

滇产隆萼当归化学成分体外抗肿瘤活性研究

李 勇¹⁾, 陈英杰²⁾, 罗 敏³⁾, 闫 甲²⁾, 周轶平³⁾

(1) 个旧市人民医院, 云南 个旧 661000; 2) 昆明医科大学基础医学院; 3) 药学院, 云南 昆明 650500)

[摘要] 目的 对滇产隆萼当归化学成分及细胞毒活性进行研究, 以期发现新的具有抗肿瘤活性的微量成分. 方法 经硅胶柱层析、半制备 HPLC 方法获得 7 个单体化合物, 用 MTT 测定 7 个单体化合物对 2 株人肿瘤细胞的增殖抑制作用. 结果 线型呋喃香豆素类单体化合物 2 和 6 能明显抑制 2 株人肿瘤细胞的增殖, 其 IC₅₀ 值均小于 2 μg/mL, 作用甚至强于顺铂. 结论 滇产隆萼当归中的 2 种线型呋喃香豆素类成分具有较好的体外抗肿瘤活性, 结果表明, 从云南伞形科药用植物中分离抗肿瘤活性成分有着较好的前景.

[关键词] 隆萼当归; 线型呋喃香豆素; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R962 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0025 - 05

Anti-tumor Activity of Chemical Constituents from Yunnan *Angelica Oncosepala*

LI Yong¹⁾, CHEN Ying - Jie²⁾, LUO Min³⁾, YAN Jia²⁾, ZHOU Yi - Ping³⁾

(1) The People's Hospital of Gejiu, Gejiu Yunnan 661000; 2) Dept. of Basic Medical Science; 3) Dept. of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the chemical constituents of *A. oncosepala* collected in Lijiang County of Yunnan Province and to evaluate their anti-tumor activities in vitro. **Methods** By repeated column chromatography and semipreparative HPLC, 7 compounds were separated. Their anti-tumor activities in vitro were measured by MTT colorimetric assay. **Results** Compounds of linear furocoumarins 2 and 6 obviously inhibited proliferation of 2 human tumor cell lines, their IC₅₀ values were equal or lower than cisplatin. **Conclusion** 2 linear furocoumarins from Yunnan *A. oncosepala* exhibit excellent anti-tumor activity in vitro, indicating that constituents from *Angelica* genus plants may be good resource for new anti-tumor compounds.

[Key words] *Angelica oncosepala*; Linear furocoumarins; Anti-tumor activity

当归[*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels]为伞形科(Umbelliferae)植物当归的干燥根,味甘平,性温.具有补血活血、调经止痛、润肠通便的作用.临床应用广泛,素有“十方九归”之称.主要化学成分有多糖类、苯胺类、香豆素类、黄酮类、挥发油类等^[1].隆萼当归(*Angelica oncosepala*),又名松香疔药、土当归等,为伞形科当归属(*Angelica* L.)植物,多年生草本,主要产于云南西南部等海拔 3 500 ~ 4 300 m 的高寒地带^[2].

关于该植物的化学及活性成分前人未进行过研究,为了从中发现更多的活性成分和深入了解该植物化学成分及抗肿瘤活性,笔者对采自云南丽江隆萼当归的化学成分进行了提取分离和细胞毒活性筛选.

1 材料与amp;方法

1.1 隆萼当归化学成分的提取分离

[基金项目] 云南省高校药学重点实验室项目 (2010ZL004); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2010Y191)

[作者简介] 李勇 (1977~),男,云南云县人,医学学士,主治医师,主要从事眼科临床工作.

[通讯作者] 周轶平. E-mail: zhouypym@foxmail.com

干燥隆萼当归植物根部 1.0 kg, 粉碎后用纯甲醇重复提取 3 次 (每次 3 L, 室温浸泡 24 h), 提取液合并, 过滤, 减压蒸馏除去甲醇, 静置, 分散于 0.5 L, 滤液用 EtOAc 萃取数次, 蒸干 EtOAc 得浸膏 20 g. 该浸膏加 30 g 硅胶 (100 目) 拌样后以 200 g 硅胶 (200~300 目) 柱层析, 氯仿-丙酮溶剂梯度洗脱 (1:0~0:1), TLC 检测, 合并相同馏分, 得馏分段 A-E. 馏分段 E 为丙酮洗脱部分, 未作进一步分离.

馏分段 A (2.0 g) 以 4.0 g 硅胶拌样, 40 g 硅胶装柱, 石油醚/丙酮 (8:2, 7:3) 洗脱, 馏分经 TLC 检测合并后, 再用半制备 (35% MeOH-H₂O) 得到化合物 1 (8-methoxypsoralen, 4.0 mg).

馏分段 B (3.5 g) 经硅胶柱层析 (氯仿: 甲醇 30:1, 20:1, 15:1, 9:1, 8:2) 进行梯度洗脱, TLC

检测合并相同馏分, 各部分再经硅胶柱层析、RP-18 (MeOH:H₂O, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 100:0)、Sephadex LH (甲醇) 层析以及半制备及制备 HPLC 依次得到阿魏酸 (700mg), 化合物 2 (sen-byak-angelicole, 5.0 mg), 3 (5,8-di(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)-psoralen, 6.0 mg).

馏分段 C (2.5 g) 经硅胶柱层析、RP-18 (MeOH:H₂O, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 00:0)、Sephadex LH (甲醇) 层析以及半制备及制备 HPLC 依次得到化合物 4 (byakangelicin, 5.0 mg)、化合物 5 (5-(2',3'-dihydroxy-3'-methylbutyloxy)-8-(3''-methylbut-2''-enyloxy)-psoralen 7 mg)、化合物 6 (apaensis 4.0 mg), 见图 1.

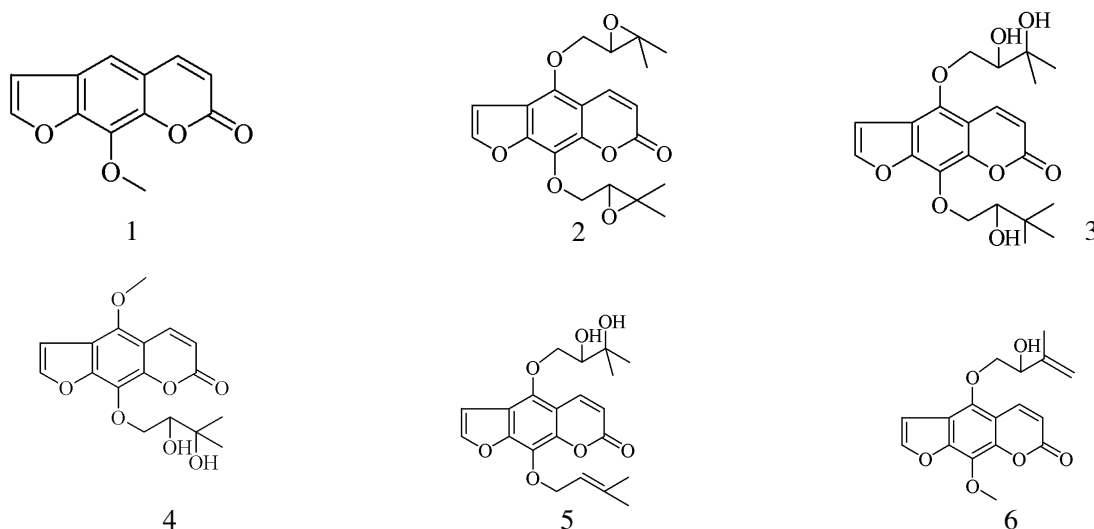


图 1 6 个线型呋喃类化合物化学结构式

Fig. 1 The structures of six liner furocoumarins

1.2 体外抗肿瘤活性测试

1.2.1 细胞株 人白血病细胞株 K562, 人结肠癌细胞株 HCT-116, 均来自云南省天然药物药理重点实验室细胞库.

1.2.2 样品的配制 当归的 7 个提取物溶于 DMSO (二甲亚砜), 配成 100 mg/mL 的母液, 用生理盐水等比稀释至 10、30、100、300、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 备用. 顺铂注射液 (5 mg/mL, 云南个旧生物药业有限公司, 100902), 用生理盐水稀释至 100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 备用.

1.2.3 细胞毒活性测试 取处于对数生长期的细胞, 将浓度调整为 $5 \times 10^4/\text{mL}$, 加入 96 孔培养板,

90 μL /孔. 每孔分别加入 10 μL 不同浓度的样品. 阴性对照为等体积的生理盐水, 阳性对照为顺铂. 当归提取物的受试浓度分别为 1, 3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/mL}$; 顺铂的受试浓度分别为: 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$. 加样组与对照组均设 4 个复孔, 每块板均设有 4 个空白对照孔 (仅加培养基). 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳培养箱中孵育 48 h 后, 加入 MTT (5 mg/mL, Sigma), 10 μL /孔. 继续培养 4 h 后加入三联液 [10% SDS-5% 异丁醇-0.012 mol/L HCL (w/v/v)] 100 μL /孔, 放置过夜后, 用酶标仪 (品牌, 型号) 在 570 nm, 630 nm 双波长下测定各孔的 OD 值.

1.3 数据处理

$$\text{样品对细胞的增殖抑制率} = \frac{1 - \text{实际 OD 均值}}{\text{溶剂对照实际 OD 均值}} \times 100\%$$

对于在所测浓度范围内, 抑制率大于 40% 的样品用 GWbasic 软件计算 IC_{50} 值及其 95% 可信区间。

2 结果

2.1 样品对 K562、HCT-116 细胞的增殖抑制作用

在 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 测试浓度范围内, 样品 3, 4 及阿魏酸对 2 株人肿瘤细胞的增殖没有明显抑制作用; 样品 1、2、5、6 则有不同的抑制作用, 且至少有 1 个浓度组抑制率大于 40% (见图 2、图 3)。其中 2、6 在 1 $\mu\text{g/mL}$ 时即显示出对 2 株细胞的增殖抑制作用, 抑制率大于 20%, 在 10 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制作用就接近或达到 100%。

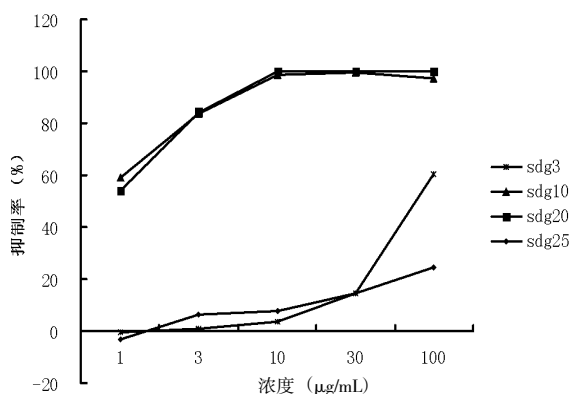


图 2 化合物 1、2、5、6 对 K562 细胞的增殖抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects on K562 cell of compound 1,2,5 and 6

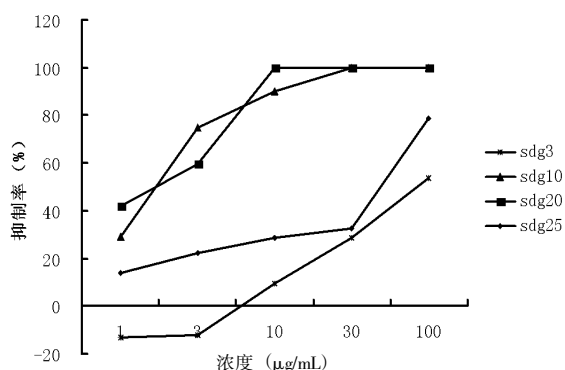


图 3 化合物 1、2、5、6 对 HCT-116 细胞的增殖抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects on HCT-116 cell of 1,2,5 and 6

6

2.2 1、2、5、6 对 K562, HCT-116 细胞增殖抑制的 IC_{50} 值

经计算, 2、6 抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 0.9, 1.2 $\mu\text{g/mL}$ (见表 1); 抑制 HCT-116 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 1.9, 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (见表 2)。阳性对照顺铂抑制 2 株细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 1.9, 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 。sdg10, sgd20 对 K562 细胞的增殖抑制作用均小于顺铂, 对 HCT-116 细胞的增殖抑制作用接近顺铂。

表 1 样品抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值

Tab. 1 IC_{50} values of 2,5 and 6 on K562 cell

样 品	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	95%CI
2	1.2	0.5 ~ 3.1
5	81.3	65.5 ~ 100.8
6	0.9	0.5 ~ 1.7
顺铂 (阳性对照)	1.9	0.5 ~ 7.1

表 2 样品抑制 HCT-116 细胞增殖的 IC_{50} 值

Tab. 2 IC_{50} values of 1,2,5 and 6 on HCT-116 cell

样 品	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	95%CI
1	31.2	10.8 ~ 90.2
2	1.5	0.5 ~ 4.4
5	81.8	65.4 ~ 102.4
6	1.9	0.7 ~ 5.1
顺铂 (阳性对照)	1.6	0.5 ~ 5.4

3 讨论

当归是我国传统的常用中药, 根据产地不同分为秦归和云归。秦归主要产于甘肃岷县, 云归主要产于云南丽江等地。现代药理学研究表明当归中的有效成分: 苯酞类、香豆素类、阿魏酸纳、黄酮类等具有抗氧化、保护血管内皮细胞、抑制 NO 生成等作用; 多糖类具有抗衰老和抗辐射损伤的作用^[3-5]。尚未见对当归化学成分抗肿瘤活性的报道。

香豆素 (Coumarin) 是一类具有苯并吡喃酮母核的天然产物, 广泛存在于植物界, 特别是在

(下转第 31 页)

此, 整合素 $\alpha V \beta 3$ 可作为一个卵巢癌治疗靶点, 与卵巢癌常规治疗方案配伍应用.

[参考文献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58: 71 - 96.
- [2] HAUBNER R, WESTER H J. Radiolabelled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies[J]. Curr Pharm Des, 2004, 10 (13): 1 439 - 1 440.
- [3] OXBOEL J, BINDERUP T, KNIGGE U, et al. Quantitative gene-expression of the tumor angiogenesis markers vascular endothelial growth factor, integrin αV and integrin $\beta 3$ in human neuroendocrine tumors [J]. Oncol Rep, 2009, 3: 769 - 777.
- [4] SACHARIDOU A, STRATMAN A N, DAVIS G E. Molecular mechanisms controlling vascular lumen formation in three-dimensional extracellular matrices[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 195(1-2): 122 - 143.
- [5] ROBINSON S D, HODIVALA - DILKE K M. The role of $\beta 3$ -integrins in tumor angiogenesis: context is everything [J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(5): 630 - 637.
- [6] BAHAR H, BENAYAHU D, YAFFE A, et al. Molecular signaling in bone regeneration[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2007, 2: 87 - 101.
- [7] HODIVALA-DILKE K. $\alpha V \beta 3$ integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(5): 514 - 519.
- [8] 杨丽华, 李玛琳, 王凯峰, 等. bFGF、 $\alpha V \beta 3$ 和 NF κB 在 hOEC 中的表达及其与血管生成关系的研究 [J]. 昆明医学院学报, 2005, 27(2): 19 - 23.
(2012 - 02 - 21 收稿)

(上接第 27 页)

伞形科、芸香科、菊科、豆科、茄科等植物. 香豆素类化合物具有抗肿瘤、抗艾滋病、抗氧化、抗炎、抗微生物、抗凝血等多方面的生物活性^[6]. 本研究对滇产隆萼当归的化学成分进行了提取分离, 获得 6 个线型呋喃类香豆素类化合物及阿魏酸. 经过初步的体外抗肿瘤活性筛选, 发现阿魏酸对所测试的两株人肿瘤细胞无细胞毒活性. 6 个线型呋喃类香豆素化合物中, 2 和 6 能明显抑制两株人肿瘤细胞的增殖, 并且其 IC_{50} 值小于 2 $\mu g/mL$, 低于或接近阳性对照药顺铂. 1, 3 在较高浓度时能抑制肿瘤细胞的增殖, 而 3, 4 则无明显的作用. 6 个化合物的母核相同, 除了 1 外, 在 5 位和 8 位均有取代基, 但取代基的类型有较大差异, 这种差异造成了其活性的差异, 进一步的活性比较研究可望对它们的构效关系作出分析. 2 和 6 具有良好的细胞毒活性, 其抗肿瘤活性有深入研究的价值.

[参考文献]

- [1] 宋萍萍, 孙明毅, 徐增莱, 等. 三种当归属植物的化学成分研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 833 - 835.
- [2] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 63 - 596.
- [3] 王雪梅, 李应东. 当归有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 甘肃中医, 2009, 22(11): 50 - 51.
- [4] 徐露, 董志. 当归多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 激光杂志, 2008, 29(4): 89 - 90.
- [5] 杨艳秋, 杨伟民. 当归活性成分阿魏酸钠干预老年冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛患者血液抗氧化能力和保护血内皮细胞功能[J]. 中国临床康复, 2006, 10(39): 101 - 103.
- [6] 吴龙火, 李培, 刁勇, 等. 天然香豆素的抗癌机制研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(10): 1 174 - 1 177.

(2012 - 02 - 20 收稿)