

夏枯草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究

严东^{1,2}, 谢文剑³, 李春⁴, 柏玉冰^{1,2}, 林丽美^{1,2}, 廖端芳^{1,2}, 夏伯侯^{1,2*}, 龚力民^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省中药不良成分快速检测及
脱除工程技术研究中心, 长沙 410208; 3. 安乡县中医医院, 湖南 常德 415600;
4. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究夏枯草的化学成分及其体外抗肿瘤活性。方法:运用硅胶,十八烷基硅烷键合硅胶填料(ODS),羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)等色谱方法,对夏枯草经甲醇超声提取物进行分离纯化,根据理化性质,¹H-NMR 和¹³C-NMR,并参考文献综合解析化合物结构。通过噻唑蓝(MTT)法,分别设置空白组,阳性药物组(不同浓度顺铂),不同浓度试验药物组;对化合物抗乳腺癌细胞 MCF-7,MDA-MB-231 以及对正常乳腺细胞 MCF-10A 的活性进行筛选。结果:从夏枯草中分离鉴定了 11 个化合物,分别为反式-异迷迭香酸葡萄糖苷(1),反式-迷迭香酸葡萄糖苷甲酯(2),迷迭香酸(3),迷迭香酸甲酯(4),咖啡酸-3-葡萄糖苷(5),丹参素(6),丹参素甲酯(7),3,4-二羟基苯甲醛(8),(3R,5S,6S,7E,9R)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 9-O-β-D-glucopyranoside(9),(-)-syringaresinol-4-O-13-D-glucopyranoside(10),16-氧-17-去甲基-3β,24-二羟基齐墩果-12-烯-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(11);化合物 4 对各细胞的抑制率达 88% 以上,化合物 2,8 同时对 MCF-7 和 MCF-10A 的抑制率达 60% 以上,化合物 3 仅对 MCF-7 的抑制活性达 60% 以上。结论:化合物 9,10 为首次从夏枯草中分离得到。体外抗肿瘤活性筛选表明,化合物 2~4,8 对乳腺癌细胞 MCF-7 有明显抑制作用,化合物 4 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 有较强的抑制作用;但化合物 2,4,8 同时对正常乳腺细胞也有明显抑制作用;而化合物 3 能选择性的抑制肿瘤细胞。

[关键词] 夏枯草; 化学成分; 抗肿瘤; 乳腺癌细胞

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0049-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110049

Chemical Components from *Prunellae Spica* and Their Anti-tumor Activities *in Vitro*

YAN Dong^{1,2}, XIE Wen-jian³, LI Chun⁴, BAI Yu-bing^{1,2}, LIN Li-mei^{1,2},
LIAO Duan-fang^{1,2}, XIA Bo-hou^{1,2*}, GONG Li-min^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Engineering Center for Rapid Test and Removal of Toxic and
Harmful Substances in Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

3. Anxiang County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changde 415600, China;

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the chemical components from *Prunellae Spica* and their anti-tumor activities *in vitro*. **Method:** Extracts were separated and purified by column chromatography over silica gel, octadecylsilyl (ODS), Sephadex LH-20, and the component structures were identified by physical and chemical

[收稿日期] 20150909(012)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09201019);教育部高等学校博士学科点专项科研项目(20124323120004);湖南省自然科学基金项目(13JJ4089);公益性行业科研专项(201507002);长沙市重点科技计划项目(k1406039-31);湖湘青年科技创新创业平台人才项目(2013);湖南省十二五重点学科药学学科项目

[第一作者] 严东, 硕士, 从事中药及其复方药效物质基础与机制研究, Tel:0731-88458230, E-mail: yand9005@hotmail.com

[通讯作者] *夏伯侯, 博士, 从事中药药效物质基础及新药开发研究, Tel:0731-88458230, E-mail: xiabohou@163.com;

*龚力民, 讲师, 从事中药质量评价, Tel:0731-88458234, E-mail: gonglimin1112@hotmail.com

properties and spectral methods including $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$. MTT method was used to separately establish blank group, positive drug group (different concentrations of cisplatin), and experimental drug groups at different concentrations; and measure the anti-tumor activities of these chemical components against MCF-7, MDA-MB-231 breast cancer cells and MCF-10A normal breast cell lines. **Result:** The 11 compounds were isolated and identified from the fruits of *Prunellae Spica*, and their structures were identified as: trans-salviaflaside (**1**), trans-salviaflaside methyl ester (**2**), rosmarinic acid (**3**), 3-(3, 4-dihydroxyphenyl) acrylic acid 1-(3, 4-dihydroxy-phenyl)-2-methoxycarbonylethylester (**4**), caffeic acid-3-*O*-glucoside (**5**), danshengsu (**6**), 3, 4, α -trihydroxy-mephenylpropionate (**7**), 3, 4-dihydroxybenzaldehyde (**8**), (3R, 5S, 6S, 7E, 9R)-megastigman-7-ene-3, 5, 6, 9-tetrol-9-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**9**), (-)-syringaresinol-4-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**10**), and 16-oxygen-17-demethyl-ation-3 β , 24-hydroxy oleanolic acid-12-en-3-*O*- β -*D*-glucuronic acid (**11**). Compound **4** showed an inhibitory rate over 88% against all the cells, compounds **2** and **8** showed an inhibitory rate over 60% against the cell lines MCF-7 and MCF-10A, compound **3** showed an inhibitory rate over 60% only against the MCF-7. **Conclusion:** Compounds **9** and **10** were obtained from the *Prunellae Spica* for the first time. The results of anti-tumor assay indicated that compounds **2-4** and **8** had significant inhibitory effect against breast cancer cell MCF-7, compound **4** had strong inhibitory effect against breast cancer cell MDA-MB-231; but the compounds **2, 4** and **8** also showed inhibitory effect against normal breast cell lines, and compound **3** can selectively inhibit the cancer cells.

[**Key words**] *Prunellae Spica*; chemical components; anti-tumor activities; breast cancer cells

夏枯草为唇形科夏枯草属多年生植物,是一味清火明目、软坚散结的常用中药,始载于《神农本草经》。用于目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰疬、癭瘤、乳痈、乳癖、乳房胀痛等^[1]。同时,以夏枯草为主药的中成药,如夏枯草口服液、夏枯草药膏等在治疗乳腺肿瘤等方面有良好的效果;研究表明,其提取物也表现出良好的抗肿瘤活性^[2],但其抗肿瘤的药效物质基础还不甚明确。本课题组前期研究表明,夏枯草甲醇提取部位具有良好的抗肿瘤活性^[3]。

本研究运用硅胶,十八烷基硅烷键合硅胶填料(ODS),羟丙基葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)等色谱方法,从甲醇提取部位中分离得到 11 个化合物,分别鉴定为反式-异迷迭香酸葡萄糖苷(**1**),反式-迷迭香酸葡萄糖苷甲酯(**2**),迷迭香酸(**3**),迷迭香酸甲酯(**4**),咖啡酸-3-葡萄糖苷(**5**),丹参素(**6**),丹参素甲酯(**7**),3,4-二羟基苯甲醛(**8**), (3R, 5S, 6S, 7E, 9R)-megastigman-7-ene-3, 5, 6, 9-tetrol 9-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**9**), (-)-syringaresinol-4-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**10**), 16-氧-17-去甲基-3 β , 24-二羟基齐墩果-12-烯-3-*O*- β -*D*-葡糖醛酸苷(**11**)。其中,化合物 **9, 10** 为首次从夏枯草中分离得到。进一步通过四氯唑盐还原(噻唑蓝, MTT)法,对分离得到的化合物进行体外抗肿瘤活性实验结果表明,化合物 **2~4, 8** 具有明显的抗肿瘤活性;化合物 **3** 能选择性的抑制肿瘤细胞,表现出较好的抗肿瘤活性。

1 材料

1.1 仪器 GT-2127QT 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司), RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), AV-400 型核磁共振谱仪(德国 Bruker 公司), 1100 Series LC/MSD Trap 质谱仪(美国 Agilent 公司), X4 型显微熔点仪(北京誉朗诺科技有限公司), Sephadex LH-20(美国 Pharmacia 公司), 薄层色谱硅胶预涂板(青岛海洋化工厂), ODS(50 Bin, YMC, 日本东京 Merck 公司), 柱色谱硅胶(80~100, 200~300, 300~400 目, 青岛海洋化工厂), 溶剂均为分析纯或化学纯。CJ-1F 型医用净化工作台(苏州冯氏实验动物设备有限公司), 台式低速离心机(湖南凯达实业发展有限公司), DMIL 型倒置显微镜(Leica), 3111 型 CO₂ 培养箱(Thermo), MR-96A 型酶标仪(深圳迈瑞公司)。

1.2 药物 夏枯草植物样本于 2013 年 5 月采自安徽夏枯草 GAP 基地,经湖南中医药大学刘塔斯教授和龚力民讲师共同鉴定为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris*。化合物 **1~11**(实验室自制), 阳性药顺铂(齐鲁制药,批号 130922), 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(HyClone,批号分别为 NXJ0709, NXC0582), MTT(Sigma,批号 MKBH7489V), 二甲基亚砜(DMSO, 国药集团化学试剂有限公司,批号 20120705), 胰蛋白酶(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号 04D10151)。

1.3 细胞 人乳腺癌细胞 (MCF-7, MDA-MB-231), 人正常乳腺细胞 (MCF-10A) 由中科院海洋所海洋药物实验室提供。

2 提取与分离

夏枯草 90 kg, 阴干粉碎, 加物料比 1:10 的工业甲醇浸泡 0.5 h, 超声提取 (45 min/次), 样品提取 4 次。合并 4 次提取液, 减压浓缩回收溶剂, 得到夏枯草的超声提取物 (2.13 kg)。夏枯草浓缩提取液与硅胶 (100~200 目) 拌匀后蒸干, 样品与硅胶在 1:1 左右, 最后计算得到样品净重 4 350 g。采用乙酸乙酯, 乙酸乙酯-甲醇 (20:1, 10:1, 5:1, 1:1), 甲醇依次进行洗脱, 每个梯度洗脱液为 10 L, 合并洗脱液, 减压回收有机溶媒得到各梯度样品, 分别是 Fr. A (795 g), Fr. B (325 g), Fr. C (404 g), Fr. D (246 g), Fr. E (285 g), Fr. F (甲醇)。

Fr. C 部经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 用乙酸乙酯-甲醇-水 (30:1:1, 10:1:1) 梯度洗脱, 流分 57~89 经 Sephadex LH-20, RP-18 柱色谱分离得到化合物 **4** 和 **5**, 流分 102~115 经 RP-18 柱色谱分离纯化得到化合物 **9**。Fr. D 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 用三氯甲烷-甲醇 (30:1, 10:1, 5:1, 0:1) 梯度洗脱, 得到组分 Fr. 1-Fr. 7, Fr. 2 经 RP-18 柱色谱分离得到化合物 **7** 和 **8**; Fr. 4 经 Sephadex LH-20, RP-18 柱色谱分离纯化, 得到化合物 **1** 和 **11**; Fr. 5 经 RP-18, MCI 柱色谱分离纯化, 得到化合物 **2, 3, 6**。Fr. E 经硅胶柱色谱 (200~300 目) 分离, 用二氯甲烷-甲醇 7:1 等度洗脱, 流分 36~50 经 RP-18, MCI 柱色谱分离纯化, 得到化合物 **10**。

3 结构鉴定

化合物 **1** 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 545.12 [M + Na]⁺。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.52 (1H, s, H-2), 6.86 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.25 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 7.50 (1H, d, J = 17.5 Hz, H-7), 6.41 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-2'), 6.64 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.54 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 2.94 (1H, m, Hb-7'), 2.90 (1H, m, Ha-7'), 5.04 (1H, m, H-8'), 4.73 (1H, m, H-1''), 3.30 (1H, m, H-2''), 3.47 (1H, m, H-3''), 3.16 (1H, m, H-4''), 3.30 (1H, m, H-5''), 3.49, 3.75 (2H, m, H-6'')。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 125.5 (C-1), 116.1 (C-2), 145.5 (C-3), 149.5 (C-4), 115.9 (C-5), 124.5 (C-6), 145.5 (C-7), 114.1 (C-8), 165.8 (C-9), 127.2 (C-1'), 116.6 (C-2'), 144.8 (C-3'), 144.0

(C-4'), 115.3 (C-5'), 120.0 (C-6'), 36.1 (C-7'), 73.3 (C-8'), 170.7 (C-9'), 101.7 (C-1''), 72.9 (C-2''), 77.1 (C-3''), 69.9 (C-4''), 75.9 (C-5''), 60.8 (C-6'')。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献 [3] 报道类似, 故确定为反式-异迷迭香酸苷。

化合物 **2** 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 534.9 [M - H]⁻。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.54 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.84 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 7.17 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6), 7.57 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.35 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 6.71 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.84 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.54 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 3.02 (1H, m, Ha-7'), 3.00 (1H, m, Hb-7'), 5.17 (1H, dd, J = 7.4, 5.2 Hz, H-8'), 3.68 (3H, s, OCH₃), 4.81 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1''), 3.50 (3H, m, H-2'', 3'', 5''), 3.48 (1H, m, H-4''), 3.73 (1H, m, Ha-6''), 3.97 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, Hb-6'')。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 127.8 (C-1), 117.6 (C-2), 147.3 (C-3), 152.1 (C-4), 116.3 (C-5), 126.3 (C-6), 147.0 (C-7), 118.1 (C-8), 168.1 (C-9), 128.7 (C-1'), 117.4 (C-2'), 145.3 (C-3'), 146.1 (C-4'), 115.1 (C-5'), 121.8 (C-6'), 37.8 (C-7'), 74.6 (C-8'), 172.1 (C-9'), 104.2 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.6 (C-3''), 71.5 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.5 (C-6'')。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献 [4] 报道类似, 故确定为反式-异迷迭香酸苷甲酯。

化合物 **3** 淡黄色无定形粉末 (甲醇), 1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 360。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.06 (1H, s, H-2), 6.77 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.99 (1H, d, J = 1.9, 8.3 Hz, H-6), 7.46 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.23 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-8), 6.68 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.63 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 6.52 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6'), 3.02 (1H, m, Ha-7'), 2.89 (1H, m, Hb-7'), 5.02 (1H, dd, J = 7.4, 5.2 Hz, H-8')。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 125.4 (C-1), 127.9 (C-1'), 114.9 (C-2), 116.7 (C-2'), 145.5 (C-3), 144.9 (C-3'), 148.6 (C-4), 143.9 (C-4'), 115.9 (C-5), 115.4 (C-5'), 124.0 (C-6), 121.5 (C-6'), 145.6 (C-7), 36.4 (C-7'), 113.7 (C-8), 73.5 (C-8'), 165.9 (C-9), 171.2 (C-9')。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献 [5] 报道类似, 故确定为迷迭香酸。

化合物 **4** 淡黄色粉末 (甲醇), 1% 香兰素-浓

硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 397 [M + Na]⁺。¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.08 (1H, s, H-2), 6.82 (1H, d, J = 8 Hz, H-5), 6.94 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-6), 7.56 (1H, d, J = 16 Hz, H-7), 6.28 (1H, d, J = 16 Hz, H-8), 6.74 (1H, s, H-2'), 6.71 (1H, s, H-5'), 6.57 (1H, d, J = 7.7 Hz, H-6'), 5.20 (1H, dd, J = 7.7, 5.2 Hz, H-7'), 3.05 (1H, d, J = 5.2 Hz, Ha-8'), 2.96 (1H, d, J = 7.6 Hz, Hb-8'), 3.68 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 127.4 (C-1), 115.2 (C-2), 146.6 (C-3), 149.6 (C-4), 116.5 (C-5), 123.2 (C-6), 147.9 (C-7), 114.0 (C-8), 168.3 (C-9), 121.8 (C-1'), 116.3 (C-2'), 145.1 (C-3'), 145.9 (C-4'), 117.5 (C-5'), 128.7 (C-6'), 74.5 (C-7'), 37.7 (C-8'), 172.1 (C-9'), 52.7 (OCH₃)。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[6]报道类似,故确定为迷迭香酸甲酯。

化合物5 黄色无定形粉末(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显暗红色。ESI-MS m/z 340.9 [M - H]⁻。 ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.50 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.86 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 7.15 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-6), 7.55 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7), 6.29 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-8), 4.80 (1H, d, J = 7.4 Hz, H-1'), 3.39 (1H, m, H-4'), 3.50 (3H, m, H-2', 3', 5'), 3.67 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, Ha-6'), 3.91 (1H, dd, J = 12.0, 2.1 Hz, Hb-6')。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 128.8 (C-1), 118.9 (C-2), 147.8 (C-3), 151.7 (C-4), 118.2 (C-5), 126.7 (C-6), 147.2 (C-7), 117.3 (C-8), 171.6 (C-9), 105.0 (C-1'), 75.7 (C-2'), 79.2 (C-3'), 72.2 (C-4'), 78.4 (C-5'), 63.2 (C-6')。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[5]报道类似,故确定为咖啡酸-3-葡萄糖苷。

化合物6 浅紫红片状晶体(DMSO),1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 196.8 [M - H]⁻。 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 Hz) δ : 6.66 (1H, s, H-2), 6.58 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-5), 6.45 (2H, d, J = 7.8 Hz, H-6), 3.88 (1H, s, H-8), 2.87 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-7)。 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 130.7 (C-1), 117.2 (C-2), 145.0 (C-3), 143.6 (C-4), 115.4 (C-5), 120.3 (C-6), 73.4 (C-8)。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[7]报道类似,故确定为丹参素。

化合物7 浅紫红片状晶体(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 234.9 [M +

Na]⁺。 ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 6.71 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 6.69 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5), 6.51 (1H, dd, J = 8.2, 2.5 Hz, H-6), 2.91 (1H, dd, J = 14.2, 5.4 Hz, H-7), 2.87 (1H, dd, J = 14.2, 7.4 Hz, H-7), 4.31 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-8), 3.66 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 130.6 (C-1), 118.5 (C-2), 146.7 (C-3), 145.7 (C-4), 117.1 (C-5), 122.8 (C-6), 41.9 (C-7), 73.9 (C-8), 177.0 (C-9), 53.4 (OCH₃)。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[8]报道类似,故确定为丹参素甲酯。

化合物8 柱状棕黑色晶体(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显暗红色。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[9]报道一致,故确定为3,4-二羟基苯甲醛。

化合物9 白色粉末(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。 ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 1.60 (1H, t, J = 12 Hz, H-2ax), 1.41 (1H, dd, J = 12.6, 3.6 Hz, H-2eq), 4.01 (1H, m, H-3), 1.73 (1H, m, H-4eq), 1.69 (1H, t, J = 12 Hz, H-4ax), 6.07 (1H, d, J = 15.9, 1 Hz, H-7), 5.81 (1H, dd, J = 7.4, 15.9 Hz, H-8), 4.40 (1H, m, H-9), 1.30 (3H, d, J = 6.3 Hz, CH₃-10), 1.15 (3H, s, CH₃-11), 0.83 (3H, s, CH₃-12), 1.15 (3H, s, CH₃-13), 4.32 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.77 (1H, d, J = 12 Hz, H-6'b), 3.62 (1H, d, J = 12 Hz, H-6'a)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 40.6 (C-1), 46.3 (C-2), 65.2 (C-3), 45.5 (C-4), 77.7 (C-5), 78.7 (C-6), 132.9 (C-7), 134.6 (C-8), 78.9 (C-9), 21.8 (C-10), 27.6 (C-11), 26.2 (C-12), 27.4 (C-13), 102.6 (C-1'), 75.3 (C-2'), 77.9 (C-3'), 71.8 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.7 (C-6')。 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献[10]报道类似,故确定为(3R, 5S, 6S, 7E, 9R)-megastigman-7-ene-3, 5, 6, 9-tetrol 9-*O*- β -D-glucopy-ranoside。

化合物10 黄色粉末(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显红色。ESI-MS m/z 603 [M + Na]⁺。 ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 6.70 (2H, s, H-2, 6), 6.64 (2H, s, H-2', 6'), 4.86 (1H, s, H-1''), 4.75 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-7), 4.70 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-7'), 4.24 (2H, dd, J = 16.1, 7.2 Hz, H-9'), 3.87 (2H, dd, J = 9.2, 2.7 Hz, H-9), 3.84 (6H, s, OCH₃X₂), 3.83 (6H, s, OCH₃X₂), 3.74 (1H, dd, J = 12.2, 2.3 Hz, H-6''a), 3.62 (1H, dd, J = 11.9, 5.1 Hz, H-6''b), 3.47 (1H, m, H-2''), 3.41 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-4''), 3.39 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3''), 3.16 (1H, m, H-5''), 3.12 (2H, br s, H-8, 8')。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ :

140.3 (C-1), 133.8 (C-1'), 105.5 (C-2, 6), 105.2 (C-2', 6'), 155.2 (C-3, 5), 150.1 (C-3', 5'), 136.8 (C-4'), 136.3 (C-4), 87.9 (C-7), 88.3 (C-7'), 56.5 (C-8), 56.2 (C-8'), 73.7 (C-9), 73.6 (C-9'), 57.8 (OCH₃X₂), 57.5 (OCH₃X₂), 106.0 (C-1''), 76.4 (C-2''), 78.5 (C-3''), 72.0 (C-4''), 79.1 (C-5''), 63.3 (C-6''). ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献 [11] 报道类似,故确定为 (-)-syringaresinol-4-O-β-D-glucopyranoside。

化合物 11 白色针状晶体(甲醇),1% 香兰素-浓硫酸反应显暗红色。¹H-NMR (400 MHz, Pyr) δ : 5.3 (1H, t, J = 3.3 Hz, H-12), 5.15 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 4.73 (1H, m, J = 9.6, H-5'), 4.62 (1H, dd, J = 10.9, 7.7 Hz), 4.42 ~ 4.29 (2H, m), 4.15 ~ 4.08 (1H, m), 3.65 (1H, d, J = 11.2 Hz), 3.58 (1H, dd, J = 11.1, 5.3 Hz), 2.80 (1H, ddd, J = 13.8, 6.1, 3.9 Hz), 2.57 (1H, d, J = 14.5 Hz), 2.50 (1H, t, J = 5.3 Hz), 2.22 ~ 2.11 (2H, m), 2.00 (2H, d, J = 14.4 Hz), 1.90 ~ 1.77 (2H, m), 1.69 ~ 1.58 (2H, m), 1.54 (3H, s), 1.51 ~ 1.26 (7H, m), 1.23 (3H, d, J = 8.2 Hz), 1.12 (4H, d, J = 29.6 Hz), 0.93 (1H, s), 0.87 (7H, d, J = 6.1 Hz), 0.84 (3H, s), 0.80 (3H, s), 0.75 (2H, d, J = 28.5 Hz)。¹³C-NMR (100 MHz, Pyr) δ : 213.78 (C-16), 173.11 (C-6'), 143.07 (C-13), 123.42 (C-12), 106.99 (C-1'), 89.32 (C-3), 78.57 (C-5'), 78.5 (C-3'), 75.88 (C-2'), 73.95 (C-4'), 63.70 (C-24), 56.46 (C-5), 48.16 (C-14), 47.4 (C-17), 47.4 (C-15), 47.20

(C-19), 47.20 (C-19), 45.05 (C-18), 44.78 (C-4), 40.12 (C-8), 38.80 (C-1), 37.1 (C-10), 35.21 (C-21), 33.82 (C-28), 33.7 (C-7), 31.53 (C-20), 27.45 (C-27), 27.26 (C-2), 24.26 (C-11), 23.85 (C-29), 23.71 (C-23), 21.75 (C-22), 19.23 (C-6), 17.96 (C-26), 15.66 (C-25)。¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献 [12] 报道类似,故确定为 16-氧-17-去甲基-3β, 24-二羟基齐墩果-12-烯-3-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。

4 体外抗肿瘤活性筛选

4.1 细胞培养 在 37 °C, 5% CO₂ 的饱和湿度环境下,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基传代培养 MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A 细胞。

4.2 MTT 试验 采用 MTT 法^[13] 研究从夏枯草中分离得到的化合物 1 ~ 11 对乳腺癌细胞 MCF-7, MDA-MB-231 的生长抑制作用。将细胞制成 5 × 10⁴ 个/mL 的细胞悬液,每孔 180 μL 接种于 96 孔板中;置于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后,各试验组加入不同浓度的化合物 (0.075, 0.25, 0.75, 2.5, 7.5, 25 μmol · L⁻¹),同时以顺铂 (0.075, 0.25, 0.75, 2.5, 7.5, 25 μmol · L⁻¹) 作为阳性组,每组各设 3 个平行孔,并设空白孔 (只加入溶媒) 以调零,继续培养 48 h 后,每孔加入 MTT (1 g · L⁻¹) 30 μL,置 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 4 h,弃去上清,每孔加入 DMSO 150 μL,置摇床摇匀,用酶标仪在 495 nm 下检测吸光度 A,利用 SPSS 19.0 统计软件,计算细胞死亡率,求 IC₅₀ 及不同浓度下的抑制率。生长抑制率 (IR, IR = 1 - A_{药物组} / A_{阳性组})。结果见表 1。

表 1 各化合物对乳腺癌细胞及正常乳腺细胞增殖抑制作用的影响

Table 1 Inhibitory Effects of various compounds on proliferation of breast cancer cells and normal breast cells

样品	MCF-7		MDA-MB-231		MCF-10A	
	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	E _{max} /%	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	E _{max} /%	IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	E _{max} /%
顺铂	1.008	99.6	2.147	99.0	3.771	91.7
化合物 1	>100	<50	>100	<50	>100	<50
化合物 2	54.906	82.0	>100	<50	45.735	80.5
化合物 3	83.794	61.2	>100	<50	>100	<50
化合物 4	11.284	89.3	19.077	88.5	11.928	91.6
化合物 8	24.215	80.6	>100	<50	65.714	62.8
化合物 11	>100	<50	>100	<50	>100	<50

注: E_{max} 为最大效能。

5 结果与讨论

本试验共从夏枯草中分离得到 11 个化合物,其中化合物 9, 10 为首次从夏枯草中分离得到,丰富了

夏枯草的化学成分。体外抗肿瘤活性结果表明,阳性药顺铂和化合物 4 对各细胞均有显著抑制活性,抑制率达 88% 以上;化合物 2, 3, 8 对 MCF-7 均有明

显抑制活性,抑制率达 60% 以上;但除化合物 3 外,化合物 2 和 8 还对正常乳腺细胞 MCF-10A 有明显抑制活性,抑制率达 60% 以上;说明化合物 3 对乳腺癌细胞 MCF-7 有选择性抑制作用。现代药理研究结果表明,夏枯草水提物、醇提物均表现出了良好的抗肿瘤活性^[14-16]。因此,本研究对分离得到的化合物进行体外抗肿瘤活性的筛选,结果为开展夏枯草抗乳腺癌药效物质基础的寻找与机制研究奠定基础,值得进一步探讨研究。

[参考文献]

[1] 国药药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:263.

[2] Hwang Y J, Lee E J, Kim H R, et al. *In vitro* antioxidant and anticancer effects of solvent fractions from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* [J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13(1):310.

[3] 林丽美, 许招懂, 姚江雄, 等. 夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(15):1204-1207.

[4] Zhao L M, He W Y, Liang X T, et al. Salviaflaside and salviaflaside methyl ester two new depsidic glycosides from *Salvia flava*[J]. Chinese Chem Lett, 1996, 7(5):449-452.

[5] Ha T J, Lee J H, Lee M H, et al. Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase [J]. Food Chem, 2012, 135(3):1397-1403.

[6] Lee C, Kim J, Lee H, et al. Two new constituents of *Isodon excisus* and their evaluation in an apoptosis inhibition assay[J]. J Nat Prod, 2001, 64(5):659-660.

[7] 顾晓洁, 李友宾, 李萍, 等. 夏枯草花穗化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(10):923-926.

[8] Zou Y, Tan C, Wang B, et al. Phenolic compounds from *Ranunculus chinensis* [J]. Chem Nat Compd, 2010, 46(1):19-21.

[9] Kang H S, Choi J H, Cho W K, et al. A sphingolipid and tyrosinase inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(7):742-750.

[10] Sueyoshi E, Liu H, Matsunami K, et al. Bridelionosides A-F: megastigmane glucosides from *Bridelia glauca* f. *balansae* [J]. Phytochemistry, 2006, 67(22):2483-2493.

[11] Jung M J, Kang S S, Jung H A, et al. Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrissin*[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(6):593-599.

[12] 张兰珍, 郭亚健, 涂光忠, 等. 夏枯草中的一个新三萜皂苷[J]. 药学学报, 2008, 43(2):169-172.

[13] 王永波, 徐田野. 异甘草素和 3-甲氧基异甘草素对人肝癌 Bel-7402 细胞的抗癌活性[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(6):887-888.

[14] Feng L, Jia X, Zhu M M, et al. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. *in vitro* and in tumor-bearing mice [J]. Molecules, 2010, 15(12):9145-9156.

[15] Choi J H, Han E H, Hwang Y P, et al. Suppression of PMA-induced tumor cell invasion and metastasis by aqueous extract isolated from *Prunella vulgaris* via the inhibition of NF- κ B-dependent MMP-9 expression [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(2):564-571.

[16] Feng L, Jia X B, Jiang J, et al. Combination of active components enhances the efficacy of *Prunella* in prevention and treatment of lung cancer [J]. Molecules, 2010, 15(11):7893-7906.

[责任编辑 邹晓翠]