

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202108034

刘芳, 张远芳, 李玲环, 等. 2023. 婆婆纳抗黑色素瘤物质基础的初步研究 [J]. 广西植物, 43(1): 60–67.

LIU F, ZHANG YF, LI LH, et al., 2023. Preliminary study on the material basis of anti-melanoma activity of *Veronica didyma* [J]. *Guihaia*, 43(1): 60–67.

婆婆纳抗黑色素瘤物质基础的初步研究

刘芳¹, 张远芳¹, 李玲环², 彭忠禄¹, 王俊杰^{1*}

(1. 湘南学院 药学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市科技局, 湖南 郴州 423000)

摘要: 为明确婆婆纳 (*Veronica didyma*) 抗黑色素瘤活性部位及物质基础, 该研究采用 CCK8 法评价了婆婆纳乙醇提取物 4 个萃取部位 (石油醚层、乙酸乙酯层、正丁醇层、水层) 乙醇提取物及单体化合物对黑色素瘤细胞株 (B16 和 A375) 细胞的增殖抑制作用, 并使用植物化学方法和技术对活性部位的化学成分进行系统分离纯化。结果表明: (1) 乙酸乙酯萃取部位 (ethyl acetate extract, PPNE) 较其他样品有更好抑制 B16 细胞和 A375 细胞增殖的作用, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 值分别为 $0.177 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (B16)、 $2.826 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (A375)。(2) 从活性部位 PPNE 中得到 7 个单体化合物, 即对羟基苯甲醛 (1)、胡黄连苷 II (2)、isoscuteallarein 7-*O*-(6''-*O*-acetyl)- β -allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside (3)、3'-hydroxyl-4'-*O*-methylisoscuteallarein 7-*O*-[6''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (4)、6-*O*-veratroylcatalposide (5)、veronicoside (6)、isoscuteallarein 4'-methyl ether 7-*O*-(6''-*O*-acetyl)- β -allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside (7)。(3) 7 个化合物均为首次从该植物中分离得到, HPLC 分析结果显示这 7 个化合物是 PPNE 的较大量成分。(4) 除化合物 1 外, 其余 6 个单体化合物均有较好抑制黑色素瘤细胞增殖的作用, 该文首次报道了化合物 3、4、7 的抗黑色素瘤活性。综上认为, 婆婆纳的乙酸乙酯萃取部位 (PPNE) 为其抗黑色素瘤活性部位, 环烯醚萜类化合物 2、5、6 和黄酮类化合物 3、4、7 可能为 PPNE 抗黑色素瘤的活性基础。该研究结果为合理利用其资源奠定了科学基础。

关键词: 婆婆纳, 化学成分, 黑色素瘤, 分离纯化, 活性导向

中图分类号: Q946.91 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2023)01-0060-08

Preliminary study on the material basis of anti-melanoma activity of *Veronica didyma*

LIU Fang¹, ZHANG Yuanfang¹, LI Linghuan², PENG Zhonglu¹, WANG Junjie^{1*}

(1. College of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423000, Hunan, China; 2. Chenzhou Science and Technology Bureau, Chenzhou 423000, Hunan, China)

Abstract: To clarify the anti-melanoma active extract and material basis of *Veronica didyma*, CCK8 method was used to evaluate the inhibitory effects of four extracts (petroleum ether extract, ethyl acetate extract, *n*-butanol extract, water

收稿日期: 2022-01-13

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年项目 (19B522); 郴州市科技计划项目 (jsyf201805); 湖南省药理学应用特色学科资金项目 (湘教通[2018]469号)。

第一作者: 刘芳 (1987-), 博士, 讲师, 主要从事天然产物化学研究, (E-mail) liufang0378@163.com。

*通信作者: 王俊杰, 教授, 主要从事中药物质基础和中药药理研究, (E-mail) xiangnanyaoxue@163.com。

extract), ethanol extracts and monomer compounds on the proliferation of melanoma cell lines (B16 and A375). The chemical constituents of the active fraction were systematically separated and purified by phytochemical techniques and methods. The results were as follows: (1) Ethyl acetate extract (PPNE) had a better inhibitory effect on the proliferation of B16 and A375 cells than other samples, and $IC_{50} = 0.177 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (B16), $IC_{50} = 2.826 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (A375), respectively. (2) Seven monomer compounds were obtained from PPNE were *p*-hydroxybenzaldehyde (**1**), picroside II (**2**), isoscutellarein 7-*O*-(6''-*o*-acetyl)- β -allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside (**3**), 3'-hydroxyl-4'-*O*-methylisoscuteallarein 7-*O*-[6''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (**4**), 6-*O*-veratroylcatalposide (**5**), veronicoside (**6**), isoscutellarein 4'-methyl ether 7-*O*-(6''-*O*-acetyl)- β -allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside (**7**). (3) Seven compounds were isolated from this plant for the first time, and HPLC showed that these seven compounds were the major components of PPNE. (4) Except Compound **1**, the other six monomers all had good inhibitory effects on the proliferation of melanoma cells, and the anti-melanoma activities of compounds **3**, **4** and **7** were reported for the first time. Based on these results, PPNE of *V. didyma* is an anti-melanoma active fraction, iridoids (compounds **2**, **5**, **6**) and flavonoids (compounds **3**, **4**, **7**) may be the basis of anti-melanoma activity of PPNE. The results of this study will lay scientific foundation for the rational utilization of *V. didyma*'s resources.

Key words: *Veronica didyma* Tenore, chemical composition, melanoma, separation and purification, bioassay-guided

玄参科 (Scrophulariaceae) 婆婆纳属 (*Veronica* L.) 植物约有 250 种, 广布全球, 主产于亚欧大陆 (Salehi et al., 2019)。目前, 在我国发现的婆婆纳属植物有 60 余种, 主要分布于西南地区, 多数为传统药用植物, 用于治疗感冒、咳血、疝气、止血活血、清热解毒、生肌、祛风利湿等多种疾病 (Xue et al., 2019)。近年来, 由于婆婆纳属植物显著的传统疗效, 因此国内外学者对该属植物的生物活性研究不断增多, 并发现其在抗氧化 (Zivkovic et al., 2017)、抗病毒 (Sharifi-Rad et al., 2018)、抗肿瘤 (滕杰等, 2008)、抗炎镇痛 (Kim et al., 2017)、保肝 (Tan et al., 2017; Lu et al., 2021)、抑菌 (Sharifi-Rad et al., 2018) 等方面均有良好的活性。该属植物在抗恶性肿瘤方面活性显著, 如阿拉伯婆婆纳和常春藤婆婆纳的甲醇提取物对口腔上皮癌细胞 (KB 细胞) 和 B16 黑色素瘤细胞的生长均具有显著的抑制作用 (Harput et al., 2002)。尽管婆婆纳属植物具有成为抗癌药物的优质潜能, 但其活性基础目前尚不清楚。

婆婆纳 (*Veronica didyma*) 为婆婆纳属植物中具代表性的传统药用植物之一, 全草入药, 具有解毒消肿、凉血止血、理气止痛等功效, 用于治疗痈肿、吐血、疝气、睾丸炎、白带等多种疾病, 其物质资源极为丰富, 在我国各地均有分布 (张仁波和窦全丽, 2009)。本课题组前期研究发现, 婆婆纳醇提取物具有较好的抑制 B16 细胞增殖作用, 其 $IC_{50} = 1.955 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而文献调研结果显示, 迄今

为止未见对婆婆纳植物化学成分的研究报道, 并且活性基础不明。因此, 基于以上报道和本课题组前期研究基础, 为更好地利用婆婆纳资源, 本研究以阐明婆婆纳抗黑色素瘤的活性部位及活性成分为目的, 采用植物化学分离纯化技术, 以对 B16 和 A375 黑色素瘤细胞株生长的抑制作用为导向, 拟探讨以下问题: (1) 婆婆纳醇提取物抗黑色素瘤的活性部位; (2) 婆婆纳抗黑色素瘤活性部位的物质基础; (3) 物质基础中单体化学成分的抗黑色素瘤活性评价。本研究结果可为合理开发利用婆婆纳植物资源提供科学依据。

1 材料与仪器

所用材料于 2020 年 4 月采自湖南省郴州市苏仙区, 经湘南学院药用植物学教师刘鹏老师鉴定为玄参科婆婆纳属植物婆婆纳 (*Veronica didyma*) 的全草, 标本 (PPN202005CZ) 保存于湘南学院的湖南省教育厅天然产物心脑血管重点实验室。

核磁共振仪 (德国 Bruker AM-400 spectrometer、Bruker AM-500 spectrometer), 高效液相色谱仪 (岛津 LC-20A 系列), 制备色谱仪 (岛津 Essentia Prep LC-16P 系列), 多功能酶标仪 (CytationTM 3), 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific, Form 311), 生物安全柜 (Thermo Fisher Scientific, MSC-Advantage 1.8), 葡聚糖凝胶 (Sephadex LH-20, Lipophilic Sephadex LH-20, Pharmacia), 预制硅胶板 (青岛海

洋化工,GF254),制备 C_{18} 色谱柱 (YMC-Pack ODS-A, 250 mm × 20 mm, 5 μ m, YMC Co., Ltd, Kyoto, Japan),甲醇(色谱纯,麦克林),其他常规试剂(分析纯,国药集团)。小鼠黑色素瘤细胞株 B16(武汉博士德),人黑色素瘤细胞株 A375(武汉博士德),CCK8 试剂盒(上海生工),DMSO(Biosharp),胎牛血清(Gibco),培养基 RPMI-1640(HyClone),胰酶(Gibco)。

2 实验方法

2.1 提取和分离

将新鲜婆婆纳全草晾干,取 1 kg 干燥全草粉碎,用 90%乙醇室温浸提 3 次,每次 72 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味,加纯水稀释粉碎,最终体积为 1 L。经水分散后的提取物依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,少量多次,至萃取液颜色变淡为止,减压回收萃取溶剂,得 7.7 g 的石油醚层、13.30 g 的乙酸乙酯层、9.30 g 的正丁醇层、25.46 g 的水层样品。

通过活性评价发现,乙酸乙酯层样品即乙酸乙酯萃取部位(PPNE)较其他样品具有突出的抑制黑色素瘤细胞 B16 和 A375 的活性,对 PPNE 样品进行系统的分离纯化。取 PPNE(12.56 g)样品用适量甲醇溶解,经 0.45 μ m 微孔滤头过滤,反向硅胶(ODS)拌样,以甲醇:水(1:1~1:0)为洗脱剂进行 ODS 柱层析,经高效液相色谱(HPLC)和薄层色谱(TLC)检测,合并馏分,得 A、B、C、D、E 五个部分。A 部分,采用葡聚糖凝胶柱(HL-20,洗脱剂为甲醇和水系统)进行反复的柱层析,得化合物 1(45 mg)和化合物 2(39 mg)。B 部分,采用葡聚糖凝胶柱(HL-20,洗脱剂为甲醇和水系统)进行反复的柱层析,得化合物 5(19 mg)。C 部分,采用葡聚糖凝胶柱(HL-20,洗脱剂为甲醇和水系统)进行反复的柱层析,得化合物 6(15 mg),分别合并凝胶柱层析后含有化合物 3 和化合物 4 的馏分,采用半制备色谱进行制备(检测波长为 254 nm,甲醇:水为 55:45),制备后采用凝胶柱层析纯化得化合物 3(21 mg)和化合物 4(19 mg)。E 部分,采用葡聚糖凝胶柱(HL-20,洗脱剂为甲醇和水系统)柱层析后,采用半制备色谱进行制备[检测波长为 254 nm,甲醇:水(65:35)],制备后采用凝胶柱层析纯化得化合物 7(35 mg)。

2.2 HPLC 分析

采用 HPLC 对活性较好的乙酸乙酯层(PPNE)进行分析。色谱条件:色谱柱 Kromasil 100-5-C18 柱(4.6 mm × 250 mm),检测波长为 276 nm,流动相(0.1%甲酸 A~乙腈 B),流速为 1 mL · min⁻¹,进样体积为 5 μ L,采用梯度洗脱,平衡柱子采用 15% B。洗脱过程为 0~5 min,30% B;5~10 min,30%~40%;10~20 min,40% B;20~30 min,40%~50% B;40~45 min,50%~60% B;45~50 min,60%~98% B;50~55 min,98% B;55~60 min,15% B。PPNE 的 HPLC 如图 2 所示。

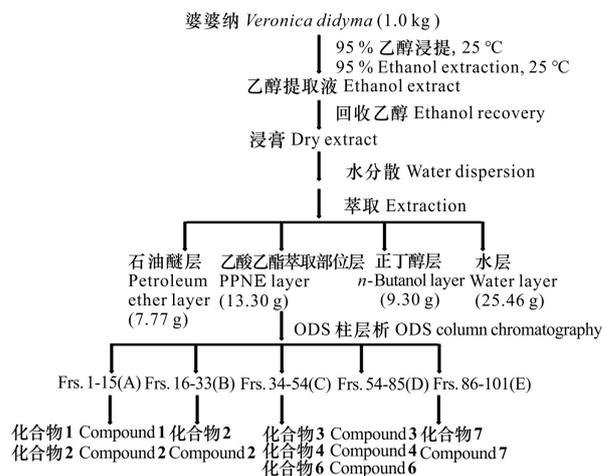


图 1 婆婆纳的分离纯化流程图

Fig. 1 Separation and purification flow chart of *Veronica didyma*

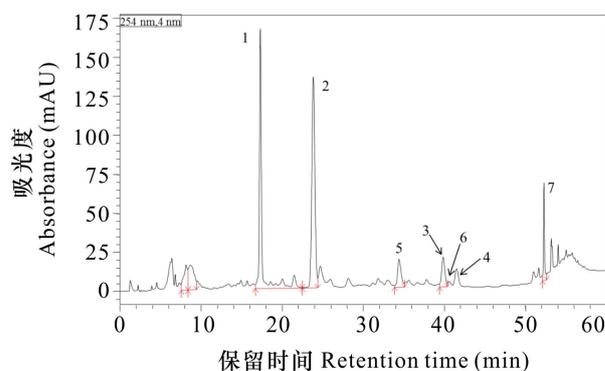


图 2 乙酸乙酯萃取部位的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC diagram of ethyl acetate extract (PPNE)

2.3 细胞培养

细胞接种于直径为 6 cm 的细胞培养皿中,用含 10%胎牛血清、1%双抗的 RPMI-1640 培养基在

37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中进行培养,待细胞贴壁生长融合到 85%左右时,采用胰酶消化传代,继续培养。

2.4 用 CCK8 法检测婆婆纳样品对 B16 和 A375 的增殖抑制作用

取处于对数生长期的细胞,用胰酶消化后离心得细胞沉淀,用培养基稀释成 1×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的单细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,置于 37 °C、5%的 CO₂培养箱中培养 12 h 后,将培养液换成含有婆婆纳提取物或单体化合物的培养液继续培养,每孔 100 μL ;用含药培养基继续培养 24 h,换新鲜培养液,同时每孔加 10 μL CCK8,振荡混合均匀,继续培养 4 h,用多功能酶标仪测吸光度值,测定波长为 450 nm。设置给药孔(A1)、细胞空白孔(A2)、无细胞空白孔(A0),5 个复孔。

细胞增殖的抑制率(%) = $\{ [(A2 - A0) - (A1 - A0)] / (A2 - A0) \} \times 100$ 。

3 结果与分析

3.1 对婆婆纳乙醇浸提物及不同萃取部位的抗黑色素瘤活性评价

婆婆纳乙醇浸提物及不同溶剂萃取部位对黑色素瘤细胞 B16 和 A375 增殖的抑制结果如表 1 所示。从整体上来看:(1)婆婆纳样品对 B16 细胞增殖的抑制作用强于 A375 细胞;(2)乙酸乙酯部位的抑制黑色素瘤的作用最强(样品浓度为 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其 B16 细胞的 IC₅₀ 值为 0.177 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),石油醚层次之;(3)婆婆纳乙醇提取物有抑制黑色素瘤的作用,尤其是对 B16 细胞的抑制作用较强(样品浓度为 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,其 B16 细胞的 IC₅₀ 值为 1.955 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),其他水层、正丁醇层抑制黑色素瘤的作用较弱或基本无抑制作用。由此可见,乙酸乙酯部位是婆婆纳抑制黑色素瘤细胞增殖的活性部位,婆婆纳抗黑色素瘤的活性成分主要分布在乙酸乙酯部位和石油醚部位,尤其是乙酸乙酯部位。

3.2 婆婆纳乙酸乙酯萃取部位 (PPNE) 的化学成分

通过系统的分离纯化,我们从乙酸乙酯层分离得到了 7 个化合物,鉴定结果:化合物 1 为对羟基苯甲醛,化合物 2 为胡黄连苷 II,化合物 3 为 isoscutellarein 7-O-(6''-O-acetyl)- β -allopyranosyl (1''' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside, 化合物 4 为 3'-hydroxy-4'-O-methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl-

表 1 婆婆纳各样品对黑色素瘤细胞的抑制作用
Table 1 Inhibitory effects of different samples of *Veronica didyma* on melanoma cells

样品 Sample	浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	不同肿瘤细胞的 抑制率 Different tumor cell inhibition rate (%)		半抑制浓度 IC ₅₀ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
		B16	A375	B16	A375
婆婆纳醇提取物 Ethanol extract	1	33.95± 5.44	—		
	4	59.30± 6.00	-16.22± 2.29		
	8	93.55± 3.21	25.89± 3.40	1.955	
水层 Water layer	1	0.29± 3.97	—		
	4	5.25± 5.42	-13.60± 5.82		
正丁醇层 n-Butanol layer	1	-6.42± 6.21	—		
	4	4.52± 3.67	-22.43± 6.03		
乙酸乙酯层 Ethyl acetate layer	1	91.57± 1.50	20.04± 4.17		
	4	97.90± 0.84	59.15± 3.32		
	8	99.92± 1.44	79.55± 1.26	0.177	2.822
石油醚层 Petroleum ether layer	1	35.49± 1.91	14.89± 5.22	4.248	
	4	92.70± 4.80	55.25± 3.03		
	8	96.67± 0.90	61.97± 1.91	1.316	

β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside, 化合物 5 为 6-O-veratroylcatalposide, 化合物 6 为 veronicoside, 化合物 7 为 isoscutellarein 4'-methyl ether 7-O-(6'''-O-acetyl)-ballopyranosyl (1''' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside。其化学结构如图 3 所示,化合物的 ¹³C-NMR 数据如表 2 所示。化合物 2、5、6 属于环烯醚萜苷类化合物,化合物 3、4、7 属于黄酮苷类化合物。

化合物 1 白色粉末,易溶于甲醇,¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.94(1H, s, -CHO), 7.78(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 6.81(2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 131.99(C-1), 131.95(C-2, 6), 115.53(C-3, 5), 161.98(C-4), 189.29(-CHO)。以上数据与文献(黄宇飞等,2020)报道一致,化合物 1 鉴定

表 2 化合物 3-7 的 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据
Table 2 $^{13}\text{C-NMR}$ spectral data of compounds 3-7

碳 Carbon	化合物 3 Compound 3	化合物 4 Compound 4	化合物 7 Compound 7	碳 Carbon	化合物 5 Compound 5	化合物 6 Compound 6
C-2	164.55	164.41	164.12	C-2	93.38	93.39
C-3	103.14	103.82	103.84	C-3	141.57	141.64
C-4	182.86	182.83	182.91	C-4	102.24	102.14
C-5	152.68	151.14	152.69	C-5	35.63	35.64
C-6	99.85	100.38	99.90	C-6	80.37	80.63
C-7	151.00	152.67	151.11	C-7	58.63	58.57
C-8	127.93	127.98	127.98	C-8	66.35	66.36
C-9	144.21	144.37	144.25	C-9	42.27	42.27
C-10	106.00	106.00	106.04	C-10	58.86	58.86
C-1'	121.93	123.54	123.33	Glu-1	98.29	98.32
C-2'	129.13	113.66	128.96	Glu-2	73.89	73.89
C-3'	116.42	147.23	115.05	Glu-3	77.94	77.93
C-4'	161.83	151.78	162.94	Glu-4	70.74	70.73
C-5'	116.42	112.54	115.05	Glu-5	76.88	76.88
C-6'	129.13	119.40	128.96	Glu-6	61.88	61.88
Glu-1	100.47	99.79	100.47	C-1'	123.96	134.14
Glu-2	83.10	82.66	83.00	C-2'	112.21	129.83
Glu-3	76.05	76.01	76.05	C-3'	148.95	129.33
Glu-4	69.69	69.68	69.70	C-4'	153.7	129.83
Glu-5	77.60	77.53	77.60	C-5'	111.62	129.33
Glu-6	61.01	60.99	61.02	C-6'	121.81	129.72
All-1	103.07	102.74	103.00	CO	165.96	166.20
All-2	71.93	71.89	71.93	3'-OCH ₃	56.23	
All-3	71.25	71.29	71.26	4'-OCH ₃	56.03	
All-4	67.27	67.39	67.32			
All-5	72.02	71.97	72.02			
All-6	64.00	63.92	64.01			
-OCH ₃		56.25	56.05			
Acetyl	20.95	20.90	20.94			
	170.80	170.76	170.80			

为对羟基苯甲醛。

化合物 2 无色方晶,溶于甲醇,和胡黄连苷 II 对照品一起进行 HPLC 分析,不同洗脱系统保留时间相同,DAD 图谱相同,混合样品在胡黄连苷 II 对照品色谱峰的位置仅有一个色谱峰,化合物 2 鉴定为胡黄连苷 II。

化合物 3 黄色粉末,溶于甲醇, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.85 (1H, s, H-3), 6.70 (1H, s, H-6), 7.98 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 7.98 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6'), 6.95 (1H,

d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 6.95 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 12.37 (1H, s, 5-OH), 5.08 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-Glu-1), 3.60 (1H, m, H-Glu-2), 3.52 (1H, m, H-Glu-3), 3.26 (1H, m, H-Glu-4), 3.46 (1H, m, H-Glu-5), 3.75 (1H, m, H-Glu-6a), 3.52 (1H, m, H-Glu-6b), 4.93 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-All-1), 3.26 (1H, m, H-All-2), 3.93 (1H, m, H-All-3), 3.43 (1H, m, H-All-4), 3.88 (1H, m, H-All-5), 4.03 (1H, m, H-All-6a), 4.02 (1H, m, H-All-6b), 1.88 (3H, s, -OAc), $^{13}\text{C-}$

NMR (125 MHz, DMSO- d_6)。以上数据与文献 (Albach et al., 2003) 一致, 故化合物 **3** 鉴定为 isoscutellarein 7-*O*-(6''-*O*-acetyl)- β -allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside。

化合物 **4** 黄色粉末, 溶于甲醇, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.81 (1H, s, H-3), 6.69 (1H, s, H-6), 7.51 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 7.12 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 12.35 (1H, s, 5-OH), 3.88 (1H, s, -OCH₃), 5.10 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-Glu-1), 3.60 (1H, m, H-Glu-2), 3.50 (1H, m, H-Glu-3), 3.25 (1H, m, H-Glu-4), 3.46 (1H, m, H-Glu-5), 3.74 (1H, m, H-Glu-6a), 3.52 (1H, m, H-Glu-6b), 4.92 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-All-1), 3.25 (1H, m, H-All-2), 3.92 (1H, m, H-All-3), 3.43 (1H, m, H-All-4), 3.88 (1H, m, H-All-5), 4.03 (1H, m, H-All-6a), 4.03 (1H, m, H-All-6b), 1.88 (3H, s, OAc), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6)。以上数据与文献 (Lenherr et al., 1987) 一致, 故化合物 **4** 鉴定为 3'-hydroxy-4'-*O*-methylisoscutellarein 7-*O*-[6''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside。

化合物 **5** 白色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.65 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-6''), 7.47 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2''), 7.10 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5''), 6.43 (1H, dd, $J = 10.0, 1.0$ Hz, H-3), 5.14 (1H, m, H-1), 5.11 (1H, m, H-6), 5.01 (1H, m, H-4), 4.63 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.94 (1H, dd, $J = 13.5, 5.0$ Hz, H-10a), 3.74 (1H, m, H-10b), 3.74 (1H, m, H-6'a), 3.74 (1H, m, H-7), 3.43 (1H, m, H-6'b), 3.03~3.20 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 2.60 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, dd, $J = 9.0, 7.0$ Hz, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6)。以上数据与文献 (高坤等, 2003) 一致, 故化合物 **5** 鉴定为 6-*O*-veratroylcatalposide。

化合物 **6** 淡棕色粉末, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.02 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-2''), 7.70 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4''), 7.56 (2H, t, $J = 8.0$ Hz, H-3'', 5''), 6.43 (1H, dd, $J = 6.0, 1.5$ Hz, H-3), 5.14 (1H, H-1), 5.12 (1H, m, H-6), 5.01 (1H, m, H-4), 4.63 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 3.94 (1H, dd, $J = 13.3, 4.8$ Hz,

H-10a), 3.74 (1H, m, H-10b), 3.74 (1H, m, H-6'a), 3.74 (1H, br s, H-7), 3.44 (1H, m, H-6'b), 3.03~3.20 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 2.61 (1H, m, H-5), 2.50 (1H, H-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6)。以上数据与文献一致 (Kwak et al., 2009), 故化合物 **6** 鉴定为 veronicoside。

化合物 **7** 黄色粉末, 溶于甲醇, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.93 (1H, s, H-3), 6.70 (1H, s, H-6), 8.10 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2'), 8.10 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-6'), 7.13 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3'), 7.13 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 12.33 (1H, s, 5-OH), 3.87 (1H, s, -OCH₃), 5.08 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-Glu-1), 3.60 (1H, m, H-Glu-2), 3.52 (1H, m, H-Glu-3), 3.25 (1H, m, H-Glu-4), 3.46 (1H, m, H-Glu-5), 3.74 (1H, m, H-Glu-6a), 3.52 (1H, m, H-Glu-6b), 4.92 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-All-1), 3.25 (1H, m, H-All-2), 3.92 (1H, m, H-All-3), 3.43 (1H, m, H-All-4), 3.88 (1H, m, H-All-5), 4.03 (1H, m, H-All-6a), 4.03 (1H, m, H-All-6b), 1.88 (3H, s, -OAc); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6)。以上数据与文献 (Nugroho et al., 2008) 一致, 故化合物 **7** 鉴定为 isoscutellarein 4'-methyl ether 7-*O*-(6''-*O*-acetyl)-allopyranosyl (1'' \rightarrow 2'')- β -glucopyranoside。

3.3 单体化合物的抗黑色素瘤活性评价

从 PPNE 样品中分离纯化得到 7 个较大量单体成分, 对这 7 个单体成分的抗 B16 和 A375 细胞增殖活性进行评价, 结果如表 3 所示。除化合物 **1** 外, 化合物 **2-7** 对 B16 和 A375 细胞株的增殖均有良好的抑制 B16 和 A375 细胞增殖的作用, 并且对 B16 细胞增殖的抑制作用强于 A375 细胞, 此结果与乙醇提取物和 PPNE 的活性一致。黄酮苷类化合物 **3, 4, 7** 对 B16 和 A375 细胞增殖的抑制作用弱于环烯醚萜苷类化合物 **2, 5, 6** 的抑制作用。可见, 环烯醚萜类和黄酮类物质可能是婆婆纳抗黑色素瘤的活性基础。

4 讨论与结论

从婆婆纳抗黑色素瘤的活性部位 PPNE 层得到 7 个较大量化合物, 均为首次从婆婆纳植物中得到。本研究首次报道了黄酮类化合物 **3, 4, 7**, 环

表 3 单体化合物对黑色素瘤细胞的抑制作用

Table 3 Inhibitory effect of compounds of *Veronica didyma* on melanoma cells

化合物 序号 Compound No.	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	浓度 Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	不同肿瘤细胞 的抑制率 Different tumor cells inhibition rate (%)	
			A375	B16
1	100	818.87	1.27±3.84	2.03±2.44
3	50	76.62	38.78±2.21	82.75±1.04
	100	153.24	47.94±1.40	89.52±1.99
4	50	73.31	43.96±1.85	76.60±2.37
	100	146.63	50.63±2.29	79.43±1.62
7	50	75.08	57.41±3.67	82.36±1.94
	100	150.15	65.12±2.16	88.91±1.63
2	50	97.57	58.29±1.26	89.62±3.12
	100	195.14	67.63±0.96	96.49±2.34
5	50	95.06	53.96±2.70	91.06±1.75
	100	190.11	61.76±3.33	97.04±1.97
6	50	107.30	53.49±3.06	93.36±2.26
	100	214.59	54.27±3.08	96.08±0.89

烯醚萜类化合物 **5** 具有良好抗黑色素瘤活性,并且本文首次对化合物 **3**、**4**、**5** 的活性进行了报道。化合物 **5** 为 6-O-veratroylcatalposide, 最早从植物 *Gardenia jasminoides* 中分离得到 (Lee et al., 1987), 笔者之前未见其相关活性数据。化合物 **4** 较化合物 **3** 黄酮母核 C 环上多个甲氧基, 化合物 **3** 和化合物 **4** 最早由 Lenherr 等人从唇形科刺蕊草属植物 *Stachys recta* 中得到 (Lenherr et al., 1984); 其后化合物 **3** 在其他植物中也有获得, 如植物 *Stachys anisochila*、长果婆婆纳等, 化合物 **4** 从唇形科刺蕊草属植物 *Stachys anisochila* 中也曾获得, 笔者之前未见化合物 **3** 和化合物 **4** 的活性报道。化合物 **7** 较化合物 **3** 黄酮母核 C 环上多了个甲氧基, 最早从植物 *Veronica filiformis* 的全草中获得 (Chari et al., 1981), 其后化合物 **7** 曾从植物水苏 (*Stachys japonica*) 中分离得到, 具有显著抑制乙酰胆碱酯酶 ($\text{IC}_{50} = 39.94 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和丁酰酯酶活性的作用 ($\text{IC}_{50} = 86.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) (Nugroho et al., 2018)。

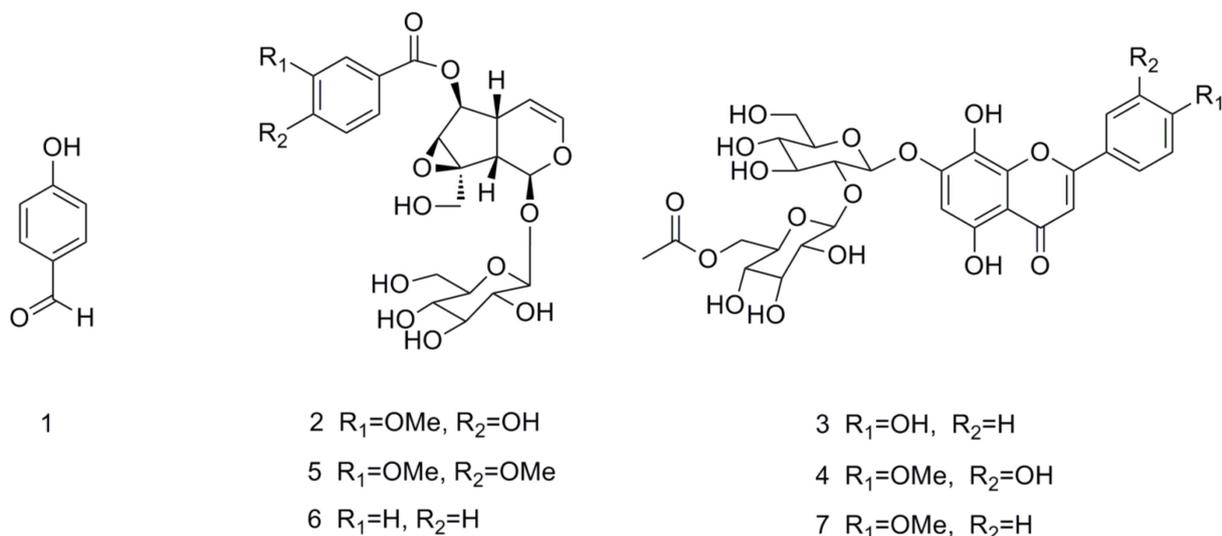


图 3 乙酸乙酯萃取部位 (PPNE) 中化合物的化学结构图

Fig. 3 Compound structures from PPNE

对婆婆纳不同萃取部位的抗黑色素瘤活性进行评价, 结果显示婆婆纳抗黑色素瘤的活性成分主要分布在乙酸乙酯萃取部位 (PPNE) 层和石油醚部位, 尤其是 PPNE 层。PPNE 层得到的单体化合物进行抗黑色素瘤活性评价, 结果显示环烯醚萜类化合物 **2**、**5**、**6** 具有显著抑制黑色素瘤细胞增殖作用, 当细胞培养液中药物浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

时, 其对 B16 细胞的抑制率分别为 89.62%、91.62%、93.36%, 对 A375 细胞的抑制率分别为 58.29%、53.96%、53.49%; 黄酮类化合物 **3**、**4**、**7** 也具有较好的抑制 B16 和 A375 增殖的作用, 黄酮苷类化合物对 B16 增殖的抑制作用稍弱于环烯醚萜苷类化合物, 对 A375 增殖的抑制作用同环烯醚萜苷类化合物类似。综上所述, 婆婆纳醇提取物的

PPNE 层为婆婆纳的抑制黑色素瘤细胞增殖的活性部位, 环烯醚萜类化合物和黄酮类化合物均为活性部位抑制黑色素瘤细胞增殖的活性物质基础, 尤其是环烯醚萜类化合物。活性机制的初步研究发现活性部位和活性单体化合物可以抑制黑色素瘤细胞的迁移和侵袭, 但具体机制还有待进一步的研究和验证。

参考文献:

- ALBACH DC, GRAYER RJ, JENSEN SR, et al., 2003. Acylated flavone glycosides from *Veronica* [J]. *Phytochemistry*, 64: 1295-1301.
- CHARI VM, GRAYER-BARKMEIJER RJ, HARBORNE JB, et al., 1981. An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filiformis* [J]. *Phytochemistry*, 20(8): 1977-1979.
- GAO K, LI XQ, LIU A, et al., 2003. Chemical constituents of *Veronica ciliate*, as a psychrophyte from Northwest China [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 23(4): 633-636. [高坤, 李旭琴, 刘安, 等, 2003. 西北高寒植物长果婆婆纳的化学成分 [J]. *西北植物学报*, 23(4): 633-636.]
- HANG YF, ZHANG N, ZHOU ZY, et al., 2020. Phenolic constituents from *Kalimeris shimadae* and their antitumor activity [J]. *Chin Trad Patent Med*, 42(11): 2922-2926. [黄宇飞, 张楠, 周忠玉, 等, 2020. 毡毛马兰酚性成分及其抗肿瘤活性 [J]. *中成药*, 42(11): 2922-2926.]
- HARPUT US, SARACOGLU I, INOUE M, et al., 2002. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of five *Veronica* species [J]. *Biol Pharm Bull*, 25(4): 483-486.
- KIM JH, HWANG DK, MOON JY, et al., 2017. Multiple UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase enzymes are responsible for the metabolism of verproside in human liver preparations [J]. *Molecules*, 22(4): 670.
- KWAK JH, KIM HJ, LEE KH, et al., 2009. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrine* [J]. *Arch Pharm Res*, 32(2): 207-213.
- LU Q, TAN S, GU W, et al., 2021. Phytochemical composition, isolation and hepatoprotective activity of active fraction from *Veronica ciliata* against acetaminophen-induced acute liver injury via p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 270: 113775.
- LENHERR A, MABRY TJ, 1987. Acetylated allose-containing flavonoid glycosides from *Stachys anisochila* [J]. *Phytochemistry*, 26(4): 1185-1188.
- LEE SY, YU SJ, CHI HJ, 1987. Two new iridoid glycosides from *Gardenia jasminoides* fruits [J]. *Korean J Pharmacol*, 18: 168-171.
- NUGROHO A, CHOI JS, SEONG SH, et al., 2018. Isolation of flavonoid glycosides with cholinesterase inhibition activity and quantification from *Stachys japonica* [J]. *Nat Prod Sci*, 24(4): 259-265.
- SHARIFI-RAD J, IRITI M, SETZER WN, et al., 2018. Antiviral activity of *Veronica persica* Poir. on herpes virus infection [J]. *Cell Mol Biol*, 64(8): 11-17.
- SHARIFI-RAD J, TAYEBOON GS, NIKNAM F, et al., 2018. *Veronica persica* Poir. extract-antibacterial, antifungal and scolicidal activities, and inhibitory potential on acetylcholinesterase, tyrosinase, lipoxygenase and xanthine oxidase [J]. *Cell Mol Biol*, 64(8): 50-56.
- SALEHI B, SHETTY MS, KUMAR N, et al., 2019. *Veronica* plants-drifting from farm to traditional healing, food application, and phytopharmacology [J]. *Molecules*, 24(13): 1-35.
- STOJKOVIC DS, ZIVKOVIC J, SOKOVIC M, et al., 2013. Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system [J]. *Food Chem Toxicol*, 55: 209-213.
- TENG J, LI HQ, YAO Z, et al., 2008. Anticancer activity of diterpenes from *Veronica sibirica in vitro* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 39(7): 967-970. [滕杰, 李会强, 姚智, 等, 2008. 轮叶婆婆纳的抗肿瘤活性二萜成分研究 [J]. *中草药*, 39(7): 967-970.]
- TAN S, LU Q, SHU Y, et al., 2017. Iridoid glycosides fraction isolated from *Veronica ciliata* Fisch. protects against acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Evid-Based Compl Altern Med*: 6106572.
- XUE H, CHEN KX, ZHANG LQ, et al., 2019. Review of the ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Veronica* [J]. *Am J Chin Med*, 47(6): 1193-1221.
- ZIVKOVIC JČ, BARREIRA JCM, ŠAVIKIN KP, et al., 2017. Chemical profiling and assessment of antineurodegenerative and antioxidant properties of *Veronica teucrium* L. and *Veronica jacquinii* Baumg [J]. *Chem Biodivers*, 14(8): 1-11.
- ZHANG RB, DOU QL, 2009. Research progress on medicinal plants of *Veronica* in China [J]. *Sci Technol Inf*, 31: 242, 244. [张仁波, 窦全丽, 2009. 国内婆婆纳属药用植物研究进展 [J]. *科技资讯*, 31: 242, 244.]

(责任编辑 蒋巧媛 邓斯丽)