.35 (1H, overlapped, H-8'), 5.35 (1H, overlapped, H-9'), 2.01 (2H, overlapped, H-

10'), 1.27 (2H, overlapped, H-11'), 1.27 (2H, overlapped, H-12'), 1.27 (2H, overlapped, H-13'), 1.27 (2H, overlapped, H-14'), 1.27 (2H, overlapped, H-15'), 1.27 (2H, overlapped, H-16'), 0.88 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-17')。以上数据与大叶紫金牛酚(图 1)^[11]的一致。

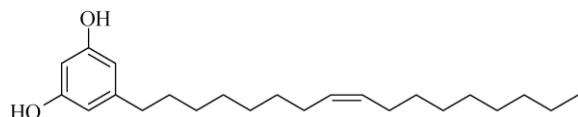


图 1 大叶紫金牛酚结构式

Fig. 1 Structure of gigantifolinol

1.6 大叶紫金牛酚的生物活性筛选

体外抗炎活性筛选

采用比色法^[11-12], 用 NO 试剂盒测定小鼠巨噬细胞的 NO。将小鼠巨噬细胞 RAW264.7 以 5×10^5 浓度接种于 96 孔板中, 置于 37°C , 5% CO_2 细胞培养箱中孵育过夜。然后加入 10% FBS、LPS 和大叶紫金牛酚, 轻轻摇晃 96 孔板, 然后继续放置于培养箱中培养, 18 h 后取 $100 \mu\text{L}$ 培养基上清液, 加入 Greiss 试剂, 室温放置 10 min, 然后以完全培养基加显色剂作为空白对照, 在 420 nm 下用酶标仪测定各孔的吸光度(OD 值)。阳性对照: L-氮甲基精氨酸(L-NMMA)。

体外抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 法^[13], 通过测定大叶紫金牛酚对 A549 和 NCI-H460 细胞的增殖抑制作用来评价。将 MTT 溶于磷酸缓冲液(PBS), 配成浓度为 5 mg mL^{-1} 的 MTT 溶液备用。取对数生长期肿瘤细胞, 以 RPMI 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 $1 \times 10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$, 接种于 96 孔培养板内, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$, 然后分别加入 2、4、8、12 和 $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ 大叶紫金牛酚 $100 \mu\text{L}$, 每个浓度 6 个复孔, 同时设空白对照组(只加培养基)。置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后, 每孔加入 5 mg mL^{-1} 的 MTT 溶液 $30 \mu\text{L}$, 继续培养 4 h, 在 $160 \times g$ 下离心 22 min, 弃上清液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO 溶解。酶标仪快速震荡 60 s 后, 570 nm 波长处测定吸光度(OD 值), 计算细胞增殖抑制率和 IC_{50} 。细胞增殖抑制率 $IR(\%) = (1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。阳性对照: 多柔比星。

体外神经保护活性筛选

用 MTT 法^[13]检测 SH-SY5Y 细胞的存活率。将 SH-SY5Y 细胞以 $6 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于经多聚赖氨酸包被过的培养皿中, 加入含有 10% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 培

养基, 置 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。每天全量换液 1 次, 隔天传代, 并在显微镜下进行观察。将 SH-SY5Y 细胞以 $6 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。将细胞分为 0 (正常组)、50、100 和 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 t-BHP 组, 每组 6 个复孔。待细胞融合度达到 80%~90%时, 吸净培养基, 加入含有相应浓度 t-BHP 的培养基, 置于 37°C 5% CO_2 培养箱中分别培养 3、6、12 和 24 h, 观察 SH-SY5Y 细胞衰老情况。将 SH-SY5Y 细胞以 $6 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于多聚赖氨酸包被的 96 孔板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。将细胞分为正常组、模型组、给药组(含有 25、50、100 和 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ 大叶紫金牛酚的模型组), 每组 6 个复孔。置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 观察大叶紫金牛酚对 SH-SY5Y 细胞衰老的保护情况。

2 结果和讨论

2.1 大叶紫金牛酚抗炎活性评价

尽管在岭南民间, 走马胎一直被用于治疗类风湿关节炎等多种炎症类疾病, 疗效也同时被现代临床学研究所证实; 然而走马胎治疗炎症类疾病的药效基础一直未见报道。本试验通过大叶紫金牛酚对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用来评价。结果表明, 大叶紫金牛酚具有良好的体外抗炎活性, IC_{50} 为 $17.85 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。因此, 大叶紫金牛酚为走马胎治疗炎症类疾病的药效基础之一。

2.2 大叶紫金牛酚抗肿瘤活性评价

现代药理学研究证实, 走马胎具有抗肿瘤作用^[5-6], 并表明三萜皂苷类成分是走马胎抗肿瘤作用的药效物质之一。大叶紫金牛酚作为走马胎中主要化学成分之一, 但尚未见报道其是否具有抗肿瘤作用。本试验通过大叶紫金牛酚对 A549 和 NCI-H460 细胞的增殖抑制作用来评价。结果表明, 大叶紫金牛酚具有中等抗肿瘤作用, 对 A549 和 NCI-H460 肿瘤细胞的 IC_{50} 分别为 38.01 和 $12.21 \mu\text{mol L}^{-1}$ 。

2.3 大叶紫金牛酚神经保护活性评价

细胞衰老是指正常细胞在通路调控下不可逆地进入生长停滞期, 在形态学上表现为细胞核膜崩解、细胞膜脆性增加、选择性通透能力下降、多种细胞器和细胞内结构发生退行性形变等状态^[14-17]。为综

合开发与利用走马胎, 本试验通过探讨大叶紫金牛酚是否可以延缓 SH-SY5Y 细胞衰老来评价其是否具有神经保护作用^[18-19]。结果表明(图 2), 不给药的模型组对 SH-SY5Y 细胞存活率有抑制作用, 而不同浓度的大叶紫金牛酚则不同程度地对 t-BHP 的抑制作用有所逆转。因此, 大叶紫金牛酚对 SH-SY5Y 细胞衰老有保护作用, 并且与浓度有依赖关系。

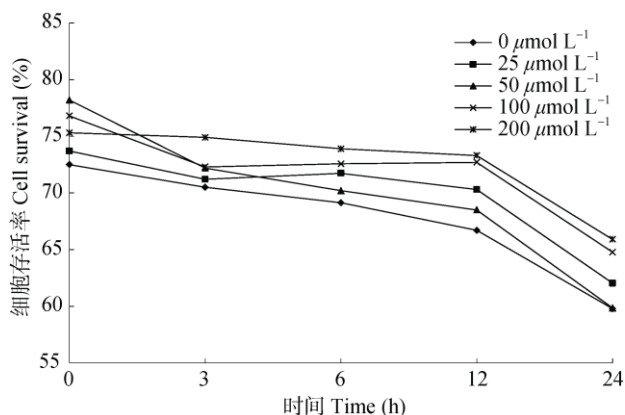


图 2 MTT 法测定 SH-SY5Y 的存活能力

Fig. 2 SH-SY5Y cell viability determined by MTT

3 结论

本研究对大叶紫金牛酚进行了系统研究, 首次报道大叶紫金牛酚的抗炎、抗肿瘤以及神经保护活性。实验结果显示, 大叶紫金牛酚具有良好的抗炎和抗肿瘤活性, 以及具有一定的神经保护活性。明确了大叶紫金牛酚是走马胎治疗炎症类疾病和抗肿瘤的药效物质基础之一, 为综合开发与利用走马胎提供科学依据。

参考文献

[1] LU W J, WANG X F, CHEN J Y, et al. Studies on the chemical constituents of *Ardisia gigantifolia* Stapf [J]. W China J Pharm Sci, 1990, 5(3): 136-138. doi: 10.13375/j.cnki.wcjps.1990.03.005.
卢文杰, 王雪芬, 陈家源, 等. 大叶紫金牛化学成分的研究 [J]. 华西药理学杂志, 1990, 5(3): 136-138. doi: 10.13375/j.cnki.wcjps.1990.03.005.

[2] GUAN Y F, SONG X, QIU M H, et al. Bioassay-guided isolation and structural modification of the anti-TB resorcinols from *Ardisia gigantifolia* [J]. Chem Biol Drug Des, 2016, 88(2): 293-301. doi: 10.1111/cbdd.12756.

[3] DAI W B, DONG P P, MEI Q X. The research on the herbal of the *Ardisia gigantifolia* Stapf and its confusing products [J]. J Chin Med Mat,

2017, 40(9): 2220-2223. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.09.051.
戴卫波, 董鹏鹏, 梅全喜. 走马胎及其混淆品的本草考证 [J]. 中药材, 2017, 40(9): 2220-2223. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.09.051.

[4] Guangdong Food and Drug Administration. Standard of Guangdong Traditional Chinese Medicine [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004: 101-104.
广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准 [M]. 广州: 广东科学技术出版社, 2004: 101-104.

[5] WEI R, FU J Q, XIE S M, et al. Research progress on the resources and applications of *Ardisia gigantifolia* [J]. Guangdong For Sci Technol, 2015, 31(5): 94-98. doi: 10.3969/j.issn.1006-4427.2015.05.019.
魏蓉, 负健全, 谢思明, 等. 走马胎资源与利用研究进展 [J]. 广东林业科技, 2015, 31(5): 94-98. doi: 10.3969/j.issn.1006-4427.2015.05.019.

[6] LONG J C, XU C G, WEI G Y, et al. Progress in research of traditional Chinese medicine zomatai (*Ardisia gigantifolia*) [J]. Guid J Trad Chin Med Pharm, 2017, 23(21): 75-79. doi: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2017.21.024.
龙杰超, 徐传贵, 韦贵元, 等. 中药走马胎研究进展 [J]. 中医药导报, 2017, 23(21): 75-79. doi: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2017.21.024.

[7] YANG S J. 37 treatment cases of gouty arthritis with Tongyao [J]. J Med Pharm Chin Minorit, 2007, 2(2): 47. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2007.02.052.
杨圣金. 侗药治疗痛风性关节炎 37 例 [J]. 中国民族医药杂志, 2007, 2(2): 47. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2007.02.052.

[8] TANG A P. The clinical observation on treatment of rheumatoid arthritis with the *Ardisia gigantifolia* Stapf [J]. J Sichuan Trad Chin Med, 2007, 25(1): 54-55. doi: 10.3969/j.issn.1000-3649.2007.01.028.
唐亚平. 中药走马胎治疗类风湿性关节炎的临床观察 [J]. 四川中医, 2007, 25(1): 54-55. doi: 10.3969/j.issn.1000-3649.2007.01.028.

[9] LONG Z Z. 48 treatment cases of hyperosteogeny with Guanguan mixture of Tongyao [J]. J Med Pharm Chin Minorit, 2007, 13(11): 13-14. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2007.11.012.
龙智忠. 侗药走观合剂治疗骨质增生症 48 例 [J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(11): 13-14. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2007.11.012.

[10] LONG K E, XIAO C W, LONG S, et al. The study on the treatment technology of fractures of skeletal fractures (6): Clinical observation on 4118 treatment cases of various bone fractures [J]. J Med Pharm Chin Minorit, 2013, 19(5): 22-24. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2013.05.015.
龙开娥, 萧成纹, 龙驶, 等. 侗医骨折治疗技术研究(六)——侗医治疗各类骨折 4118 例临床疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2013, 19(5): 22-24. doi: 10.3969/j.issn.1006-6810.2013.05.015.

[11] PARK S H, PARK K H, OH M H, et al. Anti-oxidative and anti-

- inflammatory activities of caffeoyl hemiterpene glycosides from *Spiraea prunifolia* [J]. *Phytochemistry*, 2013, 96: 430–436. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.09.017.
- [12] ZHONG W M, CUI Z M, LIU Z K, et al. Three minor new compounds from the aerial parts of *Leonurus japonicus* [J]. *Chin Chem Lett*, 2015, 26(8): 1000–1003. doi: 10.1016/j.ccllet.2015.05.004.
- [13] HEILMANN J, WASESCHA M R, SCHMIDT T J. The influence of glutathione and cysteine levels on the cytotoxicity of helenanolide type sesquiterpene lactones against KB cells [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(8): 2189–2194. doi: 10.1016/S0968-0896(01)00131-6.
- [14] ZHANG C, ZHANG J, HUANG J, et al. Analysis based on stem cells kidney essence theory and mechanism of aging [J]. *Liaoning J Trad Chin Med*, 2014, 41(9): 1877–1879. doi: 20.13192/j.issn.1000-1719.2014.09.035.
- 张晨, 张进, 黄进, 等. 基于干细胞的“肾精”理论与衰老机制探析 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(9): 1877–1879. doi: 20.13192/j.issn.1000-1719.2014.09.035.
- [15] SHI A W, LU Q, HOU L L, et al. Mechanism study of Bushen Kangshuai decoction on senescence of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Liaoning J Trad Chin Med*, 2013, 40(1): 52–54.
- 史爱武, 陆勤, 侯莉莉, 等. 补肾抗衰汤影响秀丽杆线虫衰老的机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(1): 52–54.
- [16] NALETOVA I, SATRIANO C, CURCI A, et al. Cytotoxic phenanthroline derivatives alter metallostasis and redox homeostasis in neuroblastoma cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(91): 36289–36316. doi: 10.18632/oncotarget.26346.
- [17] PENG Y, XING S N, TANG H Y, et al. Influence of glucose transporter 1 activity inhibition on neuroblastoma *in vitro* [J]. *Gene*, 2018, 689: 11–17. doi: 10.1016/j.gene.2018.12.010.
- [18] MENDELL A L, MACLUSKY N J. The testosterone metabolite 3 α -androstane-20-one inhibits oxidative stress-induced ERK phosphorylation and neurotoxicity in SH-SY5Y cells through an MKP3/DUSP6-dependent mechanism [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 696: 60–66. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.012.
- [19] GETACHEW B, CSOKA A B, ASCHNER M, et al. Nicotine protects against manganese and iron-induced toxicity in SH-SY5Y cells: Implication for Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2018, 124: 19–24. doi: 10.1016/j.neuint.2018.12.003.