

阿坝当归的化学成分及体外抗肿瘤活性研究

李勇^{1,2)}, 关伟键¹⁾, 吴雪¹⁾, 刘霞¹⁾, 罗敏¹⁾, 李鲜¹⁾

(1) 昆明医科大学药学院暨重点实验室, 云南昆明 650500; 2) 个旧市人民医院, 云南个旧 661000)

[摘要] **目的** 对滇产阿坝当归干燥根部的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化学成分. **方法** 用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、Rp-18 反相柱层析、半制备 HPLC 方法对阿坝当归根部的甲醇提取物进行分离、纯化, 用 MTT 测定单体化合物对 K562、SMMC-7721 两株人肿瘤细胞增殖的抑制作用. **结果** 从阿坝当归根部获得 8 个单体化合物, 其中 7 个化合物为线型呋喃香豆素类型. **结论** 滇阿坝当归含有丰富的香豆素成分, 但经体外抗肿瘤活性的初步筛选, 分离得到的 7 个线型呋喃香豆素化合物体外抑制肿瘤细胞增殖作用不明显.

[关键词] 阿坝当归; 线型呋喃香豆素; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 11 - 0001 - 04

Chemical Constituents from Roots of *Angelica Apatensis* with Cytotoxic Activity

LI Yong^{1,2)}, GUANG Wei - Jian¹⁾, WU Xue¹⁾, LIU Xia¹⁾, LUO Min¹⁾, LI Xian¹⁾

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

[Abstract] **Objective** Obtaining chemical constituents of *Angelica apaensis* collected in Qiaojia County of Yunnan Province and detecting their anti-tumor activities in vitro. **Methods** The MeOH extract of *A. apaensis* was repeatedly subjected to column chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and/or RP-18 and semipreparative HPLC. Their anti-tumor activities in vitro were measured by MTT colorimetric assay. **Results** Eight compounds were isolated from the roots of this plant. **Conclusion** The major type of chemical constituents of *A. apaensis* in Yunnan is furocoumarin. These separated compounds showed weak anti-tumor activity in vitro.

[Key words] *Angelica apaensis*; Linear furocoumarins; Cytotoxicity

阿坝当归^[1] (*Angelica apaensis*) 系伞形科当归属植物, 别名是法罗海, 红独活, 小独活. 多年生草本, 生于高山草地及高山山坡灌丛间. 分布于云南北部、四川西部和西藏等地, 主产于云南东川、巧家及四川阿坝藏族自治州. 有行气止痛功效. 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, 笔者对采自云南巧家阿坝当归的化学成分进行了提取分离和细胞毒活性筛选. 从该药用植物的甲醇提取物分离并鉴定 8 个化

物, 其中 7 个为线型香豆素类化合物. 它们的结构鉴定为: Oxypeucedanin (1)^[2], Isoimperatorin (2)^[2], Imperatorin (3)^[2], Oxypeucedanin hydrate (4)^[3], Pabulenol (5)^[4], Heraclenol (6)^[5], Heraclenol (7)^[6], Ferullic acid (8) .

1 材料与方法

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (21102060); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2011FB058)

[作者简介] 李勇 (1977~), 男, 云南个旧市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事眼科临床工作.

[通讯作者] 李鲜. E-mail: xianlikm@yahoo.com.cn; 罗敏. E-mail: feiyue1998@163.com

1.1 阿坝当归化学成分的提取分离

阿坝当归植物的干燥根部 6.0 kg, 粉碎后用甲醇溶液重复提取 4 次 (每次 10.0 L, 室温浸泡 24 h), 提取液合并, 过滤, 减压蒸馏除去甲醇, 静置, 滤除沉积下来的色素后, 分散于 1.5 L 水中, 用 EtOAc 萃取数次, 蒸干 EtOAc 得浸膏 220.0 g. 该浸膏加等量硅胶 (100 目) 拌样后以 1.0 kg 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 7 部分. A (氯仿部分), B (9:1), C (8:2), D (7:3), E (6:4), F (5:5) 和丙酮部分.

馏分段 A (28.0 g) 以 40.0 g 硅胶拌样, 硅胶装柱, 石油醚 / 丙酮 (8:2, 7:3) 洗脱, 馏分经

TLC 检测合并后, 并通过反复硅胶柱层析 (石油醚 - 乙酸乙酯), Sephadex LH-20 (丙酮) 以及重结晶得到化合物 1 (20.0 mg), 化合物 2 (15.0 mg), 化合物 3 (18.0 mg).

馏分段 B (25.0 g) 经过反复硅胶柱层析 (石油醚 - 乙酸乙酯), Sephadex LH-20 (丙酮), MCI-gel (60% ~ 100% MeOH-H₂O、甲醇、丙酮) 柱层析以及重结晶得到化合物 4 (12.0 mg), 化合物 5 (10.0 mg).

馏分段 C (30.0g) 经通过硅胶柱层析, MCI-gel (60% ~ 100% MeOH-H₂O、甲醇、丙酮) 柱层析以及重结晶得到化合物得到化合物 6 (15.0 mg), 7 (16.0 mg), 化合物 8 (2.8 g), 见图 1.

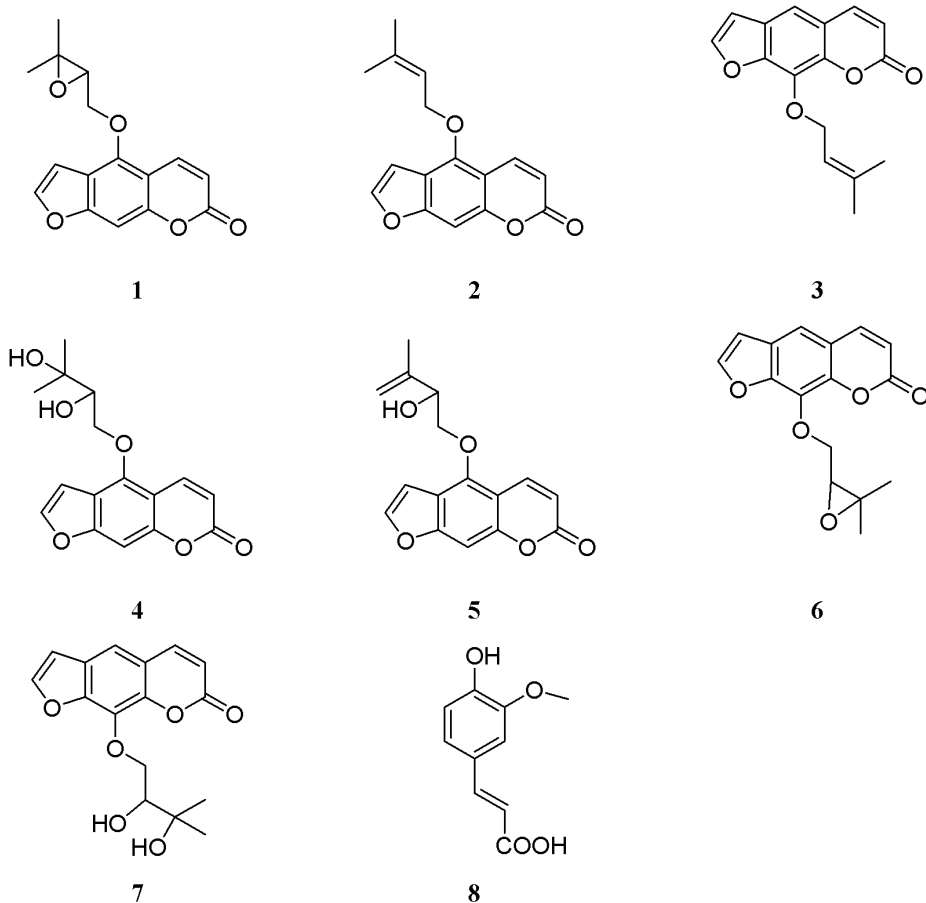


图 1 化合物的结构式

Fig. 1 Compounds of structural formula in table 1

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, 人肝癌细胞株 SMMC-7721, 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 0.1, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用. 氟尿嘧啶注射液 (25 mg/mL, 天津金耀氨基酸有限公司, 批号 1105081), 用生理盐水稀释至 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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, 阳性对照为氟尿嘧啶. 当归提取物的受试浓度分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 顺铂的受试浓度分别为: 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 加样组与对照组均设 5 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% CO_2 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 (美国 Molecular Devices 公司生产, Plus 384 型) 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% 置信区间.

2 结果

2.1 7 个样品对 K562、SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用

在 0.01 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测试浓度范围内, 样品 1、2、5 对 K562 细胞的增殖没有明显抑制作用; 样品 3、4、6、7 则有不同的抑制作用, 且至少有 1 个浓度组抑制率大于 40% (图 2). 样品 1、2、3、

4、5、7 对 SMMC-7721 细胞的增殖没有明显抑制作用; 样品 6 具有一定抑制作用, 有 1 个浓度组抑制率大于 40% (图 3).

2.2 3、4、6、7 对 K562、SMMC-7721 细胞增殖抑制的 IC_{50} 值

经计算, 样品 3、4、6、7 抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 485.91、89.76、80.89、177.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 1); 样品 6 抑制 SMMC-7721 细胞增殖的 IC_{50} 值为 246.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表 2). 阳性对照氟尿嘧啶抑制 K562 和 SMMC-7721 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 1.68、1.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

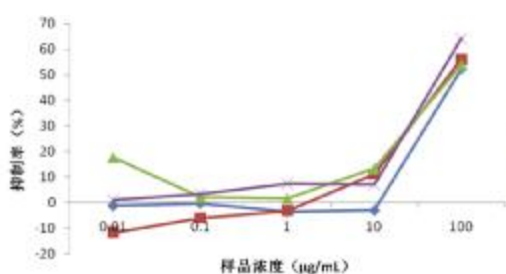


图 2 化合物 3、4、6、7 对 K562 细胞增殖的抑制作用
Fig. 2 Inhibitory effects on K562 cell of compounds 3, 4, 6 and 7

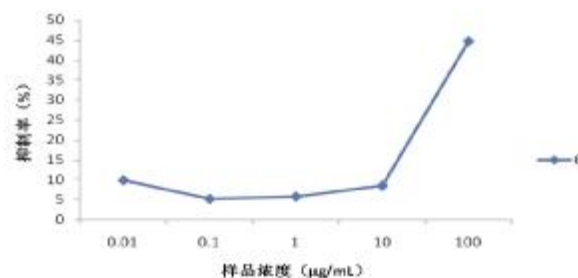


图 3 化合物 6 对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用
Fig. 3 Inhibitory effects on SMMC-7721 cell of compound 6

表 1 样品 3、4、6、7 抑制 K562 细胞增殖的 IC_{50} 值

Tab. 1 IC_{50} values of 3, 4, 6 and 7 on K562 cell

样 品	IC_{50} (g/mL)	IC_{50} 95%CI (g/mL)
3	485.91	19.62 ~ 12 033.82
4	89.76	37.36 ~ 215.65
6	80.89	66.78 ~ 97.98
7	177.53	8.92 ~ 3 534.65
氟尿嘧啶(阳性对照)	1.68	0.31 ~ 9.24

表 2 样品 6 抑制 SMMC-7721 细胞增殖的 IC_{50} 值Tab. 2 IC_{50} value of 6 on SMMC-7721 cell

样 品	IC_{50} (g/mL)	IC_{50} 95%CI (g/mL)
6	246.68	14.10 ~ 4 315.04
氟尿嘧啶(阳性对照)	1.43	0.24 ~ 6.22

3 讨论

伞形科植物全世界约有 275 属 2 850 余种, 近于全球分布, 以北温带最丰富, 我国分布约有 96 个属 525 种, 云南约有 51 个属 259 种 21 变种. 伞形科中很多植物是著名的传统中药材, 如当归, 白芷、前胡、独活、柴胡、川芎等. 且使用历史悠久, 例如, 当归 (*Angelica sinensis*) 的使用最早见于《尔雅》, 《本草纲目》亦曾记载, “当归调血, 为女人要药”.

云南伞形科药用植物的研究主要始于 20 世纪 70 年代, 研究表明, 云南伞形科药用植物的化学成分主要为香豆素. 且具有广泛的生理和药理活性, 如白当归素、水合氧化前胡素和紫花前胡昔抑制血小板聚集作用强于阿司匹林^[7]; 氧化前胡素、白当归素对组氨酸的分泌有抑制作用^[8]; 花椒毒素、前胡内酯、佛手内酯、氧化前胡素对艾氏瘤、黑色素瘤有抑制作用^[9].

通过对云南伞形科阿坝当归药用植物的化学成分及抗肿瘤活性的初步研究, 笔者发现, 这种植物含有丰富的伞形科香豆素成分, 但初步体外抗肿瘤活性筛选, 尚未获得抑制肿瘤细胞增殖作用较强的化合物^[10].

[参考文献]

[1] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 876 - 877.

- [2] BERGENDORFF O, DEKERMENDJIAN K, NIELSEN M, et al. Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors in vitro [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44 (6): 1 121 - 1 124.
- [3] FRANKE K, PORZEL A, MASAOUD M, et al. Furanocoumarins from *Dorstenia gigas* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56: 611-621.
- [4] 杨郁, 于能江, 梁菲菲, 等. 紫金沙化学成分研究 (II) [J]. *解放军药学学报*, 2010, 26(3): 189 - 191.
- [5] 孙汉董, 林中文, 钮芳娣. 伞形科中药的研究 [J]. *云南植物研究*, 1984, 6(1): 99 - 102.
- [6] 孙汉董, 林中文, 钮芳娣. 法落海、白云花和滇白芷根的化学成分研究 [J]. *植物学报*, 1978, 20(3): 244 - 254.
- [7] 黄泰康编. 常用中药成分与药理手册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 1 442.
- [8] MATSUDA H, MURAKAMI T, NISHIDA N. Medicinal foodstuffs. XX. Vasorelaxant active constituents from the roots of *Angelica furcijuga* Kitagawa: structure of hyuganins A, B, C and D [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48 (10): 1 429 - 1 435.
- [9] 谢少雄, 李晓群, 金琪漾, 等. 闽台两省香豆素类抗癌植物 [J]. *福建中医*, 1999, 30(1): 39.
- [10] 钟霞, 安平, 刘明生, 等. 酮类双Schiff碱配合物的合成与抗肿瘤活性研究 [J]. *海南医学院学报*, 2010, 16 (7): 817 - 819, 823.

(2013 - 10 - 10 收稿)