

丛柳珊瑚 *Euplexaura rhipidalis* 中细胞毒活性二萜成分分析*

Analysis of Cytotoxic Diterpenoid Composition from the Gorgonian Coral *Euplexaura rhipidalis*

孙雪萍^{1,2},任 义³,徐 艳¹,童万平¹,王长云^{2**}

SUN Xue-ping^{1,2},REN Yi³,XU Yan¹,TONG Wan-ping¹,WANG Chang-yun²

(1. 广西海洋研究所海洋生物技术重点实验室,广西北海 536000;2. 中国海洋大学医药学院海洋药物教育部重点实验室,山东青岛 266003;3. 北海艺术设计职业学院环境艺术设计系,广西北海 536000)

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai, Guangxi, 536000, China; 2. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266003, China; 3. Environmental Art Design, Beihai Vocational Institute of Art & Design, Beihai, Guangxi, 536000, China)

摘要: 为了寻找结构新颖的海洋活性成分,对一种采自中国西沙海域丛柳珊瑚 *Euplexaura rhipidalis* 进行分离和纯化,并对获得的西松烷二萜化合物的抗肿瘤活性进行筛选,以探明该种丛柳珊瑚的活性组成成分。先利用正相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析和半制备 HPLC 等方法进行分离和纯化,再利用 NMR、MS 等波谱方法,并与文献对照确定了 3 个高氧化度的西松烷二萜类化合物,分别为 corulloidolide A (1), (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3,4-epoxycebra-7,11,15-triene (2), (-)-corulloidolide E (3); 细胞毒活性模型评价结果发现,化合物 3 表现了较强的细胞毒活性,对 5 种癌细胞肝癌 HepG2, Hep3B, 乳腺癌阿霉素耐药株 MCF-7/ADR, 前列腺癌 PC-3he, 结肠癌 HT-116 的 IC₅₀ 值都低于 10 μg/mL。表明西松烷二萜类化合物是该丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 的主要活性化合物类型之一。

关键词: 珊瑚 西松烷二萜 细胞毒活性

中图分类号: Q657.63, R284 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)04-0269-03

Abstract: The chemical constituents and their antitumor activities of Chinese gorgonian coral *Euplexaura rhipidalis* were preliminarily investigated in order to find more novel marine active ingredients. The ethanolic extract of *E. rhipidalis* was separated by repeated silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC, by which three compounds were afforded. They were elucidated as three highly oxidized cebranoid diterpenoids: corulloidolide A (1), (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3,4-epoxycebra-7,11,15-triene (2) and (-)-corulloidolide E (3) by spectroscopic methods (NMR, MS) and by comparing with literatures.

Compound 3 showed strong cytotoxicity to five strains of cancer cells including HepG2, Hep3B, MCF-7/ADR, PC-3he and HT-116 with the IC₅₀ of less than 10 μg/mL. It was proposed that cebranoid diterpenoids should be one kind of the bioactive substances of gorgonian coral *Euplexaura rhipidalis*.

Key words: *Euplexaura rhipidalis*, cebranoid diterpenoids, cytotoxicity

收稿日期: 2013-07-01

修回日期: 2013-08-26

作者简介: 孙雪萍(1982-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋天然产物研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 11107011-8); 广西科学院基本科研业务费项目(13YJ22HYS15); 广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 11107011-6)项目资助。

** 通讯作者: 王长云(1965-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事海洋天然产物研究, Email: changyun@ouc.edu.cn。

丛柳珊瑚 (*Euplexaura* sp.) 属于腔肠动物门 (Cnidaria)、珊瑚虫纲 (Anthozoa)、柳珊瑚目 (Gorgonacea)、丛柳珊瑚科 (Plexauridae)、丛柳珊瑚属 (*Euplexaura*)^[1]。国外对该属丛柳珊瑚次级代谢产物的研究主要集中在 *E. Erecta*^[2], *E. flava* (Nutting)^[3], *E. anastomosans*^[1,4] 这 3 个种, 从中分离得到的化合物包括前列腺素类、丁烯酸内酯类、半缩醛甾醇类、醌类糖苷等类型化合物, 这些化合物一般具有细胞毒活性和抗氧化等生物活性。到目前为止, 国内未见丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 化学成分的研究报道。我国南海西沙生态环境保存完整, 物种多样性丰富, 具有独特的珊瑚资源, 特别是柳珊瑚。而文献研究表明, 萜类化合物是柳珊瑚中含量最多、种类最丰富的一类化合物, 且其中一些具有强的生物活性^[5]。为了寻找结构新颖的海洋活性成分, 本文对该珊瑚进行了初步地化学成分分离纯化, 并对获得的西松烷二萜化合物的抗肿瘤活性进行筛选, 以探明该种丛柳珊瑚的活性组成成分, 为海洋药物的研究和开发提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

核磁共振波谱仪 JEOL Eclips-600 (日本电子); 质谱仪 ESI-MS Q-TOF Ultima Global GAA076 (美国 Waters 公司); 旋转蒸发器 Eyela NE-1101 (日本 Rikakikai 公司); 凝胶 Sephadex LH-20 (Amersham 公司); 柱层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 高效液相色谱仪 D-2000 Elite (Hitachi 公司); 制备柱 CNW Athena C18 (250 mm × 10 mm, 5 μm); 卤虫 (*A. salina*) 卵购于海风集团有限公司; HPLC 用色谱纯甲醇 (天津四友生物医学公司), 甲醇、氯仿、石油醚、乙酸乙酯等均为国产分析纯。

丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 样品于 2009 年 11 月采自中国西沙海域, 由中国科学院南海海洋研究所黄晖研究员鉴定, 样品保存于中国海洋大学海洋药用生物资源标本室 (编号: XS-0911-04)。

1.2 提取和分离

丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 湿重 400.0g, 经 95% 乙醇 (超声波提取 5 次, 每次 30min) 浓缩提取液得浸膏 10.0g, 浸膏用石油醚 (PE) / 乙酸乙酯 (EtOAc) 进行洗脱 (PE : EtOAc = 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 30 : 70, 5 : 95), 得到 7 个组分 Fr. 1 ~ Fr. 7。其中 Fr. 2 组分依次经过凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, PE : CHCl₃ : MeOH = 2 : 1 : 1) 和 HPLC (MeOH : H₂O = 90 : 10) 分离制备获得纯化

合物 1 (9.0mg) 和 2 (3.9mg)。Fr. 5 经过凝胶柱层析 (Sephadex LH-20, CHCl₃ : MeOH = 1 : 1) 和反相硅胶柱层析 (MeOH : H₂O = 85 : 15) 分离纯化, 获得纯化化合物 3 (5.0 mg)。

1.3 活性测试

采用 MTT 法^[6] 选择 5 种癌细胞肝癌 HepG2, Hep3B, 乳腺癌阿霉素耐药株 MCF-7/ADR, 前列腺癌 PC-3he, 结肠癌 HT-116, 对化合物 1~5 进行抗肿瘤活性筛选。

依照 Solis 改良法^[7,8], 对珊瑚的粗提物及单体化合物进行卤虫致死活性测试。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

对化合物的理化性质和波谱数据进行分析, 并与参考文献对照, 3 个化合物分别鉴定为: corulloidolide A (1)^[9], (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3, 4-epoxy-cembra-7, 11, 15-triene (2)^[10], (-)-corulloidolide E (3)^[11], 结构如图 1 所示:

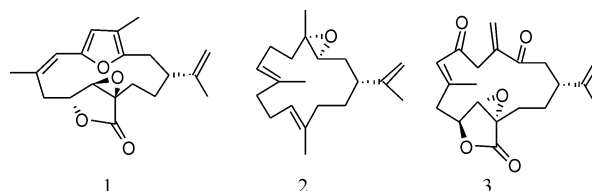


图 1 化合物 1~3 的结构式

Fig. 1 Structures of compounds 1~3

2.2 波谱数据

Corulloidolide A (1): 白色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 6.13 (1H, br s, H-7), 6.00 (1H, br s, H-5), 4.96 (1H, br s, H-16), 4.87 (1H, br s, H-16), 4.54 (1H, dd, *J* = 12.7, 4.6 Hz, H-10), 3.78 (1H, s, H-11), 3.66 (1H, t, *J* = 12.7 Hz, Hb-9), 2.61 (1H, td, *J* = 14.3, 2.7 Hz, Hb-13), 2.58 (1H, br q, *J* = 6.1 Hz, H-1), 2.49 (2H, br d, *J* = 12.6 Hz, H₂-2), 2.47 (1H, t, *J* = 9.9 Hz, Ha-9), 1.96 (3H, s, H-18), 1.90 (3H, s, H-19), 1.58 (1H, m, Ha-13), 1.52 (1H, t, *J* = 13.7 Hz, Hb-14), 1.04 (1H, t, *J* = 13.7 Hz, Ha-14); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : 172.5 (C, C-20), 149.7 (C, C-6), 148.4 (C, C-3), 144.9 (C, C-15), 126.9 (C, C-8), 118.0 (CH, C-7), 117.2 (C, C-4), 113.6 (CH, C-5), 113.3 (CH₂, C-16), 77.0 (CH, C-10), 61.5 (CH, C-11), 60.8 (C, C-12), 44.1 (CH, C-1), 36.3 (CH₂, C-9), 30.9 (CH₂, C-2), 27.9 (CH₂, C-

14), 25.1 (CH₃, C-19), 21.7 (CH₂, C-13), 19.4 (CH₃, C-17), 19.6 (CH₃, C-18); ESI-MS m/z : 329[M+H]⁺。

(1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3,4-Epoxycebra-7, 11, 15-triene (2): 无色油状物; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 5.09 (2H, m, H-7, 11), 4.86 (1H, br s, H-16), 4.63 (1H, br s, H-16), 2.83 (1H, dd, $J = 10.2, 2.6$ Hz, H-3), 1.63 (3H, s, H-17), 1.62 (3H, s, H-19), 1.59 (3H, s, H-20), 1.24 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 148.6 (C, C-15), 135.2 (C, C-8), 133.3 (C, C-12), 124.3 (CH, C-11), 123.9 (CH, C-7), 63.3 (CH, C-3), 60.8 (C, C-4), 40.3 (CH, C-1), 39.5 (CH, C-9), 38.2 (CH, C-6), 34.6 (CH₂, C-13), 33.6 (CH₂, C-2), 29.7 (CH₂, C-14), 24.3 (CH₂, C-10), 23.6 (CH₂, C-5), 18.4 (CH₃, H-17), 17.1 (CH₃, H-20), 16.9 (CH₃, H-18), 15.7 (CH₃, H-19); ESI-MS m/z : 289 [M+H]⁺。

(-)-Corulloidolide E (3): 白色粉末; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ: 6.42 (1H, s, H-7), 6.12 (1H, s, Ha-18), 5.95 (1H, s, Hb-18), 4.84 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, Ha-16), 4.79 (1H, s, Hb-16), 4.61 (1H, dd, $J = 9.2, 4.3$ Hz, H-10), 3.78 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-11), 3.66 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, Ha-5), 3.49 (1H, t, $J = 10.1$ Hz, Ha-9), 3.19 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, Hb-5), 2.98 (1H, br s, Hb-9), 2.96 (1H, dd, $J = 12.4, 2.3$ Hz, Ha-2), 2.62 (1H, dt, $J = 7.9, 3.8$ Hz, H-1), 2.41 (1H, t, $J = 12.1$ Hz, Hb-2), 2.00 (3H, s, H-19), 1.94 (1H, m, Ha-13), 1.79 (1H, m, Hb-13), 1.74 (3H, s, H-17), 1.30 (2H, m, H-14); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ: 202.7 (C, C-3), 198.5 (C, C-6), 172.0 (C, C-20), 152.4 (C, C-8), 145.7 (C, C-15), 143.9 (C, C-4), 128.3 (CH₂, C-18), 127.7 (CH, C-7), 111.8 (CH₂, C-16), 76.3 (CH, C-10), 61.1 (CH, C-11), 60.6 (C, C-12), 47.1 (CH₂, C-5), 43.5 (CH, C-1), 40.8 (CH₂, C-2), 35.2 (CH₂, C-9), 26.3 (CH₃, C-19), 24.0 (CH₂, C-14), 20.4 (CH₂, C-13), 20.3 (CH₃, C-17); ESI-MS m/z : 345 [M+H]⁺。

2.3 活性测试结果

卤虫的致死活性结果显示 3 个化合物 1, 2 和 3 在 50 μg/mL 时对卤虫的致死活性不明显。

对分离获得的化合物 3 进行细胞毒活性测试

(表 1), 发现化合物 3 对 5 种癌细胞的 IC₅₀ 值都低于 10 μg/mL, 化合物 3 对乳腺癌 MCF-7/ADR 耐药细胞的 IC₅₀ 为 3.70 μg/mL。

表 1 化合物 3 的细胞毒活性测试结果

Table 1 Cytotoxicity Assay for compound 3

化合物 Com- pound	IC ₅₀ (μg/mL)				
	肝癌		乳腺癌阿 霉素耐药株	前列腺癌	结肠癌
	HepG2	Hep3B	MCF-7/ADR	PC-3	HT-116
3	4.78	5.74	3.70	4.94	5.16

3 结论

在卤虫致死活性指导下, 综合运用正相硅胶柱层析、凝胶柱层析以及半制备 HPLC 等手段对一种中国西沙丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 化学成分进行初步分析, 得到 3 个高氧化度的西松烷二萜类化合物 corulloidolide A (1), (1*R*, 3*S*, 4*S*, 7*E*, 11*E*)-3,4-epoxycebra-7, 11, 15-triene (2) 和 (-)-corulloidolide E (3), 这些化合物均为首次从该属丛柳珊瑚中分离获得。卤虫致死活性和细胞毒活性测试, 发现 3 个化合物的卤虫致死活性较差, 浓度达到 50 μg/mL 时无明显活性, 化合物 3 表现了较强的细胞毒活性, 他对 5 种癌细胞肝癌 HepG2, Hep3B, 乳腺癌阿霉素耐药株 MCF-7/ADR, 前列腺癌 PC-3he, 结肠癌 HT-116 的 IC₅₀ 值都低于 10 μg/mL。说明西松烷二萜类化合物是该丛柳珊瑚 *E. rhipidalis* 的主要活性化合物类型之一。本研究结果对海洋生物药理活性化合物的研究具有借鉴意义, 提供基础资料。

参考文献:

- [1] Seo Y, Rho J R, Cho K W, et al. Isolation of new steroidal hemiacetals from the gorgonian *Euplexaura anastomosans* [J]. J Nat Prod, 1996, 59: 1196-1199.
- [2] Komoda Y, Kanayasu T, Ishikawa M. Prostaglandin F_{2a} from the Japanese Coastal Gorgonian, *Euplexaura erecta* [J]. Chem Pharm Bull, 1979, 27(10): 2491-2494.
- [3] Kikuchi H, Tsukitani Y, Nakanishi H, et al. New butenolides from the gorgonian *Euplexaura Flava* (Nutting) [J]. Chem Lett, 1982: 233-236.
- [4] Shin J, Seo Y, Cho K W. Euplexides A-E: Novel farne-sylhydroquinone glycosides from the gorgonian *Euplexaura anastomosans* [J]. J Org Chem, 1999, 64: 1853-1858.
- [5] 高程海, 方燕, 易湘茜, 等. 中国柳珊瑚萜类化合物研究新进展 [J]. 广西科学院学报, 2013, 29(2): 108-113.
- [6] Alley MC, Scudiero D A, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay [J]. Cancer Res, 1988, 48(3): 589-601.

(下转第 275 页 Continue on page 275)

- shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents[J]. *Planta Med*, 1982, 45 (1): 31-34.
- [9] 杰利·L·麦克劳林, 顾哲明. 两种简易的抗肿瘤活性初筛方法[J]. *中国中药杂志*, 1997, 22 (10): 617-619.
- [10] Xiao D J, Deng S Z, Zeng L M. Studies on the chemical constituents of the marine sponge *Clathria fasciculata* from the South China Sea[J]. *Chin Mar Pharm*, 2002, 2: 1-3.
- [11] Yang R L, Wang H Z, Zheng G L, et al. Studies on chemical constituents of *Meretrix meretrix* [J]. *Chin Mar Pharm*, 2003, 2: 31-32.
- [12] 石瑛, 田黎, 王婧, 等. 海洋放线菌 *Micromonospora* sp. 与细菌 *Oceanospirillum* sp. 发酵液中化学成分的研究[J]. *中国海洋药物*, 2006, 25 (1): 6-10.
- [13] Higgs M D, Faulkner D J. 5 α -Pregna-1, 20-dien-3-one and related compounds from a soft coral[J]. *Steroids*, 30 (3): 379-388.
- [14] 高程海, 易湘茜, 何碧娟, 等. 广西红树植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. *广西科学院学报*, 2011, 27(3): 251-256.
- [15] 徐艳, 冯涛, 童万平. 海芒果属红树植物的化学成分及其生物活性研究概述 [J]. *广西科学院学报*, 2011, 27 (1): 55-61.
- [16] Epifanio R de A, Maia L F, Pawlik J R, et al. Antipredatory secosterols from the octocoral *Pseudopterogorgia americana* [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2007, 329: 307-310.

(责任编辑: 尹 闯)

(上接第 271 页 Continue from page 271)

- [7] Solis P N, Wright C W, Anderson M M, et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp)[J]. *Plants Med*, 1993, 59(3): 250-252.
- [8] Meyer B N, Ferrigni N R, Putnam J E, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents[J]. *Planta Med*, 1982, 45(1): 31-34.
- [9] D'Ambrosio M, Fabbri D, Guerriero A, et al. Coralloidolide A and coralloidolide B, the first cembranoids from a Mediterranean organism, the alcyonacean *Alcyonium coralloides* [J]. *Helv Chim Acta*, 1987, 70(1): 63-70.
- [10] Bowden B F, Coll J C, Mitchell S J, et al. Studies of Australian soft corals XXIV two cembranoid diterpenes from the soft coral *Sinularia facile* [J]. *Aust J Chem*, 1981, 34(7): 1551-1556.
- [11] D'Ambrosio M, Guerriero A, Pietra F. Novel cembranoides (coralloidolide D and E) and a 3,7-cyclized cembranolide (coralloidolide C) from the Mediterranean coral *Alcyonium coralloides* [J]. *Helv Chim Acta*, 1989, 72(7): 1590-1596.

(责任编辑: 尹 闯)