

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.032.html>

泽漆化学成分研究

赵杰,吴繁荣,韩续,李宁,葛金芳,陈飞虎

摘要 目的 研究大戟属植物泽漆的化学成分,并对分离得到的单体化合物进行初步抗银屑病活性筛选。方法 采用硅胶、Sephadex LH-20、MCI 小孔树脂、十八烷基键和硅胶及重结晶等方法进行分离纯化,并通过波谱学技术进行结构鉴定。应用 CCK-8 法体外检测单体化合物对人角质形成细胞(HaCaT)的抑制作用,ELISA 法检测单体化合物的抗炎活性。结果 从石油醚部位和氯仿部位分离纯化得到 12 个化合物,分别为正三十一烷醇(1)、 β -谷甾醇(2)、金色酰胺醇脂(3)、槲皮素(4)、5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮(5)、山奈酚香豆酰基葡萄糖吡喃糖苷(6)、柚皮素(7)、异嗉皮啉(8)、松脂素(9)、14 α ,15 β -二乙酰氧基-3 α ,7 β -二苯甲酰基-9-氧代-2 β ,13 α -麻风树-5E,11E-二烯(10)、euphoscopin B(11)、大戟苷 I(12)。结论 其中 5,6,8,9 为首次从大戟属中分离得到。化合物 4,9,11 能较好的抑制 HaCaT 细胞增殖,同时所有单体化合物对肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 刺激的 HaCaT 细胞分泌白介素 1(IL-1) 无显著性改变,但化合物 4,5,12 能在一定程度上减少 IL-6 的分泌。

关键词 泽漆;化学成分;结构鉴定;角质形成细胞 HaCaT

中图分类号 R 284.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0383-06

泽漆(*Euphorbia helioscopia* L.)又名猫眼草、五朵云、五凤草,为大戟目大戟科一年生或两年生草本植物,分布于除新疆、西藏以外的全国各省区。泽漆味辛、苦,性微寒,全草入药,主治水气肿满、痰饮喘咳疟疾、菌痢、瘰癧、结核性瘰管、骨髓炎^[1]。研究^[2-3]表明泽漆具有抗肿瘤、抑菌杀虫、止咳平喘、抗银屑病等作用。为了阐明其抗银屑病的药效物质基础,该研究对泽漆提取物的化学成分进行了系统的分离,并观察得到的单体化合物对角质形成细胞 HaCaT 的增殖抑制作用,及对细胞分泌白介素 1(in-

terleukin-1, IL-1) 和 IL-6 的影响,为进一步开发泽漆提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药材 泽漆于夏季 6 月采自河南省巩义县,经安徽医科大学药学院中药学教研室鉴定属大戟科大戟属泽漆 *Euphorbia helioscopia* L.。

1.2 仪器与试剂 AM-300、400, DRX-500 型核磁共振光谱仪(瑞士 Bruker 公司,四甲基硅烷作为内标);Sephadex LH-20(瑞典 GEHealthcare Bio-Sciences 公司);MCI 小孔树脂(日本 Mitsubishi Chemical 公司);十八烷基键合硅胶(octadecylsilyl, ODS, 日本 Fujisilysia Chemical 公司);硅胶(青岛海洋化工厂);薄层色谱 GF254 硅胶板板(烟台江友硅胶开发有限公司);氘代试剂(美国 Sigma-aldrich 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone);CCK-8 试剂盒(上海贝博生物);ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.3 方法

1.3.1 提取分离 取泽漆阴干药材 15 kg,倒入提取罐,加 90% 的乙醇溶液 80 L,蒸汽加热至 60 $^{\circ}\text{C}$,在该温度条件下浸泡 24 h,浸泡液经旋转蒸发仪蒸干溶剂,得到总提物浸膏,并重复提取 4 次。合并 4 次所得总提物浸膏 1.14 kg。加水混悬后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,萃取液浓缩至干,得到石油醚部位(Fra),氯仿部位(Frb),乙酸乙酯部位(Frc)和正丁醇部位(Frd)。石油醚部位 Fra(120 g)经硅胶柱色谱(石油醚-乙酸乙酯 50:1~0:1)梯度洗脱得到 8 个部分,Fra-1~Fra-8。Fra-4 经过 Sephadex LH-20(石油醚-氯仿-甲醇 10:10:1)、中低压柱色谱(石油醚-丙酮 20:1)、反复硅胶柱色谱以及重结晶的方法进一步分离和纯化,得到化合物 1(277 mg),10(55 mg),2(135 mg)。Fra-6 经中低压柱色谱(石油醚-丙酮 15:1)得到 6 个部分,Fra-6-1~Fra-6-6。Fra-6-2 经 Sephadex LH-20、反复硅胶柱色谱,得到化合物 11(34 mg)。Fra-6-6 经反复硅胶柱色谱得到化合物 12(28 mg)。氯仿部位 Frb(250 g)经硅胶柱色谱(石油醚-丙酮 60:1

2016-01-08 接收

基金项目:2015 年中医药行业科研专项(编号:201507002)

作者单位:安徽医科大学药学院、安徽天然药物活性研究省级实验室,合肥 230032

作者简介:赵杰,男,硕士研究生;

陈飞虎,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:cfchina@sohu.com;

吴繁荣,男,副教授,讲师,责任作者,E-mail:aydwfr@163.com

~0:1) 梯度洗脱得到 9 个部分, Frb-1 ~ Frb-9。Frb-5 经硅胶柱(石油醚-丙酮 10:1 ~ 0:1) 得到 5 个部分, Frb-5-1 ~ Frb-5-5, 其中 Frb-5-3 经 Sephadex LH-20(纯乙醇), 硅胶柱, ODS-C18 柱色谱进一步分离纯化, 得到化合物 8(10 mg)。Frb-8 经硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 50:1 ~ 0:1) 得到 8 个部分, Frb-8-1 ~ Frb-8-9。Frb-8-3 经 Sephadex LH-20(30% ~ 100% 甲醇)、MCI(0 ~ 100% 甲醇) 以及反复硅胶柱色谱得到化合物 9(8 mg)。Frb-8-3 经 Sephadex LH-20(30% ~ 100% 甲醇)、MCI(0 ~ 100% 甲醇) 以及反复硅胶柱色谱得到化合物 3(25 mg), 7(15 mg)。Frb-8-8 经 Sephadex LH-20(30% ~ 100% 甲醇)、MCI(0 ~ 100% 甲醇) 以及反复硅胶柱色谱得到化合物 6(23 mg), 5(15 mg), 4(31 mg)。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制作用 取对数期的 HaCaT 细胞以 4×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 边缘孔用 PBS 填充, 空白对照组加入等体积的培养基不接种细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 空白对照组加等体积的培养基, 药物组加入等体积不同浓度的药物(药物终浓度为 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$), 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 吸弃培养基, 药物组加入等体积不同浓度的药物, 空白对照组加等体积的培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 24 h 后每孔加入 10 μl CCK-8, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 3 h 后, 震荡数分钟后用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光度值。

1.3.3 ELISA 法检测 IL-6、IL-8 含量 取对数期的 HaCaT 细胞, 以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 空白对照组加入等体积的培养基不接种细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h, 待细胞贴壁后, 加入 10 ng/ml 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) 溶液刺激, 继续培养 12 h 后, 药物组加入等体积不同浓度的药物(药物终浓度为 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 其中槲皮素作为阳性对照组。培养 24 h 后, 吸取各孔上清液, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 计量资料用表示。组间比较采用单因素 ANOVA 方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验。

2 结果

2.1 结构鉴定 化合物 1: 白色胶状物, 分子式 C₃₁

H₆₄O, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-1), 1.54 (m, 2H, H-2), 1.25 (m, 56H, H-3 ~ 29), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, ³H, H-31)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 63.10 (C-1), 32.83 (C-2), 31.93 (C-3), 29.70 到 29.80 (C-4 ~ 22) 是 1 个大峰, 29.66 (C-25), 29.61 (C-26), 29.44 (C-27), 29.36 (C-28), 25.74 (C-29), 22.68 (C-30), 14.09 (C-31)。以上数据与文献^[4] 对比, 确定化合物 1 为正三十一烷醇。

化合物 2: 白色针状结晶, 分子式为 C₂₉H₅₀O。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.35 (d, J = 4.8 Hz, ¹H), 3.52 (m, 1H), 1.00 (s, ³H), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, ³H), 0.82 (m, ⁹H), 0.68 (s, ³H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 140.90 (C-5), 121.86 (C-6), 71.95 (C-3), 56.92 (C-14), 56.21 (C-17), 50.29 (C-9), 45.99 (C-24), 42.47 (C-13), 42.44 (C-4), 39.93 (C-12), 37.41 (C-1), 36.65 (C-10), 36.30 (C-20), 34.10 (C-22), 32.06 (C-7), 31.80 (C-2), 31.80 (C-8), 29.30 (C-25), 28.40 (C-16), 26.23 (C-23), 24.45 (C-15), 23.22 (C-28), 21.23 (C-11), 19.96 (C-26), 19.54 (C-19), 19.18 (C-27), 18.93 (C-21), 12.13 (C-29), 12.01 (C-18)。以上数据与文献^[5] 对比, 确定化合物 2 为 β -谷甾醇。

化合物 3: 白色针状结晶, 分子式为 C₂₇H₂₈N₂O₄。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (d, J = 8.5 Hz, ²H, H-3', 7'), 7.52 (t, J = 7.4 Hz, ¹H, H-5'), 7.44 (t, J = 7.7 Hz, ²H, H-3', 7'), 7.17 (d, J = 6.8 Hz, ¹H), 7.13 (dd, J = 14.3, 7.4 Hz, ²H), 7.06 (d, J = 7.2 Hz, ²H, H-4'', 8''), 6.81 (d, J = 7.6 Hz, ¹H, -NH), 6.07 (d, J = 8.5 Hz, ¹H, -NH), 4.78 (dd, J = 14.1, 7.9 Hz, ¹H, H-2), 4.35 (m, ¹H, H-1''), 3.92 (dd, J = 11.3, 4.9 Hz, ¹H, H-9''a), 3.82 (dd, J = 11.3, 4.2 Hz, ¹H, H-9''b), 3.22 (dd, J = 13.7, 5.9 Hz, ¹H, H-3a), 3.06 (dd, J = 13.7, 8.4 Hz, ¹H, H-3b), 2.74 (m, ²H, H-2''), 2.02 (s, ³H, -COCH₃)。 ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170.92 (-COCH₃), 170.38 (C-1), 167.24 (C-1'), 136.81 (C-4), 136.71 (C-3''), 133.75 (C-2'), 132.05 (C-5'), 129.41 (C-6, 8), 129.24 (C-5'', 7''), 128.86 (C-4'', 8''), 128.76 (C-5, 9), 128.70 (C-3', 7'), 127.26 (C-7), 127.18 (C-4', 6'), 126.86 (C-6''), 64.71 (C-9''), 55.10 (C-2), 49.55 (C-1''), 38.58 (C-3), 37.55 (C-2''), 20.95 (-COCH₃)。以上数据与文献^[6] 对比, 确定化合物 3 为金色酰胺醇酯。

化合物 4: 黄色粉末, 分子式为 C₁₅H₁₀

O_7 。 1H NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ 7.80 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H , H-2'), 7.65 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H , H-6'), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H , H-5'), 6.50 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H , H-8), 6.23 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H , H-8)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3COCD_3) δ 176.12 (C-4), 164.92 (C-7), 162.05 (C-9), 157.36 (C-5), 148.42 (C-4'), 146.72 (C-2), 145.95 (C-3'), 136.17 (C-3), 123.47 (C-1'), 121.32 (C-6'), 116.09 (C-5'), 115.58 (C-2'), 103.77 (C-10), 98.83 (C-6), 94.10 (C-8)。以上数据与文献^[5]对比,确定化合物4为槲皮素。

化合物5:黄色粉末,分子式 $C_{17}H_{14}O^5$ 。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.68 (s, 1H , OH-5), 7.91 (dd, $J = 20.4, 7.3$ Hz, 2H , H-2', 6'), 7.54 (m, 3H , H-3', 4', 5'), 6.67 (s, 1H , H-8), 6.57 (s, 1H , H-3), 3.96 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H , CH_3O-6), 3.93 (s, 3H , CH_3O-7)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182.74 (C-4), 163.98 (C-7), 158.93 (C-2), 153.34 (C-9), 153.04 (C-5), 132.72 (C-6), 131.85 (C-4'), 131.31 (C-1'), 129.11 (C-3', 5'), 126.26 (C-2', 6'), 106.31 (C-10), 105.62 (C-3), 90.67 (C-8), 60.86 (CH_3O-7), 56.34 (CH_3O-6)。以上数据与文献^[7]对比,确定化合物5为5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮。

化合物6:淡黄色粉末,分子式为 $C_{30}H_{26}O_{13}$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.91 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H , H-2', 6'), 7.32 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H , H-2'', 6''), 6.73 (t, $J = 8.6$ Hz, 4H , H-3', 5', 3'', 5''), 6.22 (s, 1H , H-8), 6.05 (s, 1H , H-6), 5.99 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H , H-8''), 5.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H , H-1''), 4.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H , H-6''b), 4.11 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 1H , H-6''a), 3.2-3.4 (m, 4H , H-2'', H-3'', 4'', 5'')。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) δ 177.83 (C-4), 167.29 (C-9'''), 164.79 (C-7), 161.43 (C-5), 160.00 (C-4'), 159.68 (C-4'''), 157.79 (C-2), 156.92 (C-9), 145.04 (C-7'''), 133.68 (C-3), 130.69 (C-2', 6'), 129.67 (C-2''', 6'''), 125.57 (C-1'''), 121.21 (C-1'), 115.28 (C-3''', 5'''), 114.53 (C-3', 5'), 113.22 (C-8'''), 103.98 (C-10), 102.50 (C-1''), 98.60 (C-6), 93.41 (C-8), 76.50 (C-5''), 74.29 (C-2''), 74.21 (C-3''), 70.21 (C-4''), 62.80 (C-6'')。以上数据与文献^[8]对比,确定化合物6为山奈酚香豆酰基葡萄糖吡喃糖苷。

化合物7:淡黄色粉末,分子式 $C_{15}H_{12}O_5$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ 12.18 (s, 1H), 7.40 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 2H , H-2', H-6'),

6.90 (dd, $J = 2.1, 8.5$ Hz, 2H , H-3', H-5'), 5.96 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H , H-6, H-8), 5.46 (dd, $J = 12.9, 2.7$ Hz, 1H , H-2), 3.19 (dd, $J = 17.1, 12.9$ Hz, 1H , H-3a), 2.73 (dd, $J = 17.1, 3.0$ Hz, 1H , H-3b), 2.15 (s, 1H), 2.09 (s, 1H), 2.05 (dd, $J = 4.2, 2.1$ Hz, 2H), 1.29 (s, 2H), 1.21 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3COCD_3) δ 197.27 (C-4), 167.37 (C-7), 165.32 (C-5), 164.40 (C-9), 158.73 (C-4'), 130.81 (C-1'), 129.04 (C-2', C-6'), 116.19 (C-3', C-5'), 103.24 (C-10), 96.83 (C-6), 95.86 (C-8), 79.96 (C-2), 43.51 (C-3)。以上数据与文献^[9]对比,确定化合物7为柚皮素。

化合物8:淡黄色粉末, $C_{11}H_{10}O_5$ 。 1H NMR (400 MHz, CD_3COCD_3) δ 8.60 (s, 1H , OH-7), 7.84 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H , H-4), 6.99 (s, 1H , H-5), 6.20 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H , H-3), 3.94 (s, 3H , CH_3O-8), 3.89 (s, 3H , CH_3O-8)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3COCD_3) δ 160.82 (C-2), 146.40 (C-6), 145.11 (C-4), 144.82 (C-7), 144.45 (C-9), 135.77 (C-8), 113.47 (C-3), 111.71 (C-10), 105.09 (C-5), 61.32 (CH_3O-8), 56.77 (CH_3O-6)。以上数据与文献^[10]对比,确定化合物8为异嗟皮啉。

化合物9:棕黄色粉末,分子式为 $C_{20}H_{22}O_6$ (358)。 1H NMR (600 MHz, CD_3COCD_3) δ 6.99 (s, 2H , H-2, 2'), 6.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H , H-6, 6'), 6.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H , H-5, 5'), 4.67 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H , H-7, 7'), 4.20 (dd, $J = 8.4, 6.7$ Hz, 2H , H-9a, 9a'), 3.84 (s, 6H, $2 \times OCH_3$), 3.80 (dd, $J = 8.9, 2.9$ Hz, 2H , H-9b, 9b'), 3.08 (m, 2H , H-8, 8')。 ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3COCD_3) δ 148.30 (C-3, 3'), 146.84 (C-4, 4'), 134.13 (C-1, 1'), 119.59 (C-6, 6'), 115.51 (C-5, 5'), 110.55 (C-2, 2'), 86.62 (C-7, 7'), 72.19 (C-9, 9'), 56.21 ($3, 3'-OCH_3$), 55.22 (C-8, 8')。以上数据与文献^[11]对比,确定化合物9为松脂素。

化合物10:无色针状结晶,分子式为 $C_{38}H_{44}O_9$ 。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H , H-2', 6'), 7.57 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H , H-2'', 6''), 7.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H , H-4'), 7.31 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H , H-4''), 7.27 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H , H-3', 5'), 6.97 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H , H-3'', 5''), 5.95 (s, 1H , H-14), 5.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H , H-5), 5.70 (dd, $J = 11.2, 3.7$ Hz, 1H , H-7a), 5.39 (d, $J = 16.05$ Hz, 1H , H-11a), 5.22 (dd, $J = 16.0, 8.9$ Hz, 1H , H-12), 5.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H , H-3), 3.34 (d, $J = 13.61$ Hz, 1H , H-8a), 3.29 (d, $J = 6.89$ Hz, 1H , H-4), 3.00 (dd, $J =$

15.4, 8.3 Hz, ^1H , H-1a), 2.85 (dd, $J = 15.7, 3.7$ Hz, ^1H , H-8b), 2.47 (m, ^1H , H-13), 2.21 (s, ^3H , -COCH₃-14), 2.17 (s, ^3H , -COCH₃-15), 1.95 (s, ^3H , H-17), 2.13 (m, ^1H , H-2a), 1.50 (dd, $J = 15.4, 7.8$ Hz, ^1H , H-1b), 1.31 (s, ^3H , H-19), 1.14 (s, ^3H , H-18), 1.09 (d, $J = 7.1$ Hz, ^3H , H-16), 0.93 (d, $J = 7.0$ Hz, ^3H , H-20)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃) δ 207.52 (C-9), 170.04 (-COCH₃-14), 169.99 (-COCH₃-14), 165.89 (OBz-7), 165.42 (OBz-7), 135.48 (C-6), 133.69 (C-11), 133.67 (C-12), 132.67 (C-4'), 132.38 (C-4''), 130.44 (C-1'), 129.91 (C-1''), 129.31 (C-2', 6'), 129.23 (C-2'', 6''), 128.21 (C-3', 5'), 127.94 (C-3'', 5''), 122.73 (C-5), 92.43 (C-15), 84.28 (C-3), 75.61 (C-14), 74.18 (C-7), 49.13 (C-10), 44.02 (C-4), 43.60 (C-1), 42.82 (C-8), 38.00 (C-13), 37.82 (C-2), 25.47 (C-18), 24.94 (C-19), 22.88 (C-20), 22.06 (-COCH₃-14), 21.01 (-COCH₃-15), 19.27 (C-16), 18.81 (C-17)。以上数据与文献^[12]对比, 确定化合物 10 为 14 α , 15 β -二乙酰氧基-3 α , 7 β -二苯甲酰基-9-氧代-2 β , 13 α -麻风树-5E, 11E 二烯。

化合物 11: 无色针状结晶, 分子式为 C₃₃H₄₄O₉。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.99 (m, ^2H , H-2', 6'), 7.54 (t, $J = 7.4$ Hz, ^1H , H-4'), 7.43 (t, $J = 7.6$ Hz, ^2H , H-3', 5'), 5.93 (s, ^1H , H-14), 5.66 (m, ^1H , H-5), 5.39 (dd, $J = 11.3, 3.6$ Hz, ^1H , H-7), 5.35 (d, $J = 6.3$ Hz, ^1H , H-11), 5.20 (dd, $J = 6.9, 3.5$ Hz, ^1H , H-3), 5.17 (dd, $J = 12.9, 5.6$ Hz, ^1H , H-12), 3.26 (t, $J = 8.0$ Hz, ^1H , H-4), 3.15 (dd, $J = 15.8, 11.6$ Hz, ^1H , H-8), 2.98 (dd, $J = 15.2, 8.0$ Hz, ^1H , H-1a), 2.68 (dd, $J = 15.8, 4.4$ Hz, ^1H , H-8b), 2.44 (m, ^1H , H-2), 2.23 (s, ^3H , -COCH₃-15), 2.18 (m, ^3H , -COCH₃-14), 1.86 (d, $J = 0.8$ Hz, ^3H , H-17), 1.43 (dd, $J = 15.2, 9.2$ Hz, ^1H , H-1b), 1.26 (s, ^3H , -COCH₃-7), 1.24 (s, ^3H , H-19), 1.11 (dd, $J = 10.3, 5.7$ Hz, ^3H , H-18, H-20), 0.92 (d, $J = 7.1$ Hz, ^3H , H-16)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃) δ 207.54 (C-9), 170.29 (-COCH₃-14), 170.07 (-COCH₃-15), 170.02 (-COCH₃-7), 165.39 (OBz-3), 135.84 (C-6), 133.67 (C-11), 133.66 (C-4'), 132.80 (C-12), 130.70 (C-1'), 129.51 (C-2', 6'), 128.32 (C-3', 5'), 122.64 (C-5), 92.28 (C-15), 83.33 (C-3), 75.33 (C-14), 73.40 (C-7), 49.00 (C-10), 44.20 (C-4), 43.07 (C-1),

42.92 (C-8), 37.73 (C-2), 37.69 (C-13), 25.27 (C-18), 24.93 (C-19), 23.02 (C-20), 22.06 (-COCH₃-15), 21.01 (-COCH₃-14), 20.08 (-COCH₃-7), 18.90 (C-16), 18.85 (C-17)。以上数据与文献^[13]对比, 确定化合物 11 为 euphoscopin B。

化合物 12: 无色针状结晶, 分子式为 C₃₃H₄₄O₉。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (m, ^2H), 7.53 (t, $J = 7.3$ Hz, ^1H), 7.45 (t, $J = 7.4$ Hz, ^2H), 7.28 (s, ^1H), 5.73 (t, $J = 12.3$ Hz, ^1H), 5.64 (dd, $J = 15.6, 9.3$ Hz, ^1H), 5.43 (t, $J = 3.9$ Hz, ^1H), 5.06 (d, $J = 15.6$ Hz, ^1H), 4.94 (m, ^2H), 4.77 (t, $J = 3.3$ Hz, ^1H), 2.88 (dt, $J = 18.3, 9.1$ Hz, ^1H), 2.58 (dd, $J = 21.1, 14.3$ Hz, ^1H), 2.23 (s, ^3H), 1.95 (m, ^3H), 1.73 (s, ^3H), 1.18 (s, ^3H), 0.97 (m, ^9H), 0.89 (s, ^3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃) δ 171.22, 169.63, 169.09, 165.63 (-C=O $\times 4$), 138.15 (C-5), 133.79 (C-6), 132.82 (C-4'), 130.16 (C-1'), 129.78 (C-3', 5'), 128.69 (C-11), 128.47 (C-2', 6'), 120.04 (C-12), 83.76 (C-15), 80.96 (C-3), 80.73 (C-7), 73.57 (C-9), 72.92 (C-14), 47.83 (C-13), 46.22 (C-8), 39.64 (C-10), 39.46 (C-4), 36.69 (C-2), 32.42 (C-1), 22.61, 21.07, 20.99 (-COCH₃ $\times 3$), 20.22 (C-20), 19.84 (C-19), 19.43 (C-18), 16.14 (C-17), 13.49 (C-16)。以上数据与文献^[14]对比, 确定化合物 12 为 euphornin I。

2.2 化合物对 HaCaT 增殖的影响 利用 CCK-8 法检测分离得到的单体化合物对角质形成细胞 HaCaT 增殖的影响, 比较各化合物的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 以维 A 酸作为阳性对照药。结果显示, 化合物 1、4、5、7、8、9、11、12 有一定的抑制 HaCaT 细胞增殖的能力 (表 1)。其中化合物 4、9、11 的抑制作用接近阳性药维 A 酸 (52.67 $\mu\text{mol/L}$)。

表 1 单体化合物对 HaCaT 细胞的抑制效应的 IC₅₀ 值 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

化合物	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
1	147.67 \pm 16.58
3	>200
4	56.21 \pm 8.52
5	149 \pm 8.94
6	>200
7	151.64 \pm 19.34
8	99.78 \pm 15.54
9	65.42 \pm 6.34
10	>200
11	61.68 \pm 9.87
12	137.13 \pm 10.70
维 A 酸	52.67 \pm 5.94

表2 单体化合物对 TNF- α 刺激的 HaCaT 细胞生成 IL-1 和 IL-6 生成的抑制作用 ($n=3, x \pm s$)

化合物	IL-1 (ng/L)			IL-6 (ng/L)		
	100 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$	100 $\mu\text{mol/L}$	50 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$
1	55.00 \pm 1.29	57.05 \pm 1.32	58.30 \pm 2.09	29.14 \pm 2.63 *	29.79 \pm 1.92 *	32.86 \pm 0.81
2	53.64 \pm 19.93	73.42 \pm 16.4	60.34 \pm 1.77	27.71 \pm 1.01 *	29.86 \pm 1.21 *	32.16 \pm 1.61 *
3	49.77 \pm 2.89	50.80 \pm 1.77	52.84 \pm 4.66	28.93 \pm 3.74 *	30.39 \pm 1.19	34.29 \pm 0.40
5	55.00 \pm 0.32	54.20 \pm 5.30	59.66 \pm 1.77	24.79 \pm 1.31 *	25.43 \pm 1.21 *	28.43 \pm 0.61 *
6	57.84 \pm 15.6	56.59 \pm 2.41	56.25 \pm 2.41	25.79 \pm 0.31 *	26.64 \pm 2.12 *	31.64 \pm 0.91
7	53.18 \pm 2.90	54.09 \pm 6.75	56.48 \pm 2.09	27.21 \pm 1.31 *	27.50 \pm 0.51 *	33.71 \pm 2.22
8	57.73 \pm 5.46	60.68 \pm 4.50	55.91 \pm 1.93	28.00 \pm 1.82 *	28.29 \pm 5.86	29.43 \pm 0.61
9	57.16 \pm 1.77	53.19 \pm 3.86	56.25 \pm 1.47	26.29 \pm 4.24 *	30.64 \pm 0.71	31.57 \pm 4.45
11	67.05 \pm 7.07	71.36 \pm 18.9	56.59 \pm 3.54	26.93 \pm 1.72 *	28.50 \pm 0.31 *	30.64 \pm 1.92
12	59.20 \pm 3.05	64.66 \pm 11.4	87.16 \pm 28.77	26.07 \pm 2.73 *	26.43 \pm 1.62 *	30.14 \pm 2.22
槲皮素	57.38 \pm 1.45	57.50 \pm 0.64	52.27 \pm 4.18	25.86 \pm 4.75 *	26.64 \pm 4.75 *	29.93 \pm 0.51 *

与模型组 (IL-1: 61.36 \pm 2.58, IL-6: 35.81 \pm 1.19) 比较: * $P < 0.05$

2.3 化合物对 TNF- α 刺激的 HaCaT 细胞分泌细胞因子的影响

对分离得到的单体化合物进行抗炎活性筛选,采用 ELISA 法测定 TNF- α 刺激的 HaCaT 细胞上清液中 IL-1 和 IL-6 的含量,以化合物 4 槲皮素作为阳性对照药。结果显示,化合物对 TNF- α 刺激的 HaCaT 细胞 IL-1 分泌量差异无统计学意义,但能在一定程度上减少 IL-6 的分泌,同时化合物 5、12 减少 IL-6 的产生最为明显(表 2)。

3 讨论

银屑病是一种以皮肤角质形成细胞过度增殖为病理特征的炎症性皮肤病,其发病机制至今尚不清楚。局部浸润的炎细胞和表皮角质形成细胞通过分泌 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和干扰素- γ 等细胞因子,在银屑病发生过程中起重要作用^[15]。泽漆是大戟属植物,主要化学成分包括二萜酯类、黄酮类、三萜、甾醇和多酚类化合物。临床上有将泽漆制成针剂、胶囊剂用于银屑病患者的治疗,并且有确切的疗效^[3]。但其治疗银屑病的具体成分尚不明确。本文从传统的天然产物分离手段入手,分离得到 12 个化合物,其中 5、6、8、9 为首次从属内发现,主要为黄酮类和萜类化合物。对化合物进行初步抗银屑病活性筛选,结果显示,化合物 4、9、11 能较好的抑制 HaCaT 的增殖,同时所有单体化合物对 TNF- α 刺激活化的 HaCaT 细胞分泌的 IL-1 无显著性改变,但 4、5、12 能在一定程度上减少 IL-6 的分泌。

然而,泽漆其余部分的化学成分仍然未知,因此还需进一步的分离和筛选抗银屑病化合物,得到一些活性更好的化合物,为明确泽漆抗银屑病药效提供物质基础。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社,1977;1464-5.
- [2] 杨莉,陈海霞,高文远. 泽漆化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2007,38(10):1585-9.
- [3] 盛仲灵,顾乃芳,吴季庄,等. 泽漆治疗银屑病的探讨[J]. 安徽医学,1980,1:45-7.
- [4] 李林珍,杨小生,朱海燕,等. 假地蓝化学成分研究[J]. 中草药,2008,39(2):173-5.
- [5] 杨莉,陈海霞,高文远. 泽漆化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(4):575-7.
- [6] 焦威,鲁璐,邓美彩,等. 千金子化学成分的研究[J]. 中草药,2010,41(2):181-7.
- [7] 陈海永,周长新,楼宜嘉,等. 四方蒿化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(20):1589-90.
- [8] Aderogba M A, McGaw L J, Bezabih M, et al. Isolation and characterisation of novel antioxidant constituents of Croton zambesicus leaf extract. [J]. Nat Prod Res, 2011, 25(13):1224-33.
- [9] 潘维荣,杜晨晖,闫艳. 泽漆化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):118-21.
- [10] 龚婧如,王书芳. 刺五加的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(12):2337-41.
- [11] 钟金栋,李艳平,李洪梅,等. 毛叶巴豆的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2013,25(12):1658-61.
- [12] Liu C, Liao Z X, Liu S J, et al. Two new diterpene derivatives from Euphorbia lunulata Bge and their anti-proliferative activities[J]. Fitoterapia, 2014, 96:33-8.
- [13] Tao H W, Hao X J, Liu P P, et al. Cytotoxic macrocyclic diterpenoids from Euphorbia helioscopia. [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(12):1547-51.
- [14] Chen H, Wang Z, Yang L. Analysis of euphorbin in Euphorbia helioscopia L and its cytotoxicity to mice lung adenocarcinoma cells (LA795)[J]. Nat Prod Res, 2012, 26(22):2112-6.
- [15] Griffiths C E, Barker J N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis[J]. Lancet, 2007, 370(9583):263-71.

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.034.html>

◇ 临床医学研究 ◇

CD11c 和 MHC-Ⅱ 在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的相关性

张楠楠, 石海, 许建明, 胡乃中

摘要 **目的** 探讨树突状细胞(DCs)的数量及成熟情况在肝细胞性肝癌(简称肝癌)中的表达及其与肝癌微血管密度(MVD)的相关性。**方法** 收集 50 例肝癌患者术后癌组织及癌旁组织标本,并通过免疫组化方法检测石蜡切片中 DCs 特异性标志 CD11c、MVD 标志 CD34 以及 DCs 成熟标志的主要组织相容性复合物Ⅱ类分子(MHC-Ⅱ)的表达情况并进行相关分析。**结果** 癌组织中 CD11c 和 MVD 明显高于癌旁组织($P < 0.01$);癌组织中 MHC-Ⅱ明显低于癌旁组织($P < 0.01$)。MVD 与 MHC-Ⅱ呈负相关性($r = -0.480$, $P < 0.01$),而与 CD11c 则无明显相关性。癌组织中各项指标的表达与肝癌的转移、TNM 分期存在相关性($P < 0.05$)。**结论**

肝癌组织中 CD11c、MHC-Ⅱ的表达与肝癌的转移及 TNM 分期密切相关;MVD 的高表达与浸润性 DCs 的成熟度呈负相关性,提示增加 DCs 的成熟度可能成为肝癌抗血管治疗

的潜在靶点之一。

关键词 肝细胞癌;树突状细胞;肿瘤微血管;主要组织相容性复合物Ⅱ类分子;免疫组化

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0388-05

肝细胞癌(简称肝癌)是我国常见的恶性肿瘤之一,其临床病死率高,治疗效果差,易复发与转移是影响肝癌患者预后的首要因素^[1]。因肝癌是典型的多血管肿瘤,在其生长与转移中离不开肿瘤血管提供的营养物质及氧气。肝癌组织中微血管密度(microvascular density, MVD)直接反映了血管生成情况。树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为机体最强的一类抗原提呈细胞,广泛的分布于皮肤、黏膜、呼吸道、消化道等机体组织中,其最大特点是能有效地刺激静息型 T 淋巴细胞、诱发初次免疫应答的独特功能,在机体抗肿瘤免疫中处于中心地位。DCs 分为成熟 DC(mature dendritic cell, mDC)和未成熟 DC(imature dendritic cell, imDC)^[2]。imDC 能诱

2015-12-08 接收

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(编号:1308085MH147)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:张楠楠,女,硕士研究生;

石海,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail:shmdah@163.com

Study on chemical constituents of *Euphorbia helioscopia* L.

Zhao Jie, Wu Fanrong, Han Xu, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Anhui Key Laboratory of Bioactivity of Natural Products, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To investigate the chemical constituents of *Euphorbia helioscopia* L. and their anti-psoriasis activities. **Methods** The separation and purification of constituents were performed by silica gel, Sephadex LH-20, MCI, ODS-C18 and recrystallization. Their structures were elucidated spectroscopic methods. The effects of these constituents on HaCaT Cell proliferation were measured by CCK-8 assay. And their anti-inflammatory effects were measured by ELISA. **Results** Twelve compounds were isolated and their structures were identified as 1-hentriacontanol(1), β -sitosterol(2), aurantiamide acetate(3), quercetin(4), 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone(5), tiliroside(6), naringenin(7), isofraxidin(8), pinoselinol(9), 14 α , 15 β -diacetoxy-3 α , 7 β -dibenzoyloxy-9-oxo-2 β H, 13 α H-jatropha-5E, 11E-diene(10), euphoscopin B(11), euphornin I(12). **Conclusion** Compounds 5, 6, 8, 9 were isolated from this genus for the first time. Compounds 4, 9, 11 were potent inhibitors against HaCaT cells *in vitro* and compounds 4, 5, 12 were capable of decreasing IL-6 in TNF- α stimulated HaCaT cells *in vitro*.

Key words *Euphorbia helioscopia* L.; chemical constituents; structure identification; HaCaT cells