

密蒙花抗肿瘤活性成分分离、 鉴定及抗肿瘤活性

李童¹, 李丽媛¹, 李爱鹏¹, 谢欣¹, 何婷婷^{2,4},
莫斯锐^{2,3}, 黄上峰^{2,3}, 黄锁义^{2,3,4*}

[1. 右江民族医学院 基础医学院, 广西 百色 533000; 2. 广西高校右江流域特色民族药研究重点实验室, 广西 百色 533000; 3. 右江民族医学院 药学院, 广西 百色 533000; 4. 右江民族医学院 广西分子病理学(肝胆疾病)重点实验室, 广西 百色 533000]

摘要: 为了明确密蒙花抗肿瘤药效物质基础, 对密蒙花的 4 种不同溶剂提取物(乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、石油醚提取物、水提取物)进行了抗肿瘤活性的初筛; 接着, 对具有抗肿瘤活性的提取物进行了分离和纯化, 通过 NMR、MS、FTIR、UV 对所得单体化合物进行了结构鉴定; 随后, 探讨了单体化合物对体外肿瘤细胞(MCF-7 细胞、SGC-7901 细胞、BEL-7404 细胞)增殖和凋亡的影响; 最后, 在无细胞体系中检测了单体化合物对 DNA Topoisomerase I (简称 DNA Topo I) 的活力影响及对 DNA 的直接切割作用。结果表明, 密蒙花 4 种不同溶剂的提取物均能在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖, 分离得到单体化合物为芹菜素、蒙花苷、毛蕊花糖苷和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷, 其对 3 种肿瘤细胞均具有较好的抗肿瘤活性, 可能是密蒙花抗肿瘤的主要活性成分。其中, 芹菜素可显著抑制 BEL-7404 肿瘤细胞的增殖; 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷在促进细胞凋亡方面效果较为显著。4 种单体化合物均可抑制 DNA Topo I。

关键词: 密蒙花; 肿瘤细胞; 抗肿瘤; 活性筛选; 活性单体化合物; 中药现代化技术
中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2025)09-2005-09

Isolation, identification and anti-tumor activity of anti-tumor active components from *Buddleja officinalis* Maxim

LI Tong¹, LI Liyuan¹, LI Aipeng¹, XIE Xin¹, HE Tingting^{2,4},
MO Sirui^{2,3}, HUANG Shangfeng^{2,3}, HUANG Suoyi^{2,3,4*}

[1. School of Basic Medical Sciences, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Characteristic Ethnic Medicine of Youjiang Valley, Baise 533000, Guangxi, China; 3. School of Pharmacy, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 4. Key Laboratory of Molecular Pathology (Hepatobiliary Diseases), Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China]

Abstract: The antitumor activity of 4 different solvent extracts (ethyl acetate extract, *n*-butanol extract, petroleum ether extract, water extract) was screened in order to clarify the anti-tumor substance basis of *Buddleja officinalis* Maxim. The extract with anti-tumor activity was then isolated and purified, while the structures of the monomer compounds were identified by NMR, MS, FTIR and UV. The effects of monomer compounds on the *in vitro* proliferation and apoptosis of tumor cells (MCF-7 cells, SGC-7901 cells, BEL-7404 cells) were analyzed, while the influence of monomer compounds on DNA Topoisomerase I (DNA Topo I) activity and the direct cleavage of DNA were evaluated in cell-free system. The results showed that all the 4 different solvent extracts could inhibit the proliferation of tumor cells to a

收稿日期: 2023-10-20; 定用日期: 2024-04-23; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230888

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB18221095); 广西肝胆疾病分子病理学重点实验室资助项目(GXZDSYS-005); 2021 年百色市科学研究与技术开发计划课题(百科 20211810); 右江民族医学院高层次人才科研项目(01002018079)

作者简介: 李童(1995—), 女, 硕士生, E-mail: 2570788948@qq.com。联系人: 黄锁义(1964—), 男, 教授, E-mail: huangsuoyi@163.com。

certain extent. The isolated monomer compounds, apigenin, linarin, verbascoside and apigenin-pigenin-7-O-glucuronide, displayed good anti-tumor activity against all the three type of tumor cells, and might be the main anti-tumor active ingredient of *Buddleja officinalis* Maxim. Among them, apigenin could significantly inhibit the proliferation of BEL-7404 tumor cells, while apigenin-7-O-glucuronide showed a significant effect on promoting cell apoptosis. All the four monomer compounds could inhibit DNA Topo I.

Key words: *Buddleja officinalis* Maxim; tumor cells; anti-tumor; activity screening; active monomer compounds; modern technology of Chinese medicine

密蒙花 (*Buddleja officinalis* Maxim) 是马钱科醉鱼草属灌木植物, 喜温暖、湿润的环境, 主要分布在中国广东、广西、四川、贵州、云南和西藏等省区, 缅甸、越南也有分布^[1]。密蒙花为重要的天然药材, 其味甘、性微寒, 药用价值很高, 全株植物都可作为药材, 具有抗炎、抗氧化、抗糖尿病、抗菌、抗目翳、免疫调节等作用^[2-3]。

研究表明, 密蒙花含有丰富的黄酮类、苷类、生物碱等多种化合物^[4], 其中, 黄酮类中的木犀草素、芹菜素、刺槐素等化合物具有抗肿瘤作用^[5]。但目前国内外对密蒙花单体抗肿瘤的研究主要集中在木犀草素对骨肉瘤、肝癌等的作用, 对密蒙花其他单体成分抗肿瘤 (肝癌、乳腺癌、胃癌) 及其抗肿瘤的药效物质基础及作用机制的研究鲜有报道。

本课题组拟先对密蒙花的 4 种不同极性溶剂的提取物 (乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、石油醚提取物、水提取物) 进行抗肿瘤活性的初筛。为进一步阐明抗肿瘤活性的药效物质基础, 对不同溶剂提取物进行单体的分离纯化和结构鉴定, 并检测其单体抗肿瘤活性。旨在为密蒙花的综合开发利用提供理论指导。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

SGC-7901、MCF-7、BEL-7404 细胞株, 中国科学院昆明细胞库; 密蒙花, 广西壮族自治区玉林市中药材市场, 由右江民族医学院覃道光副教授鉴定为马钱科, 醉鱼草属; RPMI-1640、DMEM 基础培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS), 美国 Gemini 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒, 碧云天公司; DNA 拓扑异构酶 I (DNA Topoisomerase I, 简称 DNA Topo I, 2240 A), TAKARA 公司; 琼脂糖 Agarose75510019, Scientific™ Thermo 公司; 5×TBE 缓冲液 (T1050-500), Solarbio 公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS 溶液, pH=7.40), 武汉赛维尔生物科技有限公司;

牛血清白蛋白 (BSA, 质量分数 0.1%), 上海创凌生物科技有限公司; 底物 DNA, 郑州赛润生物科技有限公司; GelRed 染料 (S2009L), UElandy 公司; 乙醇 (质量分数 95%)、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、磷酸、乙腈、二甲基亚砜 (DMSO), AR, 成都市科龙化工试剂厂; 200~300 目硅胶, 青岛海浪硅胶干燥剂有限公司; 实验用超纯水, 自制。

Waters 2695 型高效液相色谱仪、Q-TOF Premier 四极杆飞行时间串联质谱仪、Quattro Premier XE 三重四极杆液质联用仪, 美国 Waters 有限公司; Agilent 1100 型液相色谱仪、Agilent 1260 紫外检测器, 美国安捷伦有限公司; Bruker AV II -400 MHz、Bruker AV II -600 MHz 核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞有限公司; N4S 紫外-可见分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 密理博 Scepter 细胞计数仪, 默克化工技术 (上海) 有限公司; Mithras LB 943 多功能酶标仪, 德国 Berthold 公司; FACScanto II 流式细胞仪, 美国 BD 公司; GGM/D2 凝胶成像系统, 英国 Syngene 公司。

1.2 方法

1.2.1 密蒙花不同溶剂的提取物抗肿瘤活性初筛

将干燥的密蒙花药材 5 kg 进行粉碎, 乙醇 (质量分数 95%) 回流提取 3 次, 每次 1 h, 于 55 °C 减压浓缩至无醇, 得到提取浓缩液后, 加超纯水稀释 2~3 倍, 分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取和浓缩, 水相则减压浓缩至无有机试剂, 得到石油醚提取物浸膏、乙酸乙酯提取物浸膏、正丁醇提取物浸膏和水提取物浸膏。随后, 用 CCK-8 实验对密蒙花的 4 种不同溶剂的提取物进行抗肿瘤活性的初筛, 计算 IC₅₀ 值 (能够抑制肿瘤细胞 50% 活性所需的药物浓度)。

1.2.2 密蒙花单体化合物的提取与分离

首先, 对具有抑制肿瘤细胞增殖能力的提取物进行薄层色谱检测, 发现石油醚提取物无明显的特征峰, 所以对其他 3 个提取物进行单体化合物的分离。

取乙酸乙酯提取物浸膏、正丁醇提取物浸膏和

水提取物浸膏, 分别以石油醚/乙酸乙酯(体积比 5:1~1:1)、甲醇/质量分数 0.1%磷酸水溶液(体积比 50:50)、乙腈/质量分数 0.1%磷酸水溶液(体积比 25:75)、甲醇/质量分数 0.1%磷酸水溶液(体积比 17:83)为流动相, 紫外检测波长(λ)分别为 334 和 332 nm, C18 柱进行分离, 得到目标成分, 经 50 °C 浓缩, 过滤, 45 °C 干燥 3 h, 分别得到单体化合物(I~IV)。

1.3 结构鉴定

将上述所得的单体化合物进行 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR、质谱(MS)、FTIR、紫外(UV)等测试。

1.4 单体化合物的抗肿瘤活性及作用机制测试

1.4.1 单体化合物对肿瘤细胞的增殖抑制作用测试

1.4.1.1 药物的配制

将经过结构鉴定得到的蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷等单体化合物, 分别用 DMSO 进行溶解, 统一配制成初始浓度为 25 mmol/L 的母液, 后期可根据实验需要配制成相应浓度。

1.4.1.2 肿瘤细胞的铺板

生长好的细胞待消化完成后, 离心得到细胞沉淀, 加入 2 mL 的 DMEM/RPMI-1640 完全培养基吹打混匀, 用移液器准确吸取 10 μL 细胞悬液于细胞计数仪上计数, 根据结果将细胞浓度调整成 1×10^5 cell/孔, 将配制好的细胞悬液接种到 96 孔板中, 100 μL 每孔, 细胞铺板时注意保证每个孔的细胞数量均匀, 尽量避免实验误差, 培养 24 h 后进行观察^[6-7]。

1.4.1.3 分组及给药

空白对照组: 细胞培养液。阴性对照组: DMSO+细胞溶液+细胞培养液。加药组: 细胞溶液+细胞培养液。实验组: 药物(蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷)+细胞溶液+细胞培养液。

1.4.1.4 给药

蒙花苷、毛蕊花糖苷对于 MCF-7、BEL-7404、SGC-7901 3 种肿瘤细胞的给药浓度为 100、200、400、600、800 $\mu\text{mol/L}$ 。芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷的给药浓度为 50、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ 。实验分为 4 个组别, 将长满细胞的 96 孔板中的培养液弃去, 依次加入不同浓度的药物培养液 100 μL , 每个浓度设 6 个复孔, 放入细胞培养箱中进行培养, 给药时间分为 24、48、72 h。细胞培养时间较长, 可在 96 孔外围一圈加 PBS 溶液进行保湿。

1.4.1.5 检测

将给药完成后的 96 孔板转移到超净工作台中,

用移液器吸去孔内液体, 注意枪头的更换, 防止交叉污染, 每孔加入 10 μL CCK-8 液体, 加样过程中要避免气泡的产生, 继续放入细胞培养箱内孵育 0.5 h, 之后用多功能酶标仪在波长 450 nm 下进行测试。按式(1)计算细胞存活率:

$$S/\%=(\text{OD}_{\text{加药}}-\text{OD}_{\text{实验}}/\text{OD}_{\text{加药}}-\text{OD}_{\text{空白}}) \times 100 \quad (1)$$

式中: S 为细胞存活率, %; $\text{OD}_{\text{加药}}$ 为含细胞和完全培养基、不含药物溶液的吸光度; $\text{OD}_{\text{实验}}$ 为含细胞、完全培养基和药物溶液的吸光度; $\text{OD}_{\text{空白}}$ 为仅含完全培养基溶液的吸光度。

1.4.1.6 数据分析

用 Excel 对数据进行收集和整理, 采用 SPSS.23 软件进行数据分析。用“算数平均数 \pm 标准差”描述计量资料, 比较多组数据间的算数平均数, 符合正态性和方差齐性, 采用 LSD-t 检验法进行组间两两比较。

1.4.2 单体化合物对肿瘤细胞的促凋亡作用测试

将培养好的肿瘤细胞进行消化, 转移到六孔板中, 每孔加混匀的细胞悬液 2 mL, 之后放入到细胞培养箱中进行培养。在显微镜下观察, 待细胞贴壁生长直至充满整个视野后进行给药。蒙花苷、毛蕊花糖苷干预 MCF-7、BEL-7404、SGC-7901 的浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$; 芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷的给药浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。给药完毕, 将细胞放入培养箱继续培养 48 h。用流式细胞仪检测细胞凋亡^[8]。用 Flow Jo V10 软件进行分析, 计算细胞凋亡率。

1.4.3 单体化合物对 DNA Topo I 的抑制作用测试

1.4.3.1 琼脂糖溶液的配制

将 5 \times TBE 缓冲液用超纯水稀释成 1 \times TBE, 将 0.2 g 琼脂糖、20 mL 1 \times TBE (琼脂糖凝胶可根据胶板的大小进行调整) 加入到广口瓶中, 微波炉(功率 1150 W) 加热 40 s 后取出, 观察瓶内是否有未融化的琼脂糖, 如有, 微波炉继续加热直至液体为澄清透明即可。将加热好的琼脂凝胶液体放凉至 60 °C, 倒入事先插入梳子的胶板中, 冷却固定 30~60 min 后, 将装有琼脂糖凝胶的胶板放入电泳槽中, 倒入 1 \times TBE 溶液没过胶板约 1 cm, 备用^[9]。

1.4.3.2 药物试剂体系的配制

药物试剂体系配制见表 1。将药物(羟基喜树碱、蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷)用 DMSO 溶解, 根据相对分子质量配制成 10 mmol/L 的母液, 根据实验需要, 用 PBS 溶液(pH=7.40) 稀释成相应的浓度。20 U/ μL 的 DNA Topo I 用 PBS 稀释为 1 U/ μL ^[10]。

表 1 药物试剂体系的配制
Table 1 Drug system configuration

试剂	体积/ μL
无菌去离子水 (dd H ₂ O)	6.0
10×DNA Topo I buffer (缓冲溶液)	1.0
质量分数 0.1% BSA	1.0
底物 DNA	0.5
药物	1.0
DNA Topo I	0.5

1.4.3.3 实验步骤

将配制好的药物试剂体系充分离心混匀, 置于 37 °C 水浴锅加热孵育, 孵育 30 min 后取出, 每管分别加入 2.0 μL 6×DNA 上样缓冲液终止反应, 每管取 10.0 μL 进行上样, 将加样孔朝向负极, 接通电源, 电压 85 V, 电泳时间为 1 h。电泳结束后, 将凝胶样品放入到配制好的染料中染色 30 min 后 (GelRed 染料 10 μL +100 mL 的 1×TBE 溶液), 放入到凝胶成像仪中, 先用白光确定凝胶位置, 使图像清晰, 302 nm 波长处进行观察取像。

1.4.4 药物对 DNA 的抑制作用测试

实验分为对照组 (dd H₂O 9.5 μL +DNA 0.5 μL) 和实验组 (不同浓度的单体化合物溶液 1.0 μL +dd H₂O 8.5 μL +DNA 0.5 μL), 将以上试剂按照分组加入微量离心管中, 混匀。用 37 °C 水浴锅温育 2 h。水浴结束后, 各管加入 2.0 μL 6×DNA 上样缓冲液, 混匀。按照分组依次进行上样, 并于 85 V 电压下电泳 1 h, 电泳结束后, 将凝胶样品放入到配制好的染料中染色 30 min 后 (GelRed 染料 10.0 μL +100 mL 1×TBE 溶液)^[11], 放入到凝胶成像仪中, 先用白光确定凝胶位置, 使图像清晰, 302 nm 波长进行观察取像。

2 结果与讨论

2.1 密蒙花 4 种不同溶剂提取物抗肿瘤活性初筛分析

密蒙花 4 种不同溶剂的提取物对 3 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 值见表 2。

表 2 密蒙花 4 种不同溶剂的提取物对 3 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ values of extracts from 4 different solvents of flower *Buddleja officinalis* Maxim against three kinds of tumor cells

提取物	IC ₅₀ 值/(g/L)		
	MCF-7	SGC-7901	BEL-7404
石油醚提取物	0.50	0.14	0.0064
乙酸乙酯提取物	0.47	0.09	0.0026
正丁醇提取物	0.39	0.08	0.16
水提取物	无	0.58	0.57

由表 2 可知, 密蒙花 4 种不同溶剂的提取物对 MCF-7、SGC-7901 和 BEL-7404 3 种肿瘤细胞的增

殖有显著的抑制作用, 其中, 乙酸乙酯提取物对 BEL-7404 的抗肿瘤效果最好 (IC₅₀=0.0026 g/L)。

2.2 结构分析

化合物 I, 黄色固体, 熔点: 347.5 °C。ESI-MS, m/z : 271.0 [M+H]⁺, 269.1 [M-H]⁻。UV (DMSO, 质量浓度 27 g/L), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 206, 266, 339。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3290 (—OH), 3094 (C—H), 1653 (C=O), 1271, 1223, 1181 (C—O), 1245 (C—O—C), 1587, 1556, 1500, 908, 829, 806, 738。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.95 (5-OH, 1H, s), 10.37 (7-OH, 1H, s), 10.08 (C-4'-OH, 1H, s), 6.76 (3-H, 1H, s), 6.17 (6-H, 1H, s), 6.46 (8-H, 1H, s), 7.90 (2',6'-H, 2H, t, $J=5.8$ Hz), 6.99~6.82 (3',5'-H, 2H, d, $J=9.0$ Hz)。

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 165.6 (C-2, C), 104.3 (C-3, CH), 183.2 (C-4, C), 158.7 (C-5, C), 95.4 (C-6, CH), 165 (C-7, C), 100.3 (C-8, CH), 162.9 (C-9, C), 105.1 (C-10, C), 122.6 (C-1', C), 129.9 (C-2', CH), 117.4 (C-3', CH), 162.6 (C-4', C), 117.4 (C-5', CH), 129.9 (C-6', CH)。与文献[12]一致, 鉴定为芹菜素。

化合物 II, 白色固体, 熔点: 592.55 °C。ESI-MS, m/z : 615.17 [M+Na]⁺; 591.19 [M-H]⁻。UV (DMSO, 质量浓度 125 mg/L), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 193, 266, 333。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3470, 1246, 1183 (—OH), 2984 (—CH₃), 2936, 2915 (—CH₂—), 1660 (C=O), 1608, 1583, 1567, 1503, 1448 (Ar), 1070 (C—O—C), 1431, 1400, 1353, 1324, 1300, 1265, 1208, 1158, 1130, 1088, 1037, 1016, 981, 908, 863, 844, 806, 777, 713, 678, 639, 617, 600, 573, 549, 527。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 6.93 (3-H, 1H, s), 6.45 (6-H, 1H, d, $J=2.1$ Hz); 6.79 (8-H, 1H, d, $J=2.2$ Hz), 5.07 (1'-H, 1H, d, $J=7.2$ Hz), 4.56 (1''-H, 1H, d, $J=15.9$ Hz), 8.04 (2',6'-H, 2H, m), 7.14 (3',5'-H, 2H, m), 3.86 (4-OCH₃, 3H, s), 12.91 (5-OH, 1H, s)。¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 164.0 (C-2, C), 103.8 (C-3, CH), 182.1 (C-4, C), 161.2 (C-5, C), 99.7 (C-6, CH), 163.0 (C-7, C), 94.8 (C-8, CH), 157.0 (C-9, C), 105.5 (C-10, C), 122.7 (C-1', C), 128.5 (C-2', CH), 114.7 (C-3', CH), 162.5 (C-4', C), 114.7 (C-5', CH), 128.5 (C-6', CH), 55.6 (4-OCH₃), 100.6 (C-1'', CH), 73.1 (C-2'', CH), 76.3 (C-3'', CH), 69.6 (C-4'', CH), 75.7 (C-5'', CH), 66.1 (C-6'', CH₂), 100.0 (C-1''', CH), 70.8 (C-2''', CH), 70.4 (C-3''', CH), 72.1 (C-4''', CH), 68.4 (C-5''', CH), 17.8 (C-6''', CH₃)。与文献[13]一致, 鉴定为蒙花苷。

化合物 III, 黄色固体, 熔点: 347.2 °C。ESI-MS, m/z : 447.27 [M+H]⁺, 445.25 [M-H]⁻。UV (DMSO), $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$: 200, 267, 337。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3423 (—OH), 1734 (C=O), 1656, 1605, 1583, 1495 (C=O), 1344, 1244, 1177, 1102, 1033, 831。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 6.87 (3-H, 1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.48 (6-H, 1H, d, $J=2.1$ Hz), 6.88 (8-H, 1H, s), 7.97 (2',6'-H, 2H, d, $J=8.8$ Hz), 6.96 (3',5'-H, 2H, d, $J=8.8$ Hz), 5.30 (Glu-1''H, d, $J=7.3$ Hz), 13.00 (—OH, 1H, s)。¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 164.7 (C-2, C),

103.5 (C-3, CH), 182.4 (C-4, C), 161.6 (C-5, C), 99.5 (C-6, CH), 162.9 (C-7, C), 95.0 (C-8, CH), 157.4 (C-9, C), 105.9 (C-10, C), 121.5 (C-1', C), 129.1 (C-2', CH), 116.5 (C-3', CH), 161.8 (C-4', C), 116.5 (C-5', CH), 129.0 (C-6', CH), 99.8 (C-1'', CH), 73.2 (C-2'', CH), 76.0 (C-3'', CH), 71.6 (C-4'', CH), 75.7 (C-5'', CH), 170.5 (C-6'', C)。与文献[14]一致, 鉴定为芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷。

化合物IV, 淡黄色固体, 熔点: 624.6 °C。ESI-MS, m/z : 623.07 [M-H]⁻。UV (DMSO), λ_{max}/nm : 206, 266, 339。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3428 (—OH), 2933 (C—H), 1694 (C=O), 1605, 1524, 1448, 1283, 1159, 1117, 1065, 1035, 812。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 6.99 (2-H, 1H, d, $J=1.9$ Hz), 6.73 (5-H, 1H, d, $J=8.1$ Hz), 6.95 (6-H, 1H, dd, $J=8.3$ 、 1.9 Hz), 7.43 (7-H, 1H, d, $J=15.8$ Hz), 6.17 (8-H, 1H, d, $J=15.9$ Hz), 6.46 (6'-H, 1H, dd, $J=8.1$ 、 1.9 Hz), 4.32 (1''-H, 1H, d, $J=7.8$ Hz), 4.70 (4''-H, 1H, d, $J=7.8$ Hz), 5.0 (1'''-H, s, 1H), 0.93 (6'''-H, 3H, d, $J=6.2$ Hz)。¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 129.1 (C-1, C), 115.9 (C-2, CH), 143.7 (C-3, C), 145.1 (C-4, C), 115.6 (C-5, CH), 119.7 (C-6, CH), 35.1 (C-7, CH), 70.4 (C-8, CH), 125.6 (C-1', C), 113.7 (C-2', CH), 148.6 (C-3', C), 145.7 (C-4', C), 116.4 (C-5', CH), 121.6 (C-6', CH), 145.7 (C-7', CH₂), 114.8 (C-8', CH₂), 102.4 (C-1'', CH), 74.6 (C-2'', CH₂), 79.1 (C-3'', CH), 68.9 (C-4'', CH), 74.6 (C-5'', CH), 60.9 (C-6'', CH₂), 101.4 (C-1''', CH), 70.7 (C-2''', CH₂), 70.5 (C-3''', CH), 71.8 (C-4''', CH), 69.3 (C-5''', CH), 18.3 (C-6''', CH₃), 165.8 (C=O)。与文献[15]一致, 鉴定为毛蕊花糖苷。

2.3 肿瘤细胞分析

2.3.1 增殖抑制分析

图 1~4 和表 3 为芹菜素、蒙花苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、毛蕊花糖苷对 MCF-7、BEL-7404、SGC-7901 3 种肿瘤细胞的抑制作用测试结果及对应的 IC₅₀ 值。

从表 3 和图 1~4 可以看出, 4 种单体化合物对 3 种肿瘤细胞均有一定的抑制作用, 肿瘤细胞的存活率随着给药浓度的增加大致呈减小趋势; 4 种单体化合物对 MCF-7 肿瘤细胞的抑制效果低于对其他两种肿瘤细胞

(BEL-7404、SGC-7901)。在给药时间为 48 h 时, 毛蕊花糖苷对 SGC-7901 肿瘤细胞的抑制效果最为明显, 芹菜素对 BEL-7404 肿瘤细胞的杀伤力最强。这可能是由于, 毛蕊花糖苷和芹菜素对肿瘤细胞增殖的抑制作用可以使细胞周期停滞在 G0/G1 期或 G2/M 期^[16-19], 从而抑制细胞增长。

2.3.2 流式结果分析

图 5~7 为毛蕊花糖苷、芹菜素、蒙花苷和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷 4 种单体化合物对肿瘤细胞的抑制作用。从图 5~7 可知, 上述对应 4 种单体化合物促进 BEL-7404 肿瘤细胞的凋亡率〔即右上象限 (Q2 区) 与右下象限 (Q3 区) 凋亡率之和, 下同〕分别为 1.97%、2.34%、4.59%、15.95%; 对 SGC-7901 肿瘤细胞的凋亡率分别为 5.39%、5.00%、13.50%、16.31%; 对 MCF-7 肿瘤细胞的凋亡率分别为 2.94%、2.47%、2.49%、3.16%。

与毛蕊花糖苷、芹菜素、蒙花苷 3 个单体化合物相比, 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷对 SGC-7901 肿瘤细胞的促凋亡效果相对较好, 凋亡率为 16.31%, 其次是蒙花苷、毛蕊花糖苷和芹菜素。

表 3 密蒙花单体化合物对肿瘤细胞的 IC₅₀ 值
Table 3 IC₅₀ values of *Buddleia officinalis* Maxim compounds on tumor cells

单体化合物	给药时间/h	IC ₅₀ 值/(μ mol/L)		
		MCF-7	SGC-7901	BEL-7404
芹菜素	24	—	49.5	112.4
	48	7074	—	0.6
	72	954	23.8	1.1
蒙花苷	24	—	—	—
	48	—	297.9	1867
	72	1333	406.0	3236
芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	24	6234	849.0	498
	48	5471	374.6	429
	72	554	22.5	179
毛蕊花糖苷	24	2718	875.7	3391
	48	2597	395.3	2513
	72	1777	630.4	706

注: “—” 无数据。

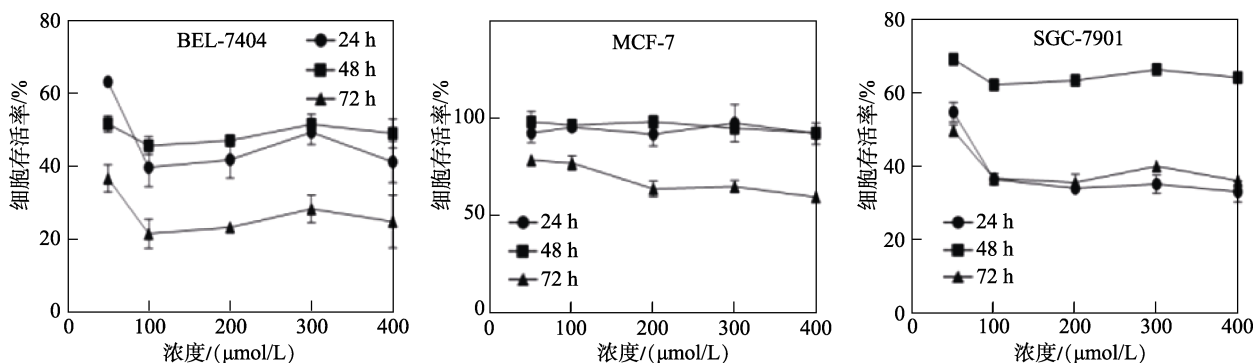


图 1 芹菜素对肿瘤细胞的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of apigenin on tumor cells

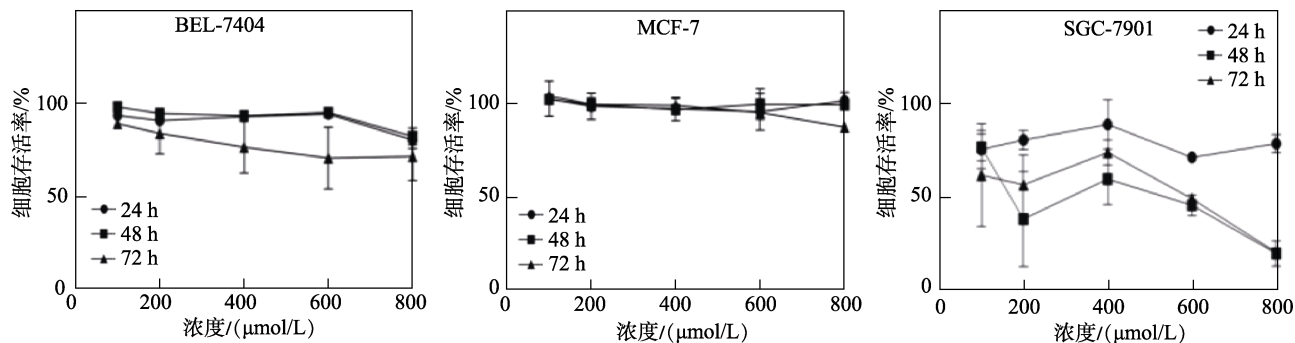


图 2 蒙花苷对肿瘤细胞的抑制作用
Fig. 2 Inhibitory effect of linarin on tumor cells

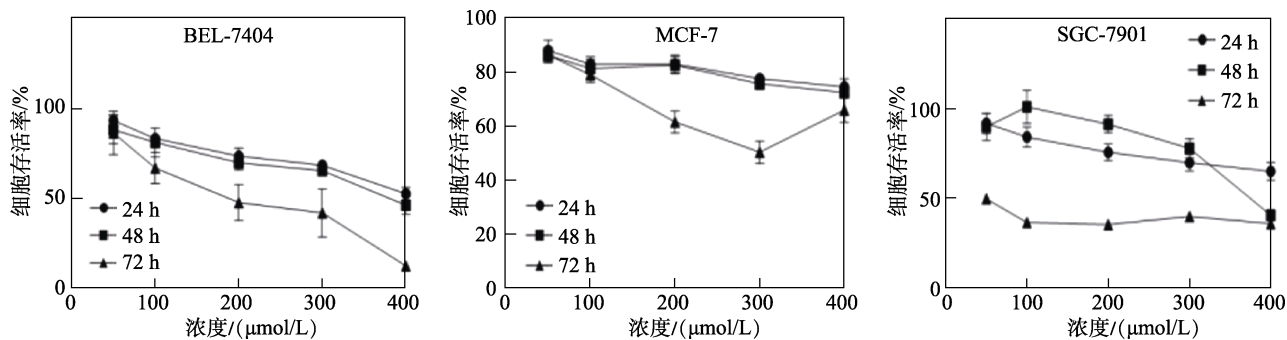


图 3 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷对肿瘤细胞的抑制作用
Fig. 3 Inhibitory effect of apigenin 7-O-glucuronide on tumor cells

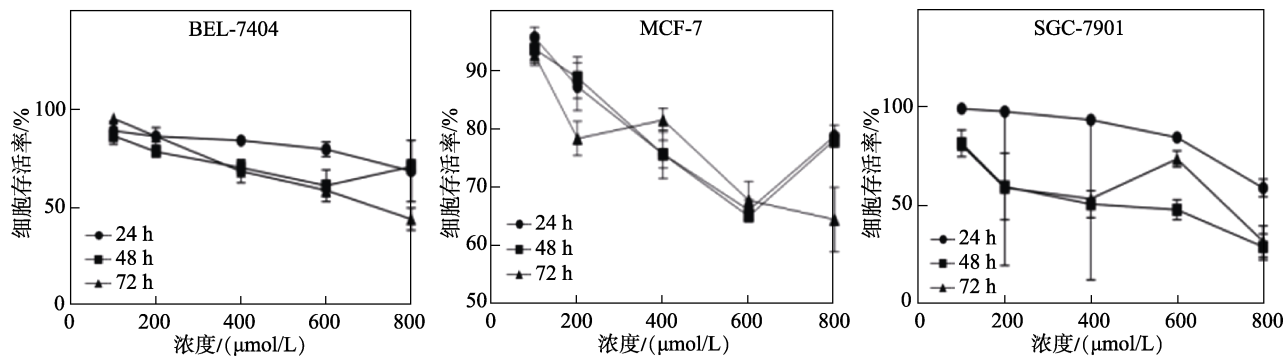
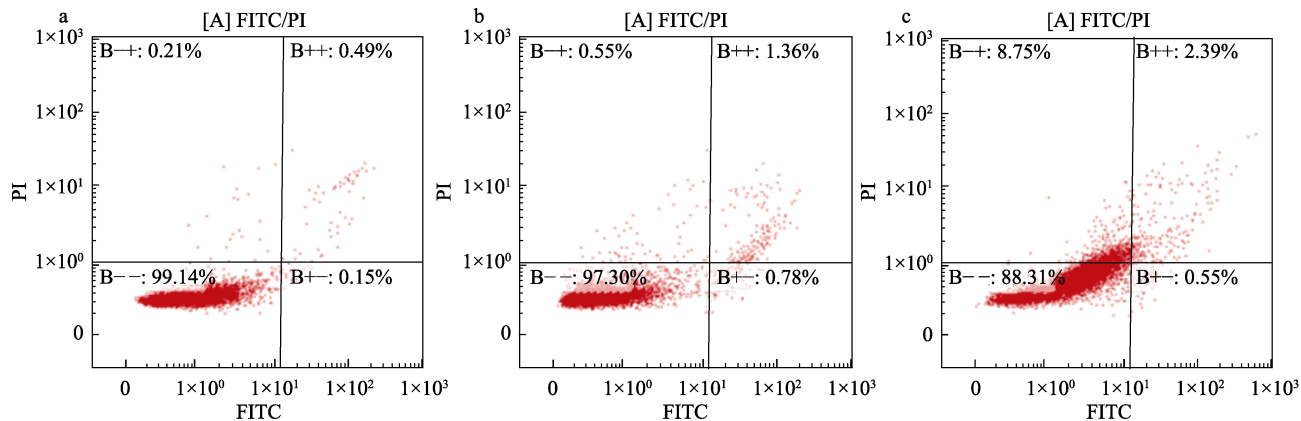
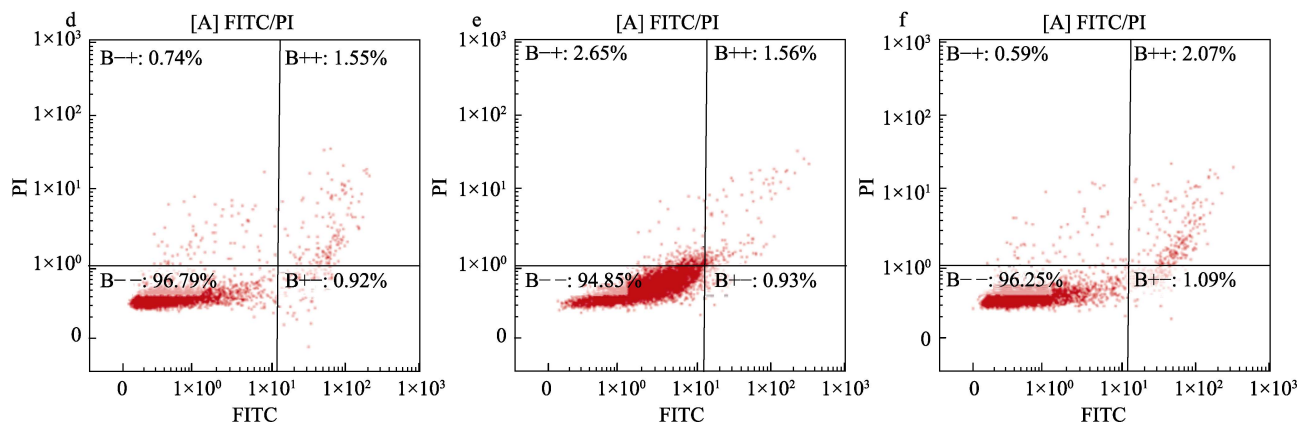


图 4 毛蕊花糖苷对肿瘤细胞的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effect of acteoside on tumor cells

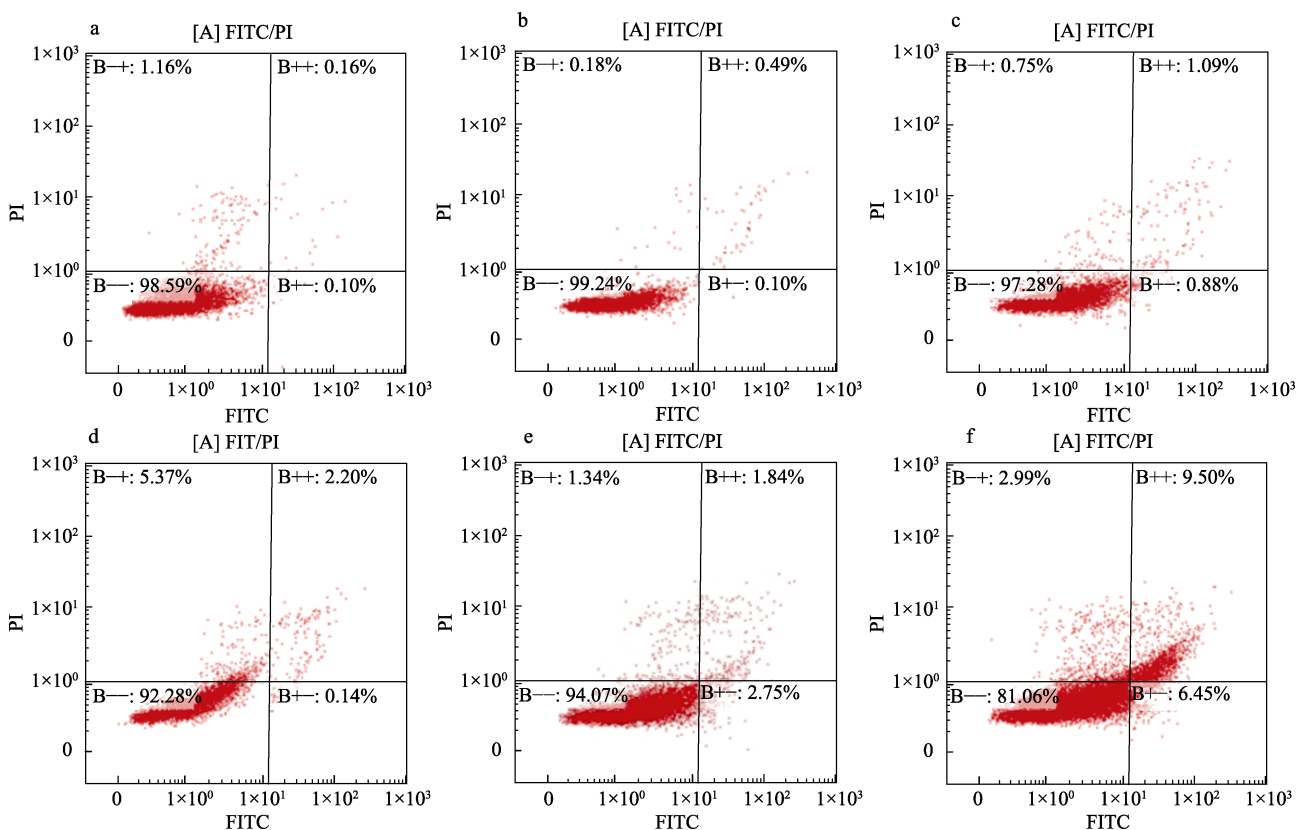




a—空白对照组; b—0.1% DMSO 组; c—400 μmol/L 毛蕊花糖苷组; d—400 μmol/L 蒙花苷组; e—200 μmol/L 芹菜素组; f—200 μmol/L 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷组

图 5 4 种单体化合物对 MCF-7 肿瘤细胞的促凋亡作用

Fig. 5 Proapoptotic effects of four monomer compounds on MCF-7 tumor cells



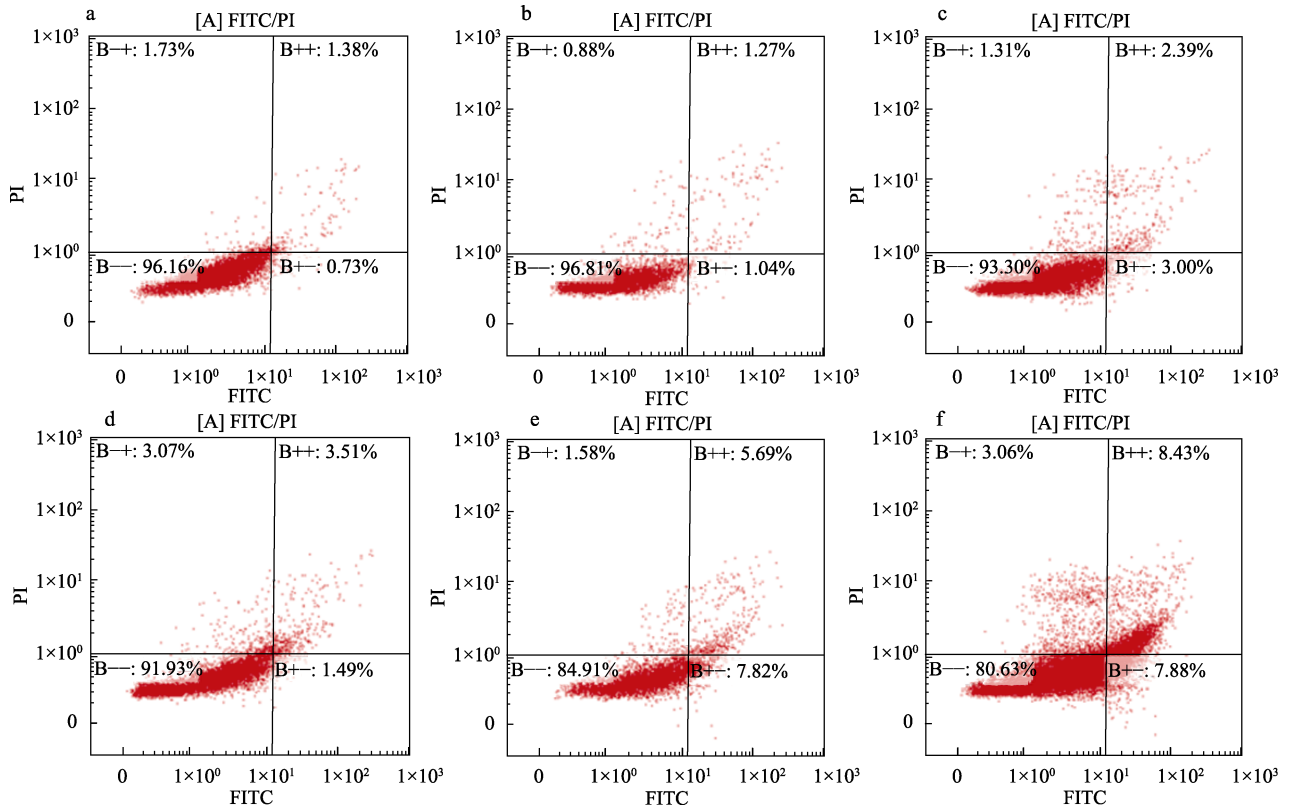
a—空白对照组; b—0.1% DMSO 组; c—400 μmol/L 毛蕊花糖苷组; d—400 μmol/L 蒙花苷组; e—200 μmol/L 芹菜素组; f—200 μmol/L 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷组

图 6 4 种单体化合物对 BEL-7404 肿瘤细胞的促凋亡作用

Fig. 6 Proapoptotic effects of four monomer compounds on BEL-7404 tumor cells

相较于其他两种肿瘤细胞, 4 个单体化合物可明显促进 SGC-7901 细胞的凋亡, 对 MCF-7 肿瘤细胞最弱。其中, 芹菜素和蒙花苷对 SGC-7901、BEL-7404 和 MCF-7 3 种肿瘤细胞的凋亡作用可能是抑制癌细胞中 p65、p72 相关蛋白的磷酸化, 减弱 NF-κB 信号

通路和 HER2/HER3-PI3K/Akt 通路的信号表^[20]。芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷可能是通过抑制 p63 通路的表达来调控凋亡作用; 毛蕊花糖苷抗肿瘤作用机制相关的蛋白主要为 p53, 能够与胞质中的 Bcl-2 家族蛋白发生相互作用, 从而介导凋亡途径^[21]。



a—空白对照组；b—0.1% DMSO 组；c—400 μmol/L 毛蕊花糖苷组；d—400 μmol/L 蒙花苷组；e—200 μmol/L 芹菜素组；f—200 μmol/L 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷组；FITC 为荧光异硫氰酸荧光素；PI 为碘化丙啶

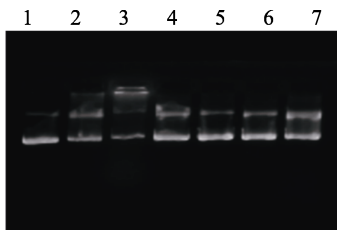
图 7 4 种单体化合物对 SGC-7901 肿瘤细胞的促凋亡作用

Fig. 7 Proapoptotic effects of four monomer compounds on SGC-7901 tumor cells

2.3.3 单体化合物对 DNA Topo I 的作用结果

图 8 和 9 分别为 4 种单体化合物在浓度为 200、400 μmol/L 下对 DNA Topo I 的抑制作用，泳道 1 为阴性对照，泳道 2 添加羟基喜树碱作为阳性对照。

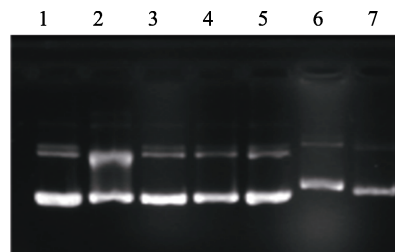
从图 8a 可以得知，蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷 4 种单体化合物均对 DNA Topo I 产生抑制作用，在药物浓度为 200 μmol/L 下，羟基喜树碱、毛蕊花糖苷和芹菜素可完全抑制 DNA Topo I 的解旋活性，蒙花苷对 DNA Topo I 的抑制效果较弱。



泳道 1 为 pBR322DNA；泳道 2 为 pBR322DNA+DNA Topo I；泳道 3：pBR322DNA+DNA Topo I +羟基喜树碱（200 μmol/L）；泳道 4~7 依次为 pBR322DNA+DNA Topo I +200 μmol/L（蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷）

图 8 4 种单体化合物对 DNA Topo I 的抑制作用

Fig. 8 Inhibitory effect of four monomer compounds on DNA Topo I



泳道 1 为 pBR322DNA；泳道 2 为 pBR322DNA+DNA Topo I；泳道 3 为 pBR322DNA+DNA Topo I +羟基喜树碱（400 μmol/L）；泳道 4~7 依次为 pBR322DNA+DNA Topo I +400 μmol/L（蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷）

图 9 4 种单体化合物对 DNA Topo I 的抑制作用

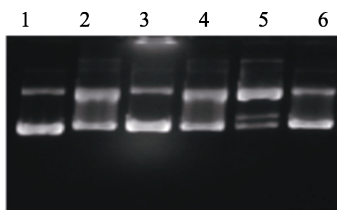
Fig. 9 Inhibitory effect of four monomer compounds on DNA Topo I

由图 9 可知，在 400 μmol/L 浓度下，羟基喜树碱和 4 种单体化合物均可完全抑制 DNA Topo I 的解旋活性。

2.3.4 单体化合物对 pBR322 DNA 的作用分析

图 10 为 4 种单体化合物对 DNA 的直接切割作用。

从图 10 可以看出，在 400 μmol/L 浓度下，除芹菜素未能直接与 DNA 产生切割作用，羟基喜树碱、蒙花苷、毛蕊花糖苷和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷均在一定程度上与 DNA 产生作用。其中，毛蕊花糖苷对 DNA 的松弛作用最好。



泳道 1 为 pBR322DNA; 泳道 2 为 pBR322 DNA+DNA Topo I + 羟基喜树碱 (400 $\mu\text{mol/L}$); 泳道 3~6 依次为 pBR322 DNA+DNA Topo I +400 $\mu\text{mol/L}$ (蒙花苷、毛蕊花糖苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷)

图 10 4 种单体化合物对 DNA 的直接切割作用

Fig. 10 Four monomer compounds act on DNA insertion

3 结论

通过天然植物化学分离、加热回流等方法对密蒙花进行提取, 得到石油醚提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和水提取物, 分别进行了抗肿瘤活性的初筛。结果发现, 4 种不同溶剂的提取物均能在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖, 其中, 乙酸乙酯提取物的抗肿瘤效果最好。从提取物中分离得到了芹菜素、蒙花苷、毛蕊花糖苷和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷 4 种单体化合物, 对 SGC-7901、BEL-7404 和 MCF-7 3 种肿瘤细胞具有较好的抗肿瘤活性。其中, 芹菜素可显著抑制 BEL-7404 肿瘤细胞的增殖; 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷在促进细胞凋亡方面效果较为显著; 4 种单体化合物均可抑制 DNA Topo I。这 4 种单体化合物是密蒙花抗肿瘤的药效物质基础。

本研究丰富了密蒙花抗肿瘤活性成分的研究, 密蒙花的 4 种单体化合物可能是通过作用于不同的靶点蛋白达到抑制肿瘤细胞增殖或促进肿瘤细胞凋亡的目的。为后续研究密蒙花活性成分体内抗肿瘤实验奠定了基础, 为进一步研发新型抗肿瘤药物提供了科学的理论依据。

参考文献:

- [1] GUO L (郭雷), ZHU W C (朱文成), LIU C (刘超). Advances in studies of chemical components of *Buddleja officinalis* Maxim. and their bioactivities[J]. Food Research and Development (食品研究与开发), 2012, 33(7): 222-225.
- [2] XIONG Y (熊勇), XIONG Y B (熊扬波), YANG Q S (杨青松). Study on extraction and antioxidant activity of total flavones from the medicinal plant *Buddleja officinalis* Maxim[J]. Biotechnology (生物技术), 2011, 21(3): 85-87.
- [3] TIAN S (田硕), MIAO M S (苗明三). The modern research and analysis of *Flos buddlejae* Lobatae[J]. Acta Chinese Medicine (中医学报), 2014, 29(5): 708-710.
- [4] FENG Y F (冯艺飞), WANG X Y (王笑颖). Review on the research of flavonoids[J]. Jiangxi Chemical Industry (江西化工), 2021, 37(4): 102-104.
- [5] LUO W T (罗文涛), FENG J H (冯菊红), WANG L X (王理想), et al. Research progress in mulberry leaf flavonoids[J]. Chemistry & Bioengineering (化学与生物工程), 2021, 38(7): 8-13.
- [6] WU H L (伍宏亮), WANG S (汪盛), CHEN Z J (陈志军), et al. ER β promotes TGFBR1 expression, enhancing the proliferation and apoptosis in prostate cancer cells[J]. Journal of Youjiang Medical University for Nationalities (右江民族医学院学报), 2024, 46(4): 474-479.
- [7] LIU J J (刘娟娟), ZHANG J (张珺), YANG S P (杨韶平). Preparation and anticancer activity of isopimaric acid heterocyclic amide derivatives[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2024, 41(4): 890-894, 919.
- [8] LIN S (林思), QIN H Z (秦慧真), XU L B (许立拔), et al. Mechanism of *Stemona tuberosa* alkaloids in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of non-small cell lung cancer NCI-H460 cells[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae (中国实验方剂学杂志), 2023, 5(6): 1-10.
- [9] XIE X Y (谢小燕), SU X N (苏晓娜), WANG H M (王惠梅), et al. Genetic diversity analysis of *Zizania latifolia* by ISSR in East China based on two electrophoresis detection methods[J]. Journal of Southern Agriculture (南方农业学报), 2019, 50(12): 2638-2646.
- [10] LIU B, WANG H F, ZHANG L H, et al. New compound with DNA Topo I inhibitory activity purified from *Penicillium oxalicum* HSY05[J]. Natural Product Research, 2015, 29(23): 2197-2202.
- [11] FENG Q M (冯庆梅), CHEN G (陈刚), PEI Y H (裴月湖). Recent research progress in DNA topoisomerase I inhibitors[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University (沈阳药科大学学报), 2015, 32(11): 900-910.
- [12] XU M F, SHEN L Q, WANG K W. A new biflavonoid from *Daphniphyllum angustifolium* Hutch[J]. Fitoterapia, 2009, 80: 461-464.
- [13] MARTINS G R, DA FONSECA T S, MARTÍNEZ-FRUCTUOSO E T L, et al. Antifungal phenylpropanoid glycosides from *Lippia rubella*[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82: 566-572.
- [14] WANG K H (王康华), ZHANG Y T (张英涛), YANG X W (杨秀伟), et al. Chemical constituents from *Fukeqianjin* formula[J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2018, 43(11): 2300-2312.
- [15] LAN Y H, CHI X F, ZHOU G Y, et al. Antioxidants from *Pedicularis longiflora* var. tubiformis (Klotzsch) P. C. Tsoong[J]. Records Natural Products, 2018, 12(4): 332-339.
- [16] SEO H S, JIN M K, CHOI H S, et al. Induction of caspase-dependent extrinsic apoptosis by apigenin through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells[J]. Bioscience Reports, 2015, 35(6): 1-8.
- [17] MAGGIONO D, GARAVELLO W, RIGOLIO R, et al. Apigenin impairs oral squamous cell carcinoma growth *in vitro* inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. International Journal of Oncology, 2013, 43(5): 1675-1682.
- [18] MULANI S K, GUH J H, MONG K K. A general synthetic strategy and the anti-proliferation properties on prostate cancer cell lines for natural phenylethanoid glycosides[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, 12(18): 2926-2937.
- [19] ZHANG F X, JIA Z J, DENG Z Y, et al. *In vitro* modulation of telomerase activity, telomere length and cell cycle in MKN45 cells by verbascoside[J]. Planta Medica, 2002, 68(2): 115-118.
- [20] XU Z C (许志诚). Study on antioxidant activity and lipid regulation mechanism of black wolfberry leaf tea extract[D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学), 2018.
- [21] WANG Z Z (王争争), ZHAO Y (赵邑), PAN W W (潘微微), et al. Studies on the anti-tumor activity of flavonoids from Youzao JuJube[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报), 2023, 23(3): 90-98.