

小叶锦鸡儿种子中的生物碱及其细胞毒活性

张国庆, 王科兵 (解放军第 169 医院, 湖南 衡阳 421002)

[摘要] 目的 鉴定小叶锦鸡儿种子中的生物碱类成分, 研究其抗癌活性。方法 采用色谱和光谱法对小叶锦鸡儿种子中所含有的总生物碱进行分离并作结构鉴定; 对小叶锦鸡儿种子的总生物碱及分离得到的 5 个生物碱单体分别进行细胞毒活性筛选。结果 从总生物碱中共分离得到了 5 个原小檗碱型生物碱, 分别为去氢白莲叶碱、黄连碱、表小檗碱、脱氢卡维丁以及刻叶紫堇明碱, 它们对 Saos-2, A375, HeLa 细胞株均表现出明显的细胞毒活性。结论 5 个生物碱单体均为首次从锦鸡儿属植物中分离得到, 提示小叶锦鸡儿种子提取物具有抗肿瘤的药用价值。

[关键词] 小叶锦鸡儿; 抗癌活性; 生物碱

[中图分类号] R 285 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)02-0105-03

Anticancer and phytochemical properties of alkaloids from *Caragana microphylla*

ZHANG Guoqing, WANG Kebing (The 169th hospital of PLA, Hengyang 421002, China)

[Abstract] **Objective** To identify the composition of the total alkaloids of the seeds of *Caragana microphylla*, a native plant from the North west of China which is used in traditional Mongolian medicines. **Methods** The alkaloids was separated and identified by chromatographic methods and spectral analysis. The anticancer activities of the total alkaloids and the isolated protoberberine alkaloids were tested respectively on Saos-2, A375 and HeLa cell lines. **Results** Five protoberberine alkaloids including dehydrothalictroline, coptisine, epiberberine, dehydroapocaviline and corysamine were isolated. The total alkaloids and the 5 alkaloids were found to be very effective against three tumor cell lines. **Conclusions** The 5 protoberberine alkaloids were isolated for the first time from *Caragana* genus. *Caragana microphylla* seed extracts may play a role as an hopeful anticancer therapeutic agent.

[Key words] *Caragana microphylla* Lam; anticancer activity; alkaloid

豆科植物小叶锦鸡儿 *Caragana microphylla* Lam., 俗称柠条, 灌木, 广泛分布于中国西、北部, 其根和种子在传统蒙药中用于治疗肿瘤^[1,2]。有学者对小叶锦鸡儿的根进行过研究, 在其根中发现了异黄酮成分^[3]。另外还有学者对其进行过药理学研究, 结果显示该植物具有镇痛、抗炎以及抗癌等多种生物活性^[4]。小叶锦鸡儿种子俗称柠条子, 在民间可作药用, 但未见对其化学成分和药理活性的深入研究。我们的前期研究发现柠条子的提取物在体外实验中表现出明显的细胞毒活性, 因此对其化学成分进行了进一步研究。本文首次报道了小叶锦鸡儿种子生物碱类成分, 并进行了细胞毒活性的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂 小叶锦鸡儿种子于 2004 年 7 月采集于我国内蒙古自治区中部, 经第二军医大学药学院生药教研室郑汉臣教授鉴定为豆科植物小

叶锦鸡儿的种子, 其标本存放于第二军医大学药学院。小叶锦鸡儿总生物碱提取中所使用的溶剂 (石油醚、乙醇、氯仿、氨水和硫酸) 均为工业纯。

1.2 总生物碱提取 将 2.5 kg 干燥的小叶锦鸡儿种子粉碎后用石油醚脱脂 3 次 (每次 10 L 石油醚, 超声提取 2 h), 剩余药材残渣置于通风橱将石油醚完全挥干后再将药材残渣浸泡于 10 L 75% 乙醇 (10% 硫酸) 中, 于 60 °C 水浴提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 蒸去溶剂, 加入氨水调 pH 值至 10 ~ 11, 加入氯仿萃取 3 次, 每次 750 mL, 合并氯仿层, 减压回收溶剂得总生物碱 26.6 g。

1.3 分离 总生物碱经硅胶柱色谱, 以氯仿-甲醇 (1:0:1) 梯度洗脱得 8 个片段 (I-VIII)。该 8 个片段经反复硅胶柱层析 (洗脱溶剂为氯仿-甲醇 = 80:1:0:1) 以及 Sephadex LH-20 柱层析 (洗脱溶剂为甲醇-氯仿 = 1:2:2:1), 共得到 5 个化合物, 分别为去氢白莲叶碱 (1)、黄连碱 (2)、表小檗碱 (3)、脱氢卡维丁 (4) 以及刻叶紫堇明碱 (5)。

1.4 结构鉴定 采用 Bruker AM-500 核磁共振仪进行结构鉴定, 采用 Varian Mat-212 质谱仪测定化合物的分子量。

[作者简介] 张国庆 (1974-), 男, 主管药师. Tel 13017175511, E-mail ZhangguoqingZ@yahoo.com.cn.

[通讯作者] 王科兵. Tel 13037343451, E-mail wangkb169@163.com.

1.5 细胞培养 细胞株 Saos-2(人骨肉瘤), A375(人皮肤癌)和 HeLa(人宫颈癌)购于上海癌症研究所。所有细胞株培养于二氧化碳培养箱中,温度为 37℃,二氧化碳含量为 5%。Saos-2 采用 DMEM 培养基; A375(人皮肤癌)和 HeLa 细胞株采用添加 10% 热灭活小牛血清、1% 必需氨基酸和 1% 链霉素和青霉素的 RPMI 1640 培养基。

1.6 细胞毒活性筛选 分别将总生物碱和 5 种原小檗碱型生物碱溶解于 DMSO 中,并用两种培养基分别稀释为 4 个浓度 (5×10^{-5} , 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} mmol/ml)。采用 96 孔微孔培养皿,每个微孔中注入 100 μ l 细胞混悬液(细胞数为 5×10^3 /孔)孵育 24 h 后,分别加入不同浓度的药物,再孵育 48 h 后测定。测定采用 MTT 方法,ELx 800 扫描分光光度计(Biotec USA)于 450 nm 处测定吸收度。细胞毒活性用 G_{50} 值(50% 细胞生长抑制所需的药物浓度)表达。

2 结果

2.1 总生物碱化学组成 由小叶锦鸡儿种子分离得到的总生物碱为深绿色,经反复柱层析后分离得到 5 种原小檗碱型生物碱(化合物 1-5 结构见表 1),其性状分别为,去氢白莲叶碱(1,黄色粉末),黄连碱(2,黄色粉末),表小檗碱(3,黄绿色针状结晶),脱氢卡维丁(4,黄色粉末)以及刻叶紫堇明碱(5,黄色粉末)。

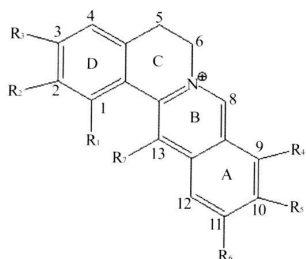


表 1 从小叶锦鸡儿种子中分离得到的 5 个生物碱的结构式

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
去氢白莲叶碱	H	OMe	OMe	OCH ₂ O	H	Me	
黄连碱	H	OCH ₂ O		OCH ₂ O	H	H	
长小檗碱	H	OMe	OMe	OCH ₂ O	H	H	
脱氢卡维丁	H	OH	OMe	OCH ₂ O	H	Me	
刻叶紫堇明碱	H	OCH ₂ O		OCH ₂ O	H	Me	

化合物 1 分子式 C₂₁H₂₀NO₄, 与 Dragendoff's 试剂显生物碱特征性反应。在 ¹H NMR 中可以观察到一个亚甲二氧基、两个甲氧基和两个苯环的信号。¹³C NMR 和 DEPT 谱表明有该化合物有 21 个碳原子,分别为一个甲基碳,两个甲氧基碳,3 个亚甲二

氧基碳,5 个次甲基碳和 10 个季碳。结合 DEPT, HMQC, HMBC, ¹H-¹HCOSY 数据以及文献,化合物 1 的结构被鉴定为去氢白莲叶碱^[5]。

我们比较了其他 4 个化合物和去氢白莲叶碱的 NMR 数据,化合物 2 在 C-2, C-3 和 C-13 位上没有观察到甲氧基和甲基信号,而观察到了亚甲二氧基的信号,结合文献化合物 2 鉴定为黄连碱^[6]; 化合物 3 在 C-13 位上无甲基信号,结合文献鉴定为表小檗碱^[7]。化合物 4 的 NMR 数据与化合物 1 相比较,其 C-2 位上为羟基信号而不是亚甲二氧基信号,结合文献鉴定为脱氢卡维丁^[8]。化合物 5 与化合物 2 相比较,除 C-13 位上的甲基信号外,其他信号基本一致,结合文献鉴定化合物 5 为刻叶紫堇明碱^[9]。本文所报道的 5 种原小檗碱型生物碱为首次从锦鸡儿属植物中分离。

2.2 细胞毒活性 小叶锦鸡儿种子中所含的总生物碱和 5 种原小檗碱型生物碱的细胞毒活性通过对细胞株 Saos-2(人骨肉瘤), A375(人皮肤癌)和(人宫颈癌)的抑制作用进行评价。细胞株与不同浓度的总生物碱和 5 种生物碱单体溶液孵育 48 h,计算 G_{50} (见表 2)。其中化合物 5 刻叶紫堇明碱对 Saos-2 和 A375 细胞株表现出较强的细胞毒活性,两者 G_{50} 值分别为 2.10 和 0.39 μ g/ml; 三种细胞株中,总生物碱对 HeLa 细胞株的细胞毒作用最强, G_{50} 值为 2.36 μ g/ml。实验结果表明小叶锦鸡儿种子具有明显的细胞毒作用。

表 2 小叶锦鸡儿种子总生物碱与 5 种原小檗碱对 Saos-2, A375 和 HeLa 细胞株抗癌活性(48 h 后 G_{50} 值单位 μ g/ml)

	Saos-2	A375	HeLa
总生物碱	3.06 ± 0.098	11.42 ± 0.016	2.36 ± 0.056
去氢白莲叶碱	3.28 ± 0.158	20.23 ± 0.083	4.44 ± 0.090
黄连碱	3.84 ± 0.179	34.77 ± 0.005	4.16 ± 0.073
长小檗碱	2.77 ± 0.257	11.92 ± 0.146	11.85 ± 0.100
脱氢卡维丁	2.34 ± 0.229	12.84 ± 0.136	10.58 ± 0.146
刻叶紫堇明碱	2.10 ± 0.225	0.39 ± 0.022	3.32 ± 0.214

3 讨论

从天然产物中寻找具有抗癌活性的候选药物历来为研究热点。豆科植物小叶锦鸡儿的种子含有众多具有各种生物活性的次生代谢产物,如三萜类、生物碱类、黄酮类以及异黄酮类化合物等。有报道小叶锦鸡儿根的乙醇和乙酸乙酯提取物在动物实验中表现出了较好抗癌活性,这个结果提示我们该植物中可能存在具有细胞毒活性的化合物^[10]。在以往研究中,我们从其种子中提取得到的总生物碱在体外实验中表现出了较好的细胞毒活性。此次我们从其总生物碱中分

致暂时打开细胞间的紧密结合^[5]。

【参考文献】

- [1] 常新全, 丁丽霞. 中药活性成分分析手册 [M]. 北京: 学苑出版社, 2006 1961.
- [2] 王 峰, 蒋新国. 鼻黏膜作为脑内递药途径的研究进展 [J]. 药学报, 2001, 36(8): 636.
- [3] 中国药典 2005年版 [S]. 一部. 2005: 220

(上接第 106页)

离得到了 5个原小檗碱型生物碱(化合物 1~ 5), 并对这 5个化合物进行细胞毒活性研究, 结果显示这 5个生物碱均具有一定的细胞毒活性。这个结果也证实了民间应用小叶锦鸡儿进行抗癌治疗的这一传统功效。

总生物碱以及这 5种生物碱单体, 在较低浓度下即可抑制肿瘤细胞的生长, 提示其细胞毒活性可能较强。其中化合物 5(刻叶紫堇明碱)对 Saos-2和 A375细胞株表现出很强的细胞毒活性, 总生物碱对 HeLa细胞株的细胞毒作用最强。5个生物碱单体细胞毒活性的差异与它们的分子结构直接相关。其母环结构上的 7位(见表 1)的 N⁺ 是细胞毒作用的关键结构。另外, A, B, C, D环上的取代基的不同对其细胞毒活性有一定的影响^[11]。其中 A, D环氧化程度越高, 可能其细胞毒活性越强。另外 C-13位上的取代基不同对于化合物的活性也有不同的影响^[12]。化合物 5(刻叶紫堇明碱)与化合物 2(黄连碱)的氧化程度相同, 但其在 B环上有一个甲基, 因此它对 Saos-2和 A375抑制作用最强。另有报道原小檗碱含量丰富的草本植物能合成 MDR(多药耐受)外排泵抑制剂 5-甲氧基氢诺卡啶, 可以抑制金葡菌 MDR 外排泵排出小檗碱^[13]。还有报道提到小檗碱或其类似物能诱发多重耐药转运物在癌细胞中的表达, 可以影响某些化合物的摄入和排出^[14]。这些研究结果表明, 小檗碱及类似物能与其他分子相互作用, 影响细胞对于物质摄入或排出, 这也许解释了总生物碱对 HeLa细胞表现出最强的抗癌作用。

小叶锦鸡儿在我国西、北部分布广泛, 属多年生灌木, 生长于贫瘠的沙化地, 为传统的防风固沙植物, 其能增强土壤的储水能力, 增加土壤有机 C和 N的积累, 降低土壤碱性, 因此, 对当地环境保护有重要意义。虽然它的根和种子都可入药, 但当地居民主要使用其根入药。但如果对于该植物过度利用, 其资源将会逐渐减少甚至趋于灭绝, 对当地环境会产生严重影响。为此, 我们对小叶锦鸡儿的种子进行了研究, 首次报道了从小叶锦鸡儿的种子中提取

- [4] Washington N, Steele RJC, Jackson SJ *et al* Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers [J]. *Int J Pharm*, 2000 198(2): 139.
- [5] Pilgram GSK, Engelsmarvan Pelt AM, Koerten HK, *et al* The effect of tozone on the lateral lipid organization of human stratum corneum and its permeability [J]. *Pharm Res* 2000 17: 796

[收稿日期] 2009-12-29

[修回日期] 2010-02-10

生物碱。研究结果, 其种子同样具有抗癌活性, 这对于保护小叶锦鸡儿资源具有重要的现实意义。

【参考文献】

- [1] 内蒙古革命委员会卫生局. 内蒙古中草药 [M]. 内蒙古: 内蒙古人民出版社, 1972 418.
- [2] 江苏医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1985 392.
- [3] Jin GZ, Li JD, Ahn BZ. Isoflavones from the root of *Caragana microphylla* Lam [J]. *Yakhak Hocheji* 1992, 36(5): 481
- [4] 刘红霞, 林文翰, 杨峻山. 锦鸡儿属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(5): 327.
- [5] Bhakuni DS, Chauarvedi R. The alkaloids of *Corydalis mefolia* [J]. *Journal of Natural products* 1983, 46(4): 466.
- [6] Tong SQ, Yan JZ, Lou JZ. Preparative Isolation and Purification of Alkaloids from *Corydalis yanhusuo* WT Wang by High Speed Counter-Current Chromatography [J]. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 2005 28(18): 2979.
- [7] Ikuta A, Itokawa H. Alkaloids of tissue cultures of *Nandina domestica* [J]. *Phytochemistry* 1988, 27(7): 2143.
- [8] Slavik J, Slavkova L. Alkaloids of the Papaveraceae LXV II Alkaloids from *Corydalis cava* (L.) Schw [J]. *et Koerte Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 1979 44(7): 2261
- [9] 王恒山, 杨海荣. 透裂黄堇生物碱的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 1997, 9(1): 37.
- [10] 朴惠顺, 金光洙, 张善玉. 小叶锦鸡儿对小鼠 S180肉瘤的抑制作用 [J]. *延边大学医学学报*, 2004 27(1): 16.
- [11] Sanders MM, Liu AA, Li TK, *et al* Selective cytotoxicity of topoisomerase-directed protoberberines against glioblastoma cells [J]. *Biochemical Pharmacology* 1998, 56: 1157.
- [12] Kinuko I, Yumi N, Mamoyo I *et al* Structure-activity relationships of quaternary protoberberine alkaloids having an antitumor activity [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 34 1077.
- [13] Frank R, Sternitz PL, Jeanne N, *et al* Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5-methoxyhydrocarpin—a multidrug pump inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97(4): 1433.
- [14] Lin HL, Liu TY, Wu CW. Berberine modulates expression of mdrl gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel [J]. *Br J Cancer* 1999, 81(3): 416.

[收稿日期] 2009-10-21

[修回日期] 2010-02-19