

# 北青龙衣中茶醌类衍生物的细胞毒活性研究

刘丽娟<sup>1</sup>, 齐凤琴<sup>2</sup>, 龚显峰<sup>1</sup> (1.黑龙江大学制药工程系, 哈尔滨 150080; 2.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 目的 研究北青龙衣中茶醌类衍生物的细胞毒活性。方法 利用 MTT 法测定从北青龙衣中分离得到的 12 个茶醌类衍生物对 SMMC7721 人肝癌细胞和 MCF-7 人乳腺癌细胞的细胞毒活性。结果 12 个茶醌类衍生物中, 4-羟基茶-1-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**9**), 1,4,8-三羟基茶-1-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(**10**)和 1,4,8-三羟基茶-1-*O*- $\beta$ -D-[6'-*O*-(3",4",5"-三羟基苯甲酰)]吡喃葡萄糖苷(**11**)对 SMMC7721 人肝癌细胞显示不同程度的抑制作用, 仅 **11** 对 MCF-7 人乳腺癌细胞显示较强的细胞毒作用。结论 北青龙衣中茶醌类衍生物在其抗肿瘤活性中可能起重要作用。

**关键词:** 北青龙衣; 茶醌类衍生物; 细胞毒

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0574-04

**基金项目:** 黑龙江省科技厅青年科技创新基金(QC07C65); 黑龙江省教育厅青年基金(11531279); 哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金(2008RFQXS106); 黑龙江省博士后科研启动金(LBH-Q09031)

**作者简介:** 刘丽娟, 女, 博士, 副教授 Tel: (0451)86609936 E-mail: liulijuan1972@yahoo.com.cn

# Studies on the Cytotoxicity of Naphthoquinone Derivatives from the Fresh Rejuvenated Fruits of *Juglans mandshurica*

LIU Lijuan<sup>1</sup>, QI Fengqin<sup>2</sup>, GONG Xianfeng<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the cytotoxicity of naphthoquinone derivatives isolated from the fresh rejuvenated fruits of *J. mandshurica*. **METHODS** The cytotoxicity of 12 naphthoquinone derivatives were estimated by MTT assay against human liver SMMC 7721 cancer cells and human breast MCF-7 cancer cells. **RESULTS** Among the 12 naphthoquinone derivatives, 4-hydroxynaphthalene-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**9**), 1,4,8-trihydroxynaphthalene-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**10**) and 1,4,8-trihydroxynaphthalene-1-O- $\beta$ -D-[6'-O-(3",4",5"-trihydroxybenzoyl)] glucopyranoside (**11**) exhibited cytotoxicity against human liver SMMC 7721 cancer cells whereas only **11** showed cytotoxicity against human breast MCF-7 cancer cells. **CONCLUSION** Naphthoquinone derivatives in this plant maybe play a significant role in its antitumor activities.

**KEY WORDS:** the fresh rejuvenated fruits of *J. mandshurica*; naphthoquinone derivatives; cytotoxicity

北青龙衣为胡桃科(*Juglandaceae*)植物胡桃楸(*Juglans mandshurica* MAXIM.)的未成熟外果皮,在东北三省分布广泛,民间常用来治疗癌症、皮肤病以及作为止痛剂来应用。北青龙衣在20世纪80年代起就在临床上治疗胃癌、食管癌等消化道癌症,均取得了满意的效果<sup>[1-2]</sup>。为探讨北青龙衣的药效物质基础,笔者对其化学成分进行了初步的研究,从中分离鉴定了12个胡桃科特有的萘醌类衍生物<sup>[3-5]</sup>,并采用其中的化合物胡桃苷B为指标成分进行了含量测定的研究<sup>[6]</sup>。本试验采用MTT法测定了它们对SMMC 7721人肝癌细胞和MCF-7人乳腺癌细胞生长的抑制活性,旨在通过体外抗肿瘤实验,观察北青龙衣中的萘醌类衍生物对这2种细胞的细胞毒作用,为进一步筛选对其敏感的肿瘤细胞体系、研究化合物的构效关系、揭示其抗肿瘤的药效物质基础提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 细胞株

SMMC7721肝癌细胞株和MCF-7乳腺癌细胞株均来自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

### 1.2 药品与仪器

PU-2080制备型高效液相色谱仪(JASCO,配有Shodex RI-101示差检测器, Senshu-pak pegasil ODS色谱柱); 硅胶Kieselgel 60(E. Merck); ODS反相硅胶(日本Fuji Silysia Chemical Ltd.); AB-8型大孔树脂(天津南开大学化工厂); Sephadex LH-20(日本三菱化学公司)。Immuno-Mini NJ-2300酶标仪(日本Inter Med); 96孔平板(日本Iwaki Glass); RPMI 1640(美国GIBCO BRL, Grand Island), 噻唑蓝

(MTT)(Sigma)。化合物**1**~**12**<sup>[3-5]</sup>为本实验室自制。

北青龙衣药材于2006年采自黑龙江省五常县,经黑龙江省药品检验所何丽主管药师鉴定为胡桃科植物胡桃楸的未成熟果皮,即北青龙衣,凭证标本保存在黑龙江大学天然产物研究室。

## 2 方法

### 2.1 萘醌类衍生物的提取分离

北青龙衣(5 kg)用乙醇(10 L)浸泡3次,每次2 d,浸渍液浓缩过滤,滤液经AB-8大孔树脂柱层析(60 cm×11 cm),依次用水、30%乙醇,70%乙醇,95%乙醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂,所得的30%乙醇洗脱液蒸干(14 g),经硅胶柱色谱(34 cm×2 cm),用CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(60:30:2)洗脱后分为2个组分,组分1(4 g)经sephedax LH-20葡聚糖凝胶柱色谱,用甲醇洗脱得E(150 mg), F(1 g), G(250 mg), H(500 mg)4个组分,分别经反相高效液相色谱进行纯化(20 mm×150 mm, 5  $\mu$ m)得到**9**(30 mg), **10**(300 mg), **11**(50 mg), **12**(20 mg)。组分2(8 g)经ODS柱色谱(36 cm×2.5 cm),用40%MeOH洗脱,洗脱液分为A, B, C, D4个部分,组分A(1 g)经硅胶柱色谱,用CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(60:30:2)洗脱,得到**6**(80 mg), **7**(15 mg)。组分B(400 mg)经硅胶柱色谱,用CHCl<sub>3</sub>-MeOH(84:16)洗脱,得到**3**(10 mg), **4**(5 mg)。组分C(1 g)经硅胶柱色谱,用CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(88:12)洗脱,得到**1**(25 mg), **2**(100 mg), **5**(100 mg)。组分D(500 mg)经硅胶柱色谱,用CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O(60:30:2)洗脱,得到**8**(30 mg)。所得化合物结构见图1。

### 2.2 细胞培养和细胞毒的测定

SMMC 7721人肝癌细胞和MCF-7人乳腺癌细

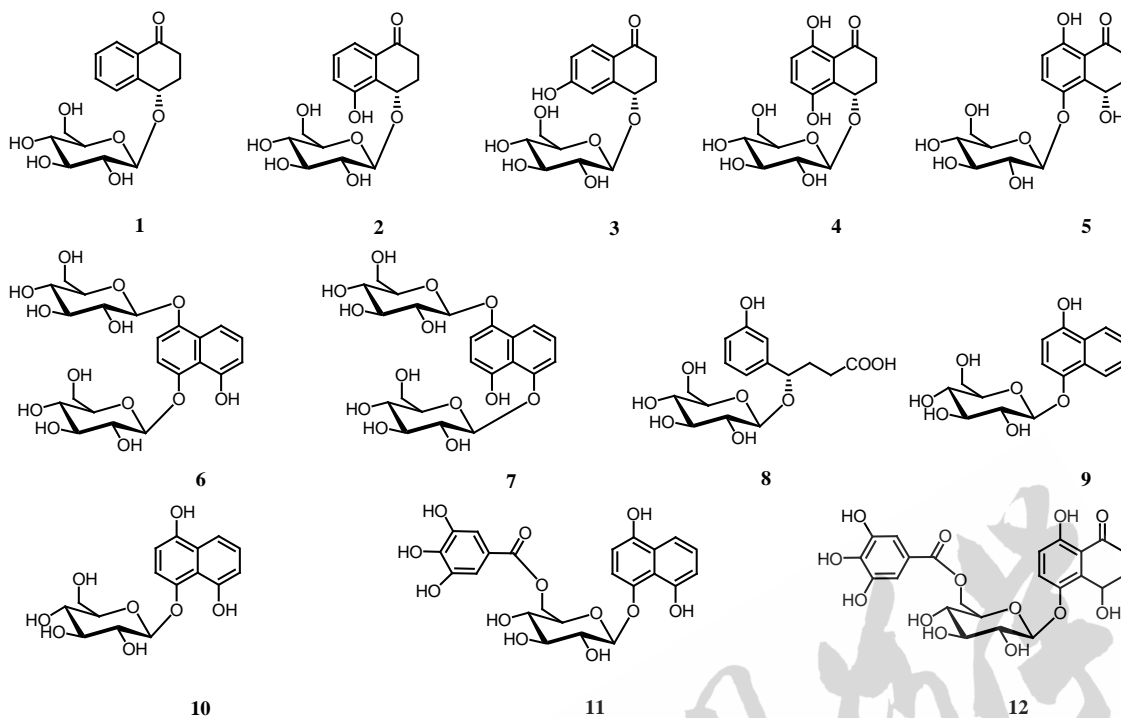


图1 从北青龙衣中分离的萘醌类衍生物

Fig 1 Naphthaquinone derivatives isolated from the fruits of *Jugans mandshurica*.

胞培养于 RPMI 1640 基质中(含有 10% *L*-谷氨酰胺的胎牛血清, 100  $\mu\text{mL}^{-1}$  盘尼西林, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素)。细胞被清洗后重新悬浮于上述介质中, 浓度为  $3\times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 取 180  $\mu\text{L}$  的细胞悬浮液置于 96 孔平板中。细胞在 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  的条件下培养 24 h。然后, 把含有样品的 20  $\mu\text{L}$  的 EtOH-H<sub>2</sub>O(1 : 9)溶液加入平板中, 使最终浓度在 1~100  $\mu\text{mol}$  之间。空白组中加入 20  $\mu\text{L}$  的 EtOH-H<sub>2</sub>O(1 : 9)溶液。细胞再继续培养 72 h, 之后采用改良 3-(4,5-二-甲基噻唑-2)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑(MTT)还原实验<sup>[7]</sup>来测定细胞的生长情况。10  $\mu\text{L}$  的 MTT 磷酸盐缓冲液(5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )加到每孔中, 细胞继续在 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 4 h, 取出后离心(1 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ )5 min 以沉淀细胞和 MTT 结晶物。离心后从每孔中取出悬浮液 150  $\mu\text{L}$ , 然后加入 175  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO)以溶解 MTT 结晶物。平板置于微型振荡器上混合 10 min, 然后置于酶标仪上在 550 nm 测定。 $T/C(\%)$ 比值通过  $T/C(\%)=(T-S)/(C-S)\times 100$ ( $T$ : 加入样品后培养 3 d 的细胞  $\text{OD}_{550}$  值;  $C$ : 未加样品只加溶剂培养 3 d 的细胞  $\text{OD}_{550}$  值;  $S$ : 只加培养基和溶剂的  $\text{OD}_{550}$  值)计算而来, 样品的浓度- $T/C(\%)$ 曲线可制成。通过  $T/C(50\%)$ 的样品的浓度为  $\text{IC}_{50}$  值。数据为 3 次实验的平均值, 每次实验同组做 3

个平板。 $\text{IC}_{50}$  被定义成抑制空白溶液 50%细胞生长所需样品的浓度。

### 3 结果与讨论

把待测的样品分成 3 组, 即 $\alpha$ -四氢萘醌糖苷组: (4*S*)-4-羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(1), (4*S*)-4,5 二羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(2), (4*S*)-4,6-二羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(3), (4*S*)-4,5,8-三羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(4)和(4*S*)-4,5,8-三羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 5-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(5), 4,5,8-三羟基- $\alpha$ -四氢萘醌 5-*O*- $\beta$ -*D*-[6'-*O*-(3'',4'',5''-三羟基苯甲酰)]吡喃葡萄糖苷(12)。萘醌苷类组: 1,4,5-三羟基萘-1,5-二-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(6), 1,4,5-三羟基萘-1,4-二-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(7), 4-羟基萘-1-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(9), 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(10), 1,4,8-三羟基萘-1-*O*- $\beta$ -*D*-[6'-*O*-(3'',4'',5''-三羟基苯甲酰)]吡喃葡萄糖苷(11); 其它芳香化合物组: 4(*R*)-羟基-4-(3'-三羟基苯基)-丁酸 4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖苷(8)。上述化合物对 SMMC7721 人肝癌细胞和 MCF-7 人乳腺癌细胞的  $\text{IC}_{50}$  值见表 1。

由表中数据可知, 在上述这些化合物中, 所有的 $\alpha$ -四氢萘醌糖苷和其他芳香化合物(1~5, 8 和 12)均对 SMMC 7721 人肝癌细胞和 MCF-7 人乳腺癌细

表 1 化合物对两种细胞的 IC<sub>50</sub> 值

Tab 1 IC<sub>50</sub> values of compounds against two cell lines

样品	SMMC 7721 人肝癌细胞	MCF-7 人乳腺癌细胞
1	100	100
2	100	100
3	100	100
4	100	100
5	100	100
6	100	100
7	100	100
8	100	100
9	86.5±19.1	100
10	88.0±5.12	100
11	62.0±2.00	52.5±16.3
12	100	100

胞没有细胞毒性, 化合物 **6**, **7** 所属的萘酚双糖苷也未显示细胞毒活性, 然而 **9~11** 所属的萘酚单糖苷对 SMMC 7721 人肝癌细胞显示了细胞毒活性, IC<sub>50</sub> 值分别为 (86.5±19.1), (88.0±5.12), (62.0±2.00) μmol·L<sup>-1</sup>, 且对 MCF-7 人乳腺癌细胞只有 **11** 显示了细胞毒活性, 而其它化合物的 IC<sub>50</sub> 值均超过 100 μmol·L<sup>-1</sup>。由此推知, 所有分离得到的萘醌类衍生物中, 只有萘酚单糖苷对 SMMC 7721 人肝癌细胞和 MCF-7 人乳腺癌细胞有细胞毒活性, 且 SMMC 人肝癌细胞可能对此类化合物更加敏感, 因此, 萘酚单糖苷类化合物可能在北青龙衣抗肿瘤的作用方面扮演重要角色。另外, 从结构上分析,

萘酚的双糖苷活性弱于单糖苷, IC<sub>50</sub> 值均超过 100 μmol·L<sup>-1</sup>, 而在萘酚单糖苷中, 化合物 **11** 显示了较强的细胞毒活性, 比较 **9~11** 的结构和活性发现, **11** 的结构中比 **9** 和 **10** 多了一个没食子酰基而活性有所增强, 这是否预示着这部分结构在活性中起重要作用, 尚需进一步的实验工作进行确证。

## REFERENCES

- [1] LI Z Y, GAO K B. Clinical observation of Qinglongyi in treatment of 120 cases of esophageal cardia cancer [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 1988, 6(3): 31.
- [2] ZHANG Y P, SU J Z, YANG Z B, et al. Studies on the antitumor effect of juglone [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 1987, 4(3): 166-168.
- [3] LIU L J, LI W, KOIKE K, et al. New tetralonyl glucosides from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(5): 566-569.
- [4] LIU L J, LI W, KOIKE K, et al. Two new naphthalenyl glucosides and a new phenylbutyric acid glucoside from the fruit of *Juglans mandshurica* [J]. Heterocycles, 2004, 63(6): 1429-1436.
- [5] LIU L J, SATO T, KOIKE K, et al. Studies on the cytotoxicity of compounds from fruits of *Juglans mandshurica* [J]. Nat Med, 2004, 58(5): 226-229.
- [6] LIU L J, GAO S Y, LI Q. Isolation of Juglanoside B from the fresh rejuvenated fruits of *Juglans mandshurica* and establishment of its content determination method [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 46-48.
- [7] SARGENT J M, TAYLOR C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. Br J Cancer, 1989, 60(2): 206-210.

收稿日期: 2009-10-26