



山胡椒抗肿瘤转移化学成分研究

王然, 唐生安, 翟慧媛, 段宏泉*

(天津医科大学药学院基础医学研究中心, 天津 300070)

[摘要] 目的:研究山胡椒 *Lindera glauca* 中的化学成分及其抗肿瘤转移活性。方法:综合运用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、HPLC 制备色谱等多种色谱法分离纯化山胡椒中的化学成分;采用 NMR 等波谱学方法鉴定化合物结构,进一步以 Transwell 趋化实验方法测定化合物抗肿瘤转移作用。结果:从山胡椒乙醇提取物中分离得到 10 个化合物,分别为樟苍碱(1),*N*-甲基樟苍碱(2),瑞枯灵(3),紫堇碱(4),*N*-反式阿魏酸酐酰胺(5),*N*-顺式阿魏酸酐酰胺(6),芒籽香碱(7),降异紫堇定碱(8),[9,9,9-²H₃]-(¹S*,³S*,⁴S*,⁸S*)-*p*-Menthane-3,8-diol(9),[9,9,9-²H₃]-(¹S*,³R*,⁴S*,⁸S*)-*p*-Menthane-3,8-diol(10)。抗肿瘤转移实验结果表明化合物 1,2,4,5,7 和 9 均有明确的抗肿瘤转移作用,其中化合物 1,4 和 5 的抗肿瘤转移活性较强。结论:化合物 3 为首次从该植物中分离得到,化合物 9,10 为首次从该属植物中分离得到;化合物 1,4 和 5 的抗肿瘤转移活性较强。

[关键词] 山胡椒;生物碱;单萜;抗肿瘤转移活性

山胡椒 *Lindera glauca* var. (Siebold et Zucc.) Blume 为樟科 Lauraceae 山胡椒属 *Lindera* 植物,多分布于长江流域以南,其根水煎服能散瘀通络,治疗跌打损伤、腹冷痛,其叶民间泡茶服用,用于预防感冒、中暑,外敷治疗疮痈肿毒^[1]。研究表明,山胡椒属植物在抗炎镇痛、抑菌、抗病毒、抗溃疡等多方面具有显著效果,可用于治疗消化系统、泌尿系统疾病及风湿性关节炎等^[1-4]。山胡椒中含有生物碱类、黄酮类、 γ -丁内酯类及倍半萜内酯类化合物等多种生物活性成分^[1,2,4],其中生物碱类和 γ -丁内酯类成分具有显著抗肿瘤活性^[1-2]。

本文对山胡椒进行了初步化学成分研究,从中分离得到了 10 个化合物,利用有机波谱技术鉴定了各化合物的结构,分别为樟苍碱(1),*N*-甲基樟苍碱(2),瑞枯灵(3),紫堇碱(4),*N*-反式阿魏酸酐酰胺(5),*N*-顺式阿魏酸酐酰胺(6),芒籽香碱(7),降异紫堇定碱(8),[9,9,9-²H₃]-(¹S*,³S*,⁴S*,⁸S*)-*p*-menthane-3,8-diol(9),[9,9,9-²H₃]-(¹S*,³R*,⁴S*,⁸S*)-*p*-menthane-3,8-diol(10)。化合物 3 为首次从该植物中分离得到,化合物 9 和 10 为首次从

该属植物中分离得到。对各化合物进行的抗肿瘤转移活性筛选表明化合物 1,2,4,5,7 和 9 均有明确的抗肿瘤转移作用,其中化合物 1,4 和 5 的抗肿瘤转移活性较强。

1 仪器、试剂及材料

核磁共振仪:Bruker AV 400 instrument(TMS 内标);液质联用色谱仪:Alliance 2695, Quattro Micro TM ESI(Waters);Agilent 7890-5975C GC/MSD(Agilent);半制备高效液相色谱仪:日本分光公司(JASCO),PU-2089(泵),RI-2031 和 UV-2075(检测器);制备 HPLC 色谱柱:YMC-Pack ODS-A SH-343-5(20 mm×250 mm),YMC-Pack Polymer C₁₈ S-10 μ m(20 mm×300 mm),GPC:Shodex(Asahipak GS-20G);凝胶柱色谱:Toyopearl HW-40C(Tosoh);氘代试剂(ALDRICH 公司);柱色谱和薄层色谱用硅胶均系青岛海洋化工厂生产,所用试剂均系分析纯。

CO₂ 细胞培养箱:HF160W(Thermo 公司);全自动酶标仪:Model 680(BIO-RAD);倒置显微镜:CKX41(Olympus);超净工作台:SW-CJ-2G(苏州净化设备有限公司);低速自动平衡离心机:B600(白洋离心机厂);蒸汽压力消毒器:YXDG02(山东新华医疗器械厂);H-DMEM 培养液:NUL0219(Hyclone 公司);Hanks 液:0089n(天津圣东生物科技发展有限公司);胎牛血清:NUC0153(Hyclone 公司);四甲基偶氮唑盐(MTT,Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO-d₆,Sigma 公司);BSA(胎牛血清白蛋白,联星生

[稿件编号] 20101007005

[基金项目] 天津基础医学研究中心 PI 项目

[通信作者] *段宏泉,Tel:(022)23542018,E-mail:duanhq@tjmu.edu.cn

[作者简介] 王然,硕士研究生,主要从事中药和天然药物活性物质的现代研究



物技术有限公司分装); EGF(CBL417F, Millipore 公司); Hu Plasma Fibronectin (NMM1604793, Millipore 公司)。

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 由天津医科大学肿瘤研究所提供。

山胡椒 *Lindera glauca* (Sieb Et Zucc.) Bl 于 2005 年 1 月采自湖北省建始县, 由中南民族大学生命科学学院万定荣教授鉴定, 标本(D20050114)存放于天津医科大学药学院。

2 提取与分离

取自然干燥的山胡椒 8 kg, 粉碎后用 95% 的乙醇加热回流提取 3 次, 每次 6 h。提取液减压浓缩, 得浸膏 770.1 g, 浸膏加水混悬后, 分别用石油醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 得石油醚提取物 15.2 g, 醋酸乙酯提取物 62.5 g, 正丁醇提取物 98.7 g。

正丁醇提取物以适量水混悬, 加浓盐酸至浓度为 1%, 离心, 上清液用氨水调节至 pH 为 10, 经醋酸乙酯萃取得提取物 21.9 g, 取 1.8 g 经凝胶柱色谱(HW-40, CH₂Cl₂-MeOH 2:1) 分离得到 4 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 4); Fr. 4(80.3 mg) 进一步经制备薄层色谱纯化, 得到化合物 1(47.2 mg) 和化合物 8(5.0 mg); Fr. 2(774.8 mg) 经凝胶渗透 HPLC(GPC, MeOH) 分离得到 Fr. 2.1 ~ 2.9, Fr. 2.2(152.9 mg) 和 2.4(72.2 mg) 分别经制备薄层色谱纯化, 得到化合物 2(46.9 mg) 和 4(11.1 mg)。Fr. 2.5(128.8 mg) 经耐碱型反相制备 HPLC(Polymer C18, MeOH-H₂O, 8:2 pH 10.2) 分离, 得到化合物 3(105.5 mg)。

醋酸乙酯提取物经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(CH₂Cl₂-MeOH, 98:2, 95:5, 9:1, 8:2, MeOH) 梯度洗脱, TLC 检测合并类似组分, 分离得到 25 个组分(Fr. 1 ~ Fr. 25); Fr. 5(2.1 g) 以凝胶柱色谱(HW-40, CH₂Cl₂-MeOH, 2:1) 分离得到组分 Fr. 5.1 ~ 5.6。Fr. 5.5(202.7 mg) 和 5.6(217.4 mg) 分别经反相制备 HPLC(ODS-A, MeOH-H₂O 6:4) 分离, 进一步经凝胶渗透 HPLC(GPC, MeOH) 纯化, 得到化合物 5(22.7 mg) 和 7(13.5 mg); Fr. 10(1.36 g) 经凝胶柱色谱(HW-40) 和凝胶渗透 HPLC(GPC, MeOH) 分离, 得到化合物 6(4.2 mg); Fr. 3(889.8 mg) 以凝胶柱色谱(HW-40, CH₂Cl₂-MeOH 2:1) 分离得到组分 Fr. 3.1 ~ 3.6, Fr. 3.3(282.8 mg) 经反相制备 HPLC(ODS-A, MeOH-H₂O 9:1) 分离得到组分 Fr. 3.3.1 ~ 3.3.4。Fr. 3.3.2(48.8 mg) 进一步经制

备薄层色谱纯化, 得到化合物 9(15.8 mg) 和化合物 10(15.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 1 浅棕色粉末。EI-MS m/z 327 ($M^{+ \cdot}$) (分子式 C₁₉H₂₁NO₄)。¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.08(1H, s, H-11), 6.78(1H, s, H-8), 6.60(1H, s, H-3), 3.89(1H, dd, $J = 13.6, 4.1$ Hz, H-6a), 3.85(3H, s, 2-OCH₃), 3.82(3H, s, 10-OCH₃), 3.67(3H, s, 1-OCH₃), 3.41-3.42(1H, m, H-5), 3.02-3.04(2H, m, H-5, 7), 2.70-2.76(3H, m, H-4, 7); ¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 152.2(C-2), 145.6(C-10), 145.2(C-9), 144.3(C-1), 129.6(C-7a), 128.8(C-3a), 127.7(C-1b), 126.8(C-1a), 123.8(C-11a), 114.2(C-8), 111.4(C-3), 110.8(C-11), 60.2(1-OCH₃), 56.0(2-OCH₃), 55.8(10-OCH₃), 53.7(C-6a), 42.9(C-5), 36.4(C-7), 28.9(C-4)。以上数据与文献[5]报道的樟苍碱基本一致, 鉴定化合物 1 为樟苍碱。

化合物 2 浅棕色粉末。EI-MS m/z 341 ($M^{+ \cdot}$) (分子式 C₂₀H₂₃NO₄)。¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.07(1H, s, H-11), 6.81(1H, s, H-8), 6.59(1H, s, H-3), 3.90(3H, s, 2-OCH₃), 3.89(3H, s, 10-OCH₃), 3.67(3H, s, 1-OCH₃), 3.18(1H, dd, $J = 13.6, 3.8$ Hz, H-6a), 3.10-2.96(3H, m, H-5, 7), 2.62 ~ 2.70(3H, m, H-4, 7), 2.55(3H, s, N-CH₃); ¹³C-NMR(CDCl₃, 100 MHz) δ : 152.0(C-2), 145.4(C-9), 145.0(C-1), 144.2(C-10), 130.0(C-7a), 128.8(C-3a), 127.1(C-1b), 127.0(C-1a), 123.8(C-11a), 114.1(C-8), 111.3(C-11), 110.3(C-3), 62.5(C-6a), 60.1(1-OCH₃), 56.0(10-OCH₃), 55.8(2-OCH₃), 53.2(C-5), 43.8(N-CH₃), 34.1(C-7), 29.0(C-4)。以上数据与文献[5]报道的 *N*-甲基樟苍碱基本一致, 鉴定化合物 2 为 *N*-甲基樟苍碱。

化合物 3 黄色粉末。EI-MS m/z 329 ($M^{+ \cdot}$) (分子式 C₁₉H₂₃NO₄)。¹H-NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.76(1H, s, H-2'), 6.72(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.57(1H, s, H-6'), 6.54(1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-5), 6.30(1H, s, H-8), 3.84(3H, s, 4'-OMe), 3.84(3H, s, 6-OMe), 3.74(1H, s, H-1), 3.21(1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-3), 3.06(1H, s, H-1a), 2.86(1H, s, H-1a), 2.84(1H, s, H-4), 2.79(1H, s, H-3), 2.60(1H, s, H-4), 2.49(3H, s, N-Me); ¹³C-NMR(CDCl₃, 100



MHz) δ : 145.5 (C-3'), 145.4 (C-6), 145.3 (C-4'), 143.6 (C-7), 132.5 (C-1'), 129.2 (C-8a), 124.4 (C-4a), 121.0 (C-6'), 115.8 (C-2'), 114.0 (C-8), 110.6 (C-5), 110.5 (C-5'), 64.4 (C-1), 55.9 (6-OMe), 55.8 (4'-OMe), 46.4 (C-3), 41.9 (N-CH₃), 40.7 (C-1a), 24.6 (C-4)。以上数据与文献[6]报道的瑞枯灵基本一致, 鉴定化合物**3**为瑞枯灵。

化合物**4** 黄色油状物。EI-MS m/z 327 (M^+) (分子式 C₁₉H₂₁NO₄)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.78 (1H, s, H-5), 6.71 (1H, s, H-1), 6.35 (1H, s, H-4), 6.27 (1H, s, H-8), 3.90 (3H, s, 6-OCH₃), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.74 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-9_{ax}), 3.35 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-10_{eq}), 3.05 (1H, dd, $J = 17.8, 5.6$ Hz, H-10_{ax}), 2.63 (2H, m, H-16), 2.49 (3H, s, N-CH₃), 1.94 (2H, m, H-15); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 180.8 (C-7), 160.9 (C-14), 151.4 (C-6), 145.8 (C-3), 145.0 (C-2), 129.4 (C-12), 129.0 (C-11), 122.7 (C-8), 118.8 (C-4), 113.6 (C-1), 107.5 (C-5), 60.8 (C-9), 56.2 (6-OCH₃), 55.1 (3-OCH₃), 45.6 (C-16), 42.2 (C-13), 41.5 (N-CH₃), 40.8 (C-15), 32.4 (C-10)。以上数据与文献[7]报道的紫堇碱基本一致, 鉴定化合物**4**为紫堇碱。

化合物**5** 黄色固体。ESI-MS m/z 314 [$M + H$]⁺ (分子式 C₁₈H₁₉NO₄)。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 7.98 (1H, s, NH), 7.33 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 7.12 (1H, s, H-5), 7.02 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 6.98 (1H, s, H-2), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6), 6.70 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-3', 5'), 6.45 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.35 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-8'), 2.66 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 165.8 (C-9), 156.1 (C-4'), 148.7 (C-3), 148.3 (C-4), 139.3 (C-7), 130.0 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 126.9 (C-1), 122.0 (C-6), 119.5 (C-8), 116.1 (C-5), 115.6 (C-3', 5'), 111.2 (C-2), 56.0 (3-OCH₃), 41.1 (C-8'), 34.9 (C-7')。以上数据与文献[8-9]报道的*N*-反式阿魏酸酪酰胺基本一致, 鉴定化合物**5**为*N*-反式阿魏酸酪酰胺。

化合物**6** 白色粉末。ESI-MS m/z 314 [$M + H$]⁺ (分子式 C₁₈H₁₉NO₄)。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 8.09 (1H, s, NH), 7.70 (1H, s, H-2), 7.10

(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6), 7.00 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-2', 6'), 6.72 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5), 6.68 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-3', 5'), 6.49 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-7), 5.78 (1H, d, $J = 12.9$ Hz, H-8), 3.75 (3H, s, 3-OCH₃), 3.28 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-8'), 2.63 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 166.7 (C-9), 156.1 (C-4'), 147.8 (C-3), 147.3 (C-4), 137.2 (C-7), 130.0 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 127.3 (C-1), 124.7 (C-6), 121.5 (C-8), 115.6 (C-3', 5'), 114.7 (C-5), 108.8 (C-2), 56.0 (3-OCH₃), 41.0 (C-8'), 37.4 (C-7')。以上数据与文献[9]报道的*N*-顺式阿魏酸酪酰胺基本一致, 鉴定化合物**6**为*N*-顺式阿魏酸酪酰胺。

化合物**7** 红色针状晶体。EI-MS m/z 337 (M^+) (分子式 C₁₉H₁₅NO₅)。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 8.82 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-5), 8.72 (1H, s, H-11), 8.05 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-4), 7.74 (1H, s, H-8), 7.63 (1H, s, H-3), 4.07 (3H, s, 10-OCH₃), 4.02 (3H, s, 2-OCH₃), 4.00 (3H, s, 1-OCH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ : 180.7 (C-7), 156.9 (C-2), 153.3 (C-10), 151.0 (C-1), 147.9 (C-9), 145.3 (C-6a), 144.9 (C-5), 135.6 (C-3a), 127.6 (C-11a), 126.9 (C-7a), 124.3 (C-4), 121.4 (C-3b), 119.2 (C-3c), 113.8 (C-8), 111.1 (C-11), 107.3 (C-3), 60.7 (2-OCH₃), 56.8 (10-OCH₃), 56.1 (1-OCH₃)。以上数据与文献[10]报道的芒籽香碱基本一致, 鉴定化合物**7**为芒籽香碱。

化合物**8** 棕色固体。EI-MS m/z 327 (M^+) (分子式 C₁₉H₂₁NO₄)。¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8), 6.72 (1H, s, H-3), 3.91 (6H, s, 2, 10-OCH₃), 3.71 (3H, s, 1-OCH₃), 3.66 (1H, m, H-6a), 3.35 (1H, dd, $J = 11.6, 4.8$ Hz, H-5a), 3.01 (1H, m, H-4a), 2.94 (1H, dd, $J = 11.6, 3.4$ Hz, H-5b), 2.79 (1H, dd, $J = 13.4, 3.8$ Hz, H-7a), 2.72 (1H, br d, $J = 15.0$ Hz, H-4b), 2.58 (1H, br t, $J = 13.2$ Hz, H-7b); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 152.1 (C-2), 149.7 (C-10), 144.3 (C-11), 142.5 (C-1), 128.9 (C-3a), 128.3 (C-1b), 127.2 (C-7a), 125.9 (C-1a), 119.8 (C-11a), 119.3 (C-8), 111.5 (C-9), 111.3 (C-3), 62.2 (1-OCH₃), 53.7 (C-6a), 41.9 (C-5), 36.1 (C-7), 26.8 (C-4)。以上数据与文献[11]报道的降



异紫堇定碱基本一致, 鉴定化合物 **8** 为降异紫堇定碱。

化合物 **9** 浅黄色固体。EI-MS m/z 157 ($M - H_2O^+$) (分子式 $C_{10}H_{20}O_2$)。 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 4.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 2.78 (2H, s, 3, 8-OH), 1.77 ~ 1.85 (3H, m, H-1, 2, 6), 1.67 ~ 1.70 (2H, m, H-5), 1.36 (3H, s, 8- CH_3), 1.23 (3H, s, H-8), 1.14 ~ 1.19 (1H, m, H-4), 1.06 (1H, m, H-2), 0.94 (1H, m, H-6), 0.88 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 73.3 (C-8), 68.1 (C-3), 48.4 (C-4), 42.5 (C-2), 34.9 (C-6), 28.9 (8- CH_3), 25.6 (C-1), 22.2 (C-7), 20.2 (C-5)。以上数据与文献[12]报道的[9, 9, 9- 2H_3]-($1S^*$, $3R^*$, $4S^*$, $8S^*$)-*p*-Menthane-3, 8-diol 基本一致, 鉴定化合物 **9** 为[9, 9, 9- 2H_3]-($1S^*$, $3R^*$, $4S^*$, $8S^*$)-*p*-menthane-3, 8-diol。

化合物 **10** 浅黄色固体。EI-MS m/z 157 ($M - H_2O^+$) (分子式 $C_{10}H_{20}O_2$)。 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 3.69-3.75 (1H, dt, $J = 4.3, 10.4$ Hz, H-3), 1.93 ~ 1.96 (1H, m, 2-H), 1.64 ~ 1.71 (2H, m, H-5, 6), 1.35 ~ 1.43 (2H, m, H-1, 4), 1.22 (6H, s, 8- CH_3), 1.02 ~ 1.11 (3H, s, H-2, 5, 6), 0.92 (3H, d, $J = 3.3$ Hz, 7- CH_3); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 75.1 (C-8), 72.9 (C-3), 53.4 (C-4), 44.6 (C-2), 34.6 (C-6), 31.4 (C-1), 30.1 (8- CH_3), 27.1 (C-5), 23.7 (8- CH_3), 21.9 (C-7)。以上数据与文献[12]报道的[9, 9, 9- 2H_3]-($1S^*$, $3S^*$, $4S^*$, $8S^*$)-*p*-Menthane-3, 8-diol 基本一致, 鉴定化合物 **10** 为[9, 9, 9- 2H_3]-($1S^*$, $3S^*$, $4S^*$, $8S^*$)-*p*-Menthane-3, 8-diol。

4 抗肿瘤转移实验

4.1 MTT 法筛选样品低细胞毒剂量 以 MTT 法^[13]测定各化合物对人乳腺癌细胞的细胞毒性, 以小于对肿瘤细胞生长抑制率 15% 的剂量为抗肿瘤转移活性筛选剂量。细胞毒性结果见表 1。

4.2 对人乳腺癌细胞趋化转移的抑制作用 原理: 在 Transwell 小室上腔直接将 8 μm 孔径滤膜安放在侵袭腔室的上下腔室之间, 肿瘤细胞在趋化因子诱导下通过变形运动穿过滤膜, 通过衡量与测试药物共培养的肿瘤细胞和空白组肿瘤细胞趋化穿过滤膜的细胞数量变化, 来表达测试药物抑制肿瘤细胞的趋化迁移能力的大小, 进而评价测试药物抗肿瘤转移的活性强弱。

表 1 化合物 **1** ~ **10** 对 MDA-MB-231 的生长抑制率

No.	质量浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	抑制率/%
1	0.8	-0.58
	4	-7.7
2	0.8	-7.96
	4	-6.0
3	0.8	7.26
	4	3.62
4	0.8	3.43
	4	7.74
5	0.8	12.24
	4	14.52
6	0.8	10.20
	4	12.33
7	0.8	2.92
	4	6.54
8	0.8	-0.66
	4	-4.77
9	0.8	5.94
	4	7.80
10	0.8	1.32
	4	2.39

实验步骤: 将 MD-MBA-231 细胞铺于 6 孔板, 置于 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 的孵箱内培养 24 h 使其贴壁, 然后加入样品, 37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 孵箱内共孵育 24 h。孵育后每孔细胞分别用 0.25% 的胰酶消化, 用含 10% FBS 的培养液终止消化, 1 300 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min, 倒出上清, 加 0.1% BM 将细胞混匀后再次 1 300 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min, 计数, 将细胞密度调成 5×10^5 , 放置在孵箱内备用。

于冰上操作配制趋化因子 EGF, 加于趋化小室的下室, 每孔 30 μL , 将包被好的膜左上剪角光面朝下铺于下室上, 放好胶垫, 固定上室, 将上述细胞悬液加入上室, 每孔 50 μL , 每个样品浓度 3 个复孔, 然后置于 CO_2 孵箱内培养 3.5 h 后, 取出下室, 刮去未趋化的细胞, 用三步染色试剂进行固定和染色, 染色后将膜用石蜡油固定, 于显微镜下计数。趋化抑制率大于 50% 的化合物为具有抗肿瘤转移活性。

趋化抑制率 =

$$\left(1 - \frac{\text{样品处理的细胞在趋化因子作用下的趋化细胞数}}{\text{正常细胞在趋化因子作用下的趋化细胞数}}\right) \times 100\%$$

实验结果见表 2。

5 结果与讨论

本文从山胡椒的醋酸乙酯层和正丁醇层提取分离得到 10 个化合物, 化合物 **3** 为首次从该植物中分



表2 化合物1~10的趋化抑制率

No.	质量浓度/mg · L ⁻¹	抑制率/%
1	0.8	23.4
	4	70.7
2	0.8	24.4
	4	58.5
3	0.8	4.21
	4	22.1
4	0.8	45.3
	4	62.1
5	0.8	12.6
	4	67.4
6	0.8	31.6
	4	37.9
7	0.8	22.5
	4	56.3
8	0.8	32.6
	4	48.4
9	0.8	39.6
	4	60.0
10	0.8	33.3
	4	48.1

1,2,4,5,7和9具有明确的抗肿瘤转移作用,其中化合物1,4和5的抗肿瘤转移活性较强,化合物1在浓度4 mg · L⁻¹下对人乳腺癌细胞趋化抑制率达到70.7%,有价值进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 陈随清,左艇. 河南山胡椒属植物资源及其药理、化学及应用研究[J]. 河南中医学院学报, 2005, 20(3):25.
[2] 张朝凤,王峥涛. 山胡椒属药用植物的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(3):230.

[3] 赵利琴. 山胡椒属萜类及其生物活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2):171.
[4] 罗镭,田景奎,杨世林. 山胡椒属药用植物化学成分研究进展[J]. 亚太传统医药, 2007, 3(10):57.
[5] 赵奇志,赵毅民,王克军. 狭叶山胡椒根中的生物碱成分[J]. 药学学报, 2005, 40(10):931.
[6] Richard H A, M Janssen, Peter Wijkens, Cor Kruk, et al. Assignments of ¹H and ¹³C-NMR resonances of some isoquinoline Alkaloids[J]. Phytochemistry, 1990, 29(10):3331.
[7] Chang Yuhchwen, Chen Chungyi, Chang Fangrong, et al. Alkaloids from *Lindera glauca* [J]. J Chie Chem Soc, 2001, 48: 811.
[8] 李海明,白虹,李巍,等. 玉竹化学成分研究[J]. 食品与药品, 2010, 12(3):102.
[9] 陈华,阿吉艾克拜尔·艾萨,李援朝,等. 短叶假木贼中化学成分的分离和结构鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18:958.
[10] 朱超兰,杨培明. 豆豉姜的化学成分分离和结构鉴定[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(8):558.
[11] Marcia L R Ferreira, Inara C de Pascoli, Isabele R Nascimento, et al. Aporphine and bisaporphine alkaloids from *Aristolochia lagosiana* var. *intermedia*[J]. Phytochemistry, 2010, 71:469.
[12] Pavel kocovsky, ghafoor ahmed, Jiris rogl, et al. New lewis-acidic nolybdenum(II) and tungsten(II) catalysts for intramolecular carb onyl ene and prins reactions. Reversal of the stereoselectivity of cyclization of citronellal[J]. J Org Chem, 1999, 64: 2765.
[13] 沈传来,王立新,许靖霞,等. MTT法在淋转和NK活性检测中的不同适用性[J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(1):50.

Studies on anti-tumor metastatic constituents from *Lindera glauca*

WANG Ran, TANG Shengan, ZHAI Huiyuan, DUAN Hongquan*

(School of Pharmaceutical Sciences, Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor metastatic constituents from *Lindera glauca*. **Method:** Constituent isolation and purification was carried by repeated column chromatography (silica gel, Toyopearl HW-40 and preparative HPLC). Their structures were elucidated on the basis of spectral data analysis. The anti-tumor metastasis assay was applied to evaluate the isolated compounds of their activities. **Result:** Ten compounds (1~10) were isolated and their structures were identified by comparison of their spectral data with literature values as follows; Laurotetanine (1), *N*-methyllaurotetanine (2), reticuline (3), pallidine (4), *N*-trans-feruloyltyramine (5), *N*-cis-feruloyltyramine (6), atheroline (7), norisocorydine (8), [9,9,9-²H₃]-¹S*,³S*,⁴S*,⁸S*)-p-menthane-3,8-diol (9), [9,9,9-²H₃]-¹S*,³R*,⁴S*,⁸S*)-p-Menthane-3,8-diol(10). Compounds 1,2,4,5,7 and 9 showed positive anti-tumor metastatic activities, and compounds 1,4, and 5 showed significant anti-tumor metastatic activities. **Conclusion:** Compound 3 was isolated from this plant for the first time. Compounds 9 and 10 were isolated from *Lindera* genus for the first time. Compounds 1,4, and 5 showed significant anti-tumor metastatic activities.

[Key words] *Lindera glauca*; alkaloid; monoterpene; anti-tumor metastatic activity

doi:10.4268/cjcm20110819

[责任编辑 丁广治]