

α 桉醇光敏氧化及抗肿瘤活性研究*

赵映梅¹, 张 滢², 邹 澄², 曹青青³, 赵 庆^{3△}

(1. 昆明市呈贡区人民医院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明医科大学, 云南 昆明 650500;

3. 云南中医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 以倍半萜成分进行衍生化以制备具有生物活性的衍生物。方法 对 α 桉醇进行光敏氧化, 制备具有抗肿瘤活性的倍半萜衍生物。结果 α 桉醇的光敏氧化共得到三个倍半萜衍生物, 其中一个过氧化产物具有显著的抗肿瘤活性。结论 以倍半萜成分为原料, 制备具有显著抗肿瘤活性成分是可行的。

关键词: α 桉醇; 光敏氧化; 抗肿瘤活性; 倍半萜类; 姜科植物; 滇姜花

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)02-0018-03

本项目组曾经从姜科植物中发现了大量具有较强抗肿瘤活性的二萜成分^[1-9]; 姜科植物滇姜花 (*Hedychium yunnanense* Gangep.) 中富含倍半萜成分, 而 α 桉醇是滇姜花中的含量较高的桉烷型倍半萜成分^[10-11]。初步研究表明, 姜科植物中的一些倍半萜具有抗菌或抗真菌活性, 但尚未见到有关姜科桉烷型倍半萜抗肿瘤活性的报道。光敏氧化反应是制备氧化衍生物的重要手段^[12-13], 它是利用光敏剂 (如亚甲基蓝、孟加拉玫瑰红等) 在光照的条件下, 对氧分子进行光敏化作用, 从而生成高活性的单线态氧, 单线态氧再与有机物反应, 得到一系列氧化产物。光敏氧化反应的选择性很高, 可制备用常规的氧化手段难以得到的产物。此外, 光敏氧化是一种“绿色”的化学反应, 不需要使用有毒的化学试剂。

本文以滇姜花中丰产易得的化学成分 α 桉醇作为原料, 经光敏氧化制备了 3 个倍半萜衍生物 (化合物 1-3), 3 个成分均为新化合物, 其中化合物

3 具有显著的抗肿瘤活性, 见图 1。

1 实验仪器与材料

核磁共振氢谱、碳谱由 Bruker AM-400 型核磁共振仪测定。柱色谱用的硅胶硅胶为青岛海洋化工厂生产。薄层色谱用青岛海洋化工厂生产的硅胶 G 板, 薄层显色的常规方法为: 喷洒 10% 硫酸-乙醇溶液, 在 105℃ 下烘烤至显色明显。过氧化物的检测方法: 取 36% 乙酸 100mL, 加入 1g KI, 加入过量锌粉搅拌至溶液为无色, 过滤后使用。在薄层上喷洒上述显色剂, 过氧化物呈棕色斑点。

α 桉醇是从姜科植物滇姜花 (*Hedychium yunnanense* Gangep.) 中分离得到。

2 光敏氧化反应

称取 α -桉醇 817mg, 以氯仿: 甲醇 (1:1) 的混合溶剂 100mL 溶解, 加入光敏剂亚甲基蓝 5mg, 置于日光下照射 1h。经薄层色谱检测, 大部分 α -桉醇已基本反应完全。上述溶液经减压浓缩, 再采用少量 200~300 目硅胶过滤, 乙酸乙酯冲洗。收集乙酸乙酯洗脱液, 浓缩回收。反应产物以 300~400 目硅胶柱分离, 石油醚: 乙酸乙酯 (2:1) 洗脱, 得到 6 个部分 (Fr.1-6)。Fr.1 为未反应的 α -桉醇, 166mg。Fr.3 以半制备型高效液相色谱分离 (C-18 柱, 检测波长 200nm), 乙腈-水梯度洗脱, 得化合物 1 (8mg) 和 2 (105mg)。Fr.4 以半制备型高效液相色谱分离 (C-18 柱, 检测波长 200nm), 乙腈-水梯度洗脱, 得化合物 3 (97mg)。

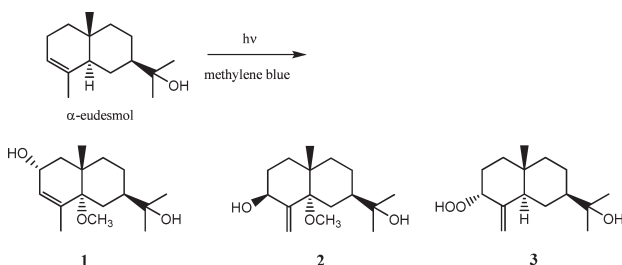


图 1 化合物 1-3

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81460533; 81060262)

收稿日期: 2015-02-07

作者简介: 赵映梅 (1975-), 女, 云南曲靖人, 中药师, 主要从事药品质量管理和调剂工作及植物化学成分研究。

△通信作者: 赵庆, E-mail: qingzhaokm2008@126.com

3 产物的波谱数据及结构解析要点

化合物 **1-3** 的结构解析要点: (1) 3 个反应产物的 ^1H 、 ^{13}C -DEPT NMR 数据与原料 α 桉醇相似, 这表明在反应过程中分子的构型没有发生变化。 (2) 根据 ESI(+)-MS 可知分子量, 再结合 ^{13}C -DEPT 数据即可确定分子式。 (3) 在确定化合物 **1** 的 2 位羟基、化合物 **2** 的 3 位羟基、化合物 **3** 的 3 位过氧羟基的构型时, 是根据氢原子的偶合常数确定的。因为化合物 **1** 的 H-2、化合物 **2** 的 H-3 的偶合常数较大, 因此该氢原子是处于直立键的位置, 那表明羟基是处于平伏键的位置; 而化合物 **3** 的 H-3 偶合常数较小, 因此该氢原子是处于平伏键的位置, 那么过氧羟基是处于直立键的位置。 (4) 在解析产物的分子结构时, 同时还考虑了 ene 型光敏氧化的反应机理。单线态氧与烯键的 ene 型反应如图 2 所示。化合物 **1** 和 **2** 均是在发生 ene 型反应反应之后, 再经过进一步重排反应而得到的。 (5) 化合物与过氧显色剂显正反应, 表明有过氧键存在。

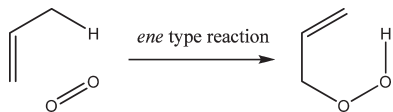


图2 单线态氧与烯键的 ene 型反应

化合物 **1**: ESI (+)-MS: 269 $[M+1]^+$. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 1.20 (3H, s, H-12); 1.21 (3H, s, H-13); 1.12 (3H, s, H-14); 1.66 (3H, s, H-15); 5.03 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3); 3.52 (3H, s, OCH₃); 3.89 (1H, dd, $J=6.4, 10.1$ Hz, H-2). ^{13}C NMR (100Hz, CDCl_3) δ : 36.5 (t, C-1); 52.1 (d, C-2); 117.5 (d, C-3); 142.3 (s, C-4); 81.5 (s, C-5); 31.9 (t, C-6); 71.6 (d, C-7); 28.6 (t, C-8); 31.7 (t, C-9); 55.8 (s, C-10); 72.8 (s, C-11); 28.1 (q, C-12); 28.4 (q, C-13); 16.2 (q, C-14); 19.5 (q, C-15); 54.4 (q, OCH₃).

化合物 **2**: ESI (+)-MS: 269 $[M+1]^+$. ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 0.99 (3H, s, H-14); 1.20 (3H, s, H-12); 1.21 (3H, s, H-13); 3.00 (3H, s, OCH₃); 4.12 (1H, dd, $J=5.1, 11.9$ Hz, H-3); 5.11 (1H, s, H-15a); 5.61 (1H, s, H-15b). ^{13}C NMR (100Hz, CDCl_3) δ : 33.41 (t, C-1); 27.23 (t, C-2); 70.09 (d, C-3); 148.04 (s, C-4); 80.94 (s, C-5); 31.51 (t, C-6); 45.41 (d, C-7); 22.14 (t, C-8); 34.26 (t, C-9); 38.62 (s, C-10); 72.86 (s, C-11); 26.49 (q, C-12); 27.58 (q, C-13); 22.26 (q, C-14); 111.33 (t, C-15); 48.29 (q, OCH₃).

化合物 **3**: ESI (+)-MS: 255 $[M+1]^+$. ^1H NMR

(400MHz, CDCl_3) δ : 0.69 (3H, s, H-14); 1.19 (3H, s, H-12); 1.21 (3H, s, H-13); 4.40 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-3); 4.81 (1H, s, H-15a); 5.07 (1H, s, H-15b). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ : 36.11 (t, C-1); 24.49 (t, C-2); 86.26 (d, C-3); 147.83 (s, C-4); 49.21 (d, C-5); 26.24 (t, C-6); 43.99 (d, C-7); 22.41 (t, C-8); 40.60 (t, C-9); 35.57 (s, C-10); 73.16 (s, C-11); 26.68 (q, C-12); 27.35 (q, C-13); 15.61 (q, C-14); 112.59 (t, C-15).

4 化合物的体外抗肿瘤活性测试

体外抗肿瘤活性测试在中国科学院昆明植物研究所药物筛选中心进行, 采用 MTT 法^[14-15]。测试结果表明, 化合物 **3** 对所测试的 5 个肿瘤细胞株均显示了体外抗肿瘤活性, 其对乳腺癌细胞株 MCF-7 和结肠癌细胞株 SW480 的抑制活性均超过了抗肿瘤药物顺铂, 特别是对乳腺癌细胞株 MCF-7 的抑制活性较高, IC_{50} 值达到 $5.68\mu\text{M}$ 。化合物 **2** 对 5 个细胞株未显示抗肿瘤活性, 见表 1。

表1 部分化合物对不同肿瘤细胞株的半数生长抑制浓度 IC_{50} (μM)

化合物 编号	白血病 HL-60	肝癌 SMMC-7721	肺癌 A-549	乳腺癌 MCF-7	结肠癌 SW480
2	>40	>40	>40	>40	>40
3	18.74	27.72	19.75	5.68	11.60
顺铂	1.05	6.76	6.01	15.38	16.31

5 结果与讨论

由 α 桉醇经光敏氧化制备的倍半萜衍生物 **1-3** 均为新化合物。体外抗肿瘤活性测试表明, 化合物 **3** 具有显著的抗肿瘤活性, 值得进一步研究。本项研究说明, 以倍半萜成分为原料制备抗肿瘤活性倍半萜衍生物是可行的。

参考文献:

- [1] 赵庆, 邹澄, 余琴, 等. 毛姜花中的细胞毒活性二萜成分 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(6): 1220-1225.
- [2] 赵庆, 郝小江, 陈耀祖, 等. 圆瓣姜花的二萜化合物及其细胞毒活性研究 [J]. 药学学报, 1995, 30(2): 119.
- [3] Zhao Q, Qing C, Hao X J, et al. Cytotoxicity of labdane-type diterpenoids from *Hedychium forrestii* [J]. Chem Pharm Bull, 2008, 56(2): 210-212.
- [4] 赵庆, 贺小琼, 郝小江, 等. 滇姜花二萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(3): 395-397.
- [5] 赵声定, 马莎, 赵庆, 等. 三个二萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(3): 33-34, 50.
- [6] 赵庆, 郝小江, 邹澄, 等. 毛姜花的降二萜成分研究 [J]. 天

- 然产物研究与开发,2009,21(1):10-12.
- [7] 赵庆,郝小江,邹澄,等. 滇姜花中的两个新成分 [J]. 天然产物研究与开发,2008,20(5):761-764.
- [8] 高杰杰,郝小江,何红平,等. 圆瓣姜花的化学成分研究 [J]. 云南中医学院学报,2013,36(3):28-30.
- [9] Zhao Q,Hong X,Wang Y S,et al. Two new diterpenoids from *Hedychium forrestii* [J]. Chinese Chemical Letters, 2003,14(11):1141-1143.
- [10] 赵映梅,邹海舰,朱培芳,等. 滇姜花中倍半萜成分的研究 [J]. 云南中医学院学报,2012,35(6):7-9.
- [11] 赵庆,郝小江,陈耀祖,等. 滇姜花的倍半萜成分[J]. 云南植物研究,1995,17(2):201-203.
- [12] 赵庆,邹澄,郝小江,等. 滇姜花抗肿瘤活性二萜及其光敏氧化反应的研究 [J]. 植物学报,1999,41(5):528-530.
- [13] Zhao Q,Hao X J,Chen Y Z,et al. Studies on Photosensitized Oxidation of Diterpenoids from *Hedychium* Genus [J]. Chinese Chemical Letters,1996,7(1):25-28.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods,1983,65:55-63.
- [15] Fu Y H,Zhang Y,He H P,et al. Strynuxlins A and B, alkaloids with an unprecedented carbon skeleton from *Strychnos nux-vomica* [J]. J Nat Prod,2012,75:1987-1990.
- (编辑:杨阳)

Photosensitized Oxidation of α -eudesmol and Antitumor Researches of the Products

ZHAO Ying-mei¹, ZHANG Ying², ZOU Cheng², CAO Qing-qing³, ZHAO Qing³

(1. Chenggong District Hospital, Kunming 650500, China; 2. Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

3. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** Sesquiterpenoids were utilized to synthesis bioactive derivatives. **Methods** α -eudesmol, a sesquiterpene, was oxidized with the method of photosensitized oxidation. **Results** Three sesquiterpene derivatives were obtained, one peroxide derivative showed significant antitumor activity against several cancer cells. **Conclusion** It is feasible to obtain the derivatives with significant antitumor activity.

KEY WORDS: α -eudesmol; photosensitized oxidation; antitumor activity; sesquiterpenoids; *Hedychium yunnanense* Gangep; Zingiberaceae

(原文见第 11 页)

Effect of Duhuo Jisheng Decoction on the Cells Activity and Signal Transductions of CaM-CaMK-CREB Occurring in Lumbar Disc Cells of Adult Rats

ZHONG Zhuo-qin¹, LI Chang-hui², SONG Hong-mei², CHEN Yan², LIN Zhi-hui², YE Ying²,
CHEN Qian-jing², WANG Shi-zhong³, ZHANG Kun-mu²

(1. Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350003, China;

2. Second People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China;

3. Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: **Objective** The relationship between the CaM-CaMK-CREB signal pathway and the treatment for lumbar disc disease by Duhuo Jisheng decoction was studied. **Methods** Group intervention on fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats by medicine serum mixed with Du huo ji sheng decoction, blank serum and fetal calf serum respectively was made. Detect by MTT colorimetric assay the growth curve of fibrous ring cell under the adoption of Du huo ji sheng decoction serum;Conduct western blotting to detect the impact of herbal medicine serum on expression and quantification of CaM, CaMK and CREB;Perform data processing and statistical analysis on the results. **Results** The five groups showed no significant difference between each other during the first day after the intervention of Chinese medicine serum ($P>0.05$); from the second to seventh day after the intervention, there were significant difference between the blank serum group and other groups ($P<0.05$). Compared with the blank serum group, Du huo ji sheng Decoction medicine serum at all doses could substantially improve the expression of CaM, CaMKII, CaMKIV and CREB in fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats ($P<0.01$), and with the increased doses of Chinese medicine, the capacity of improving the expression level was also increasing. **Conclusion** Du huo ji sheng decoction medicine serum could highly stimulate the development of fibrous ring cells of lumbar intervertebral disc of adult rats. Clinically when it comes to the treatment by Du huo ji sheng decoction for lumbar disc disease, there is likely to be an important signal pathway called "CaM-CaMK-CREB".

KEY WORDS: Duhuo Jisheng Decoction; lumbar disc cells; primary cell culture signal pathway; Lumbar disc herniation