

金钱松化学成分及生物活性研究现状与展望*

刘洪亮^{1,2}, 何承忠^{3**}

(1. 西南林学院 园林学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国科学院昆明植物研究所 植物与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204; 3. 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 金钱松是松科植物, 其根皮部分称为“土槿皮”, 在古代民间作为中药, 主治癣症。20世纪80年代以来, 国内外对金钱松这一药用植物的化学成分及其生理活性的研究进行了综述, 并探讨了今后研究的主要方向。

关键词: 金钱松; 化学成分; 生物活性

中图分类号: S791.230.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-7179(2008)01-0051-06

金钱松(*Pseudolarix kameferi* Gord.)是我国特有的著名古老子遗松科(Pinaceae)树种, 大约起源于白垩纪中晚期, 曾广泛分布于北纬33°~52°地区^[1]。在更新世大冰期后, 各地金钱松相继灭绝, 只有在长江中下游地区幸存下来, 现在正处于濒危状态, 已被列为国家二级保护植物^[1-3]。

金钱松材性优良, 耐水湿, 树形优美, 是优良的建筑、家具等用材树种和园林绿化树种^[1]。该树种的根皮和近根皮部分被称为土槿皮, 因为性辛, 温, 有毒, 具有止痒、杀虫、治疗癣症等功效, 在我国民间作为中药入药已有悠久的历史^[4]。自20世纪80年代以来, 金钱松的化学成分及其药理作用再次受到关注。研究发现: 金钱松的化学成分主要有二萜类化合物、三萜类化合物、木脂素类化合物、倍半萜类化合物以及其他类型化合物^[5-13]。现代药理实验表明: 这类化合物具有抗真菌、抗肿瘤等功效^[10-11, 14-19]。本文对国内外金钱松化学成分及其药理研究进行概述, 对后期研究的方向进行讨论, 以供相关研究参考。

1 化学成分

1.1 二萜类化合物(1~18)

金钱松土槿皮的主要化学成分为土槿酸, 而土槿酸并非纯体^[5]。应用常规及现代分离技术, 李珠莲等^[5-8]从土槿皮中先后分离出了8种土槿皮酸(1~8), 依次为土槿甲酸, 土槿乙酸, 土槿丙酸,

土槿丙酸2, 土槿甲酸苷, 土槿乙酸苷, 土槿皮丁酸和土槿皮戊酸。Yang等^[9-10]又从土槿皮中分离到9种新的二萜类化合物(9~17), 依次为 Pseudolaric acid F, G, H; 2', 3'-dihydroxy-1'-propoxypseudolarate B; 6'-O-acetylpseudolaric acid B-O-β-D-glucopyranoside; Pseudolaric acid A₂, B₂, B₃ 和 Methyl pseudolarate A₂。Li等^[12]以土槿皮为材料, 分离到了 Pseudolaric acid B, C. 和 Demethoxydeacetoxy-pseudolaric acid B(18)。各种化合物的结构式见图1。

1.2 三萜类化合物(19~31)

以金钱松种子、叶片等器官为材料, 从中分离到了不同的三萜类化合物。1993年, 陈国富等^[12-13, 20]从金钱松种子中分离出8个三萜内脂(19~26), 依次为 Pseudolarolides A, B, C, D, E, F, O 和 P. Zhou等^[21]相继又从其叶中分离到3个新的三萜类化合物(27~29): Pseudolarolide Q, R, S. Yang等^[11]从土槿皮中不仅分离出了二萜类化合物, 还发现两种新的三萜类化合物, Isopseudolarifuroic acid A(30)和B(31)。已报道的金钱松三萜类化合物结构式见图2。

1.3 其他类化合物(32~36)

Li等^[22]从土槿皮中分离到两个新的 Auronol, 即 Auronol A(32)和 Auronol B(33), 同时还得到 Myricetin(34)。Liu等^[23]从土槿皮中分离到两个新的化合物 Pseudolaroside A(35)和B(36)。结构式见图3。

* 收稿日期: 2007-09-26 ** 为通讯作者

基金项目: 昆明植物所基金项目资助; 云南省重点建设专业西南林学院林学专业项目资助。

作者简介: 刘洪亮(1981-), 男, 湖南耒阳人, 硕士生, 主要从事园林植物方面的学习与研究。

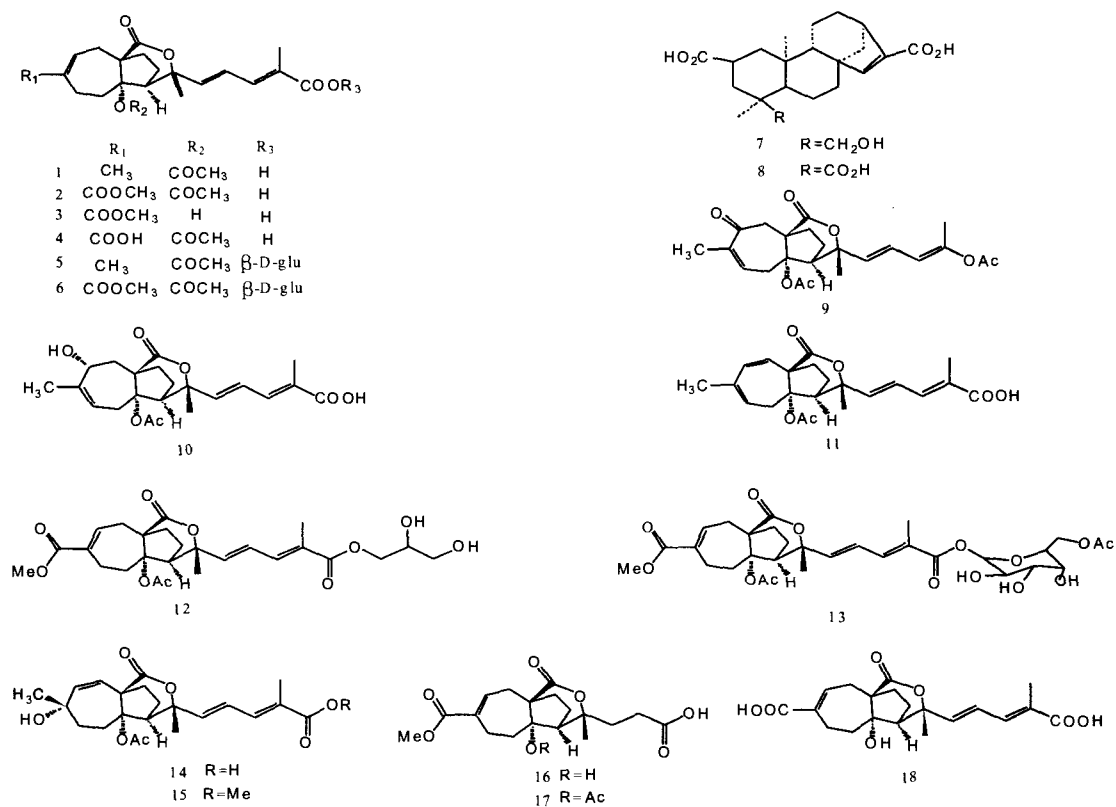


图1 化合物1-18结构式

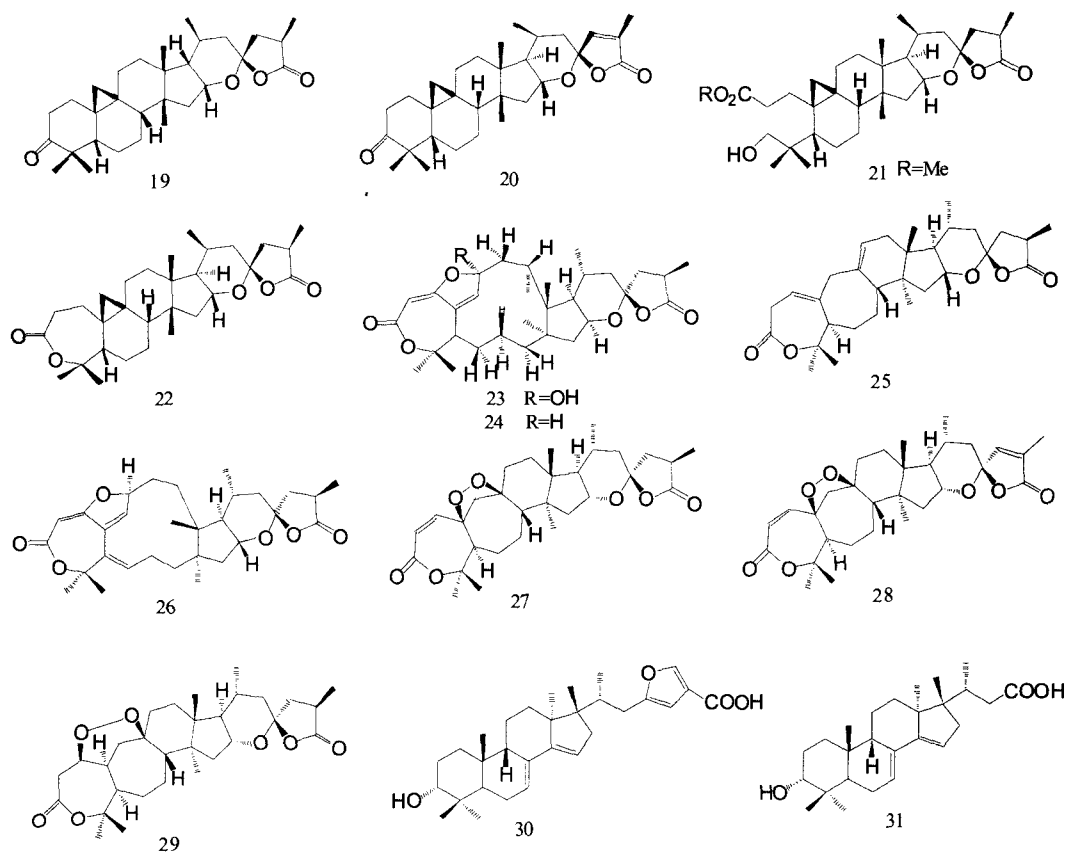


图2 化合物19-31结构式

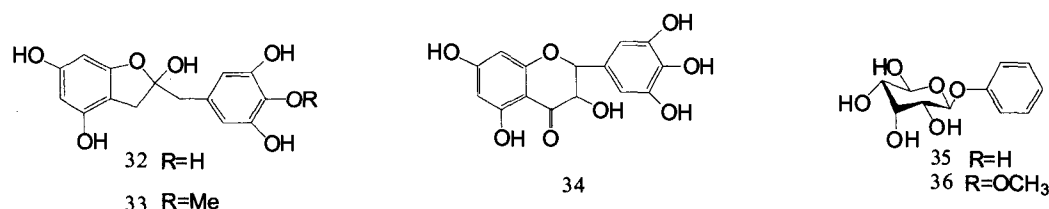


图3 化合物32-36结构式

2 生物活性

2.1 抗真菌活性

土槿皮在我国民间医学中用来治疗由真菌感染的皮肤病,现代医学外用复方土槿皮酊治疗手癣和脚癣^[4]。土槿皮乙酸(PAB)为抗真菌主要成分,Li等^[14]通过活性实验证明:土槿皮乙酸对须藓毛藓菌(*Trichophyton mentagrophytes*),球拟酵母菌(*Torulopsis petrophilum*),石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*)和念珠菌(*Candida spp*)均有很强的生物活性,但其甲基化或氢化衍生物对这些菌类无活性。主要是因为PAB上的乙酰氧基和C₁₈原子上的羧酸是保持其抗真菌活性所必需的^[14]。通过用土槿皮药液和两性霉素B对浅部真菌超微结构的影响进行观察发现,土槿皮药液处理2 h后,电镜下观察即可见真菌细胞核旁出现小斑片电子薄区,散在或呈半环状分布,而处理3~8 d后,细胞完全变性,细胞结构消失,并由电子薄区占据,细胞膜皱缩反折入胞浆内。而经两性霉素B作用的真菌细胞尚保留细胞核和线粒体,未见细胞皱缩^[19]。然而,PAB对新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)没有生物活性,而两性霉素B却对其有生物活性,可证明PAB的抗真菌机制不同于两性霉素B^[14]。

不仅PAB具有抗真菌活性,还发现土槿皮中的三萜化合物(30)也具有良好的抗菌活性^[11]。将其通过与抗菌药物Bakuchiol和Magnolol对各种菌类药效的比较表明,化合物(30)对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌和藤黄球菌均显示良好的活性,各自的MIC值是0.027和0.013 mM。同时,当其MIC值在0.107 mM时,也对革兰氏阴性菌大肠杆菌有很强的活性。通过实验比较,化合物(30)对于抗革兰氏阳性菌,其活性与Bakuchiol相当,但要强于Magnolol(表1)。更重要的是在可比较剂量下,Bakuchiol和Magnolol对革兰氏阴性菌不具有活性时,化合物(30)却显示良好的活性^[11]。

表1 化合物(30)抗菌活性比较

菌株	MIC/mM ^a		
	30	Bakuchiol	Magnolol
金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)	0.027	0.019	0.048
藤黄微球菌(ATCC 9341)	0.013	0.010	0.048
大肠杆菌(ATCC 259277)	0.107	>0.780	>0.750
假担胞杆菌(ATCC 2785)	>0.215	>0.780	>0.750

注:MIC指最小抑菌浓度

最新研究还发现:金钱松内存在着广泛的具有抗菌活性的内生真菌。以茎和叶为材料,共分离到菌株105株,其中具有抗菌活性的内生真菌占28.5%,高活性菌株占15.2%。尤其JJ18菌株,其发酵粗提物具有强烈的抗细菌、酵母菌和丝状真菌的广谱抗菌能力,而JJ314抗细菌、酵母菌活性强^[24]。由此可见,不仅从金钱松内分离到的二萜类和三萜类化合物具有抗真菌活性,而且其内生真菌也是潜在的抗真菌药物资源。

2.2 抗肿瘤活性

PAB不仅具有良好的抗真菌作用,而且还有良好的抗肿瘤活性,PAB对CNS,TE671,SK-MEL-5,A2780等瘤株具有细胞毒活性^[14]。经研究证明:PAB能抑制新生血管VEGF(vascular endothelial growth factor)的增殖和移殖,且与控制牛胚胎血清血管和人体静脉内皮细胞血管的形成呈明显的浓度依赖关系。从鸡尿囊膜的测定更显示PAB(10 nmol/egg)能显著抑制体内新生血管的合成。而新生血管的生成在肿瘤的形成过程中起着重要的作用^[18]。通过对人体乳腺癌细胞MDA-MB-468的研究,ELISA数据显示,PAB能通过降低缺氧诱导因子(HIF-1 α)的蛋白水平从而减少从MDA-MB-468细胞中分泌的VEGF^[18]。PAB还能有效抑制LiBr细胞(人黑素瘤细胞)的体外增殖,且能诱导其凋亡^[16]。50 μ mol/L PAB处理LiBr细胞后,活细胞数较对照组减少达66%,48 h后到89%,并随时间的延长对细胞的抑制率增加,其抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系^[16]。对LiBr细胞的p21^{WAF1}基因表达检测结果显示,PAB处理

后,该基因表达明显增强,表明 PAB 能阻止 LiBr 细胞进入 S 期,达到抑制细胞增殖的目的,从而初步阐明了 PAB 抑制肿瘤细胞生长的作用机制^[16]. 研究结果还表明:PAB 体外诱导 A375 - S2 细胞凋亡呈明显的时间 - 剂量依赖性关系,细胞经 5 $\mu\text{mol/L}$ PAB 处理 36 h 后有明显的凋亡小体出现,细胞内抑制凋亡蛋白 Bcl - 2, Bcl - xL 和 caspase 激活的 DNA 酶抑制物(ICAD)表达量呈时间依赖性地减少,而促凋亡蛋白 Bax 表达量增加,从中可以看出:PAB 是通过下调 ICAD 蛋白的表达和降低 Bcl - 2/Bax 的比例来诱导 A375 - S2 细胞凋亡^[17]. 同时,PAB 还能通过降低 Bcl - 2 蛋白的表达,而增加 Bax 和 p53 蛋白表达来诱导 Hela 细胞的凋亡^[15].

目前,以土槿皮乙酸为原料,人工合成了 8 个土槿皮乙酸衍生物,经 MTT 法筛选其抗肿瘤活性. 结果表明:8 个化合物均为新化合物,其中 7 个具有抗肿瘤作用,而且有 2 个化合物的抗性显著高于土槿皮乙酸^[25]. 通过构效分析表明:4 位乙酰氧基和 7 位酯基为土槿乙酸抗肿瘤活性所必需,同时土槿乙酸双键及所形成的土槿乙酸空间结构在土槿乙酸的抗肿瘤活性中也起着至关重要的作用,对 18 位共轭双烯酸侧链的改造则可能获得体外抗肿瘤效果更好的衍生物^[25].

2.3 抗生育活性

土槿皮乙酸(PAB)是我国研制的女性抗生育药,对大鼠、兔和狗有明显的抗早孕作用^[26]. 其抗早孕的有效剂量能使妊娠大鼠的蜕膜细胞变性,出现出血和坏死等症状. 不同浓度的 PAB 注入仓鼠排卵前卵巢囊,卵子的受精能力被抑制,但对精子的活力和受精能力无影响. 高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 PAB 处理卵子,不管卵丘保留与否,卵子的受精率明显下降;5 $\mu\text{g/mL}$ 的 PAB 处理,只影响除去卵丘的卵子. 若在雌鼠交配前 4 d 每日口服 PAB 20 mg/kg,只有部分抗生育效果^[27]. PAB 还可以通过减少大鼠子宫肌层和内膜层血流量而导致胚胎死亡,从而达到抗生育的作用^[28]. 同样地,土槿皮甲酸(PAA)也具有抗生育活性. 将 PAA 混悬于 1% 羧甲基纤维素中,经口服给药,对大鼠、仓鼠及狗均可产生明显的抗早孕作用,其抗早孕的有效剂量各为 7.5, 60, 0.5 mg/kg. 将 PAA 经皮下及阴道给药也能产生明显的抗早孕作用,其对大鼠口服的 ED_{50} , LD_{50} 及 95% 可信限是 14.5 (11.7 ~ 17.7)

mg/kg 和 219.8 (193 ~ 250) mg/kg, 得治疗指数为 10.2^[29]. 王伟成等^[30] 还发现:土槿皮甲酸和乙酸无雌激素和抗雌激素样活性,也无抗黄体酮活性.

3 讨论与展望

近年来的抗真菌药物研究取得了较大进展,但由于当前众多的抗真菌药物存在抗药性和对神经系统的毒副作用,故迫切需要开发一种新的更有效、毒性较小的抗真菌药物^[10]. 金钱松作为药用植物已有悠久的历史,其中的主要成分土槿皮乙酸不仅具有良好的抗真菌作用,且其抗真菌机制不同于其他类药物^[14]. 同时,土槿皮乙酸对肿瘤等恶性疾病也具有一定的疗效^[15-18]. 但是,对其药理与靶点的作用机制尚不完全清楚,有待进一步研究.

金钱松为我国特有的单属种国家二级保护植物,也是一种应用前景广阔的药用植物. 但有限的植物资源,极大地限制了其活性产物的开发与利用^[31]. 植物内生真菌能产生大量新的天产物,有些内生真菌还能够产生与宿主植物相同或相近的代谢产物,是新的天然产物的重要来源^[32-34]. 金钱松的茎和叶中均有内生真菌分布,种类繁多,且多种菌株具有抗菌活性. 为其开发利用开辟了新的思路和途径,也是今后研究的重要领域之一.

综上所述,在后期的研究中,应将真菌基因组学、现代分子生物学、生物信息学和组合化学技术等新方法、新技术应用于金钱松药效成分的药理机制研究,以期开发出作用专一、高效、低毒的抗真菌、抗肿瘤和抗生育等新药物.

【参 考 文 献】

- [1] 魏学智, 胡玉熹, 林金星, 等. 中国特有植物金钱松的生物学特性及其保护[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(增刊): 73 - 77.
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [3] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物保护名录(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] 宋永锋, 陈虹, 李灵芝. 土槿皮的研究进展[J]. 天津药学, 2001, 13(6): 9 - 10.
- [5] 李珠莲, 潘德济, 吴勤丽, 等. 土槿皮新二萜成分的研究 I. 土槿甲酸和土槿乙酸的化学结构测定[J]. 化

- 学学报,1982,40(5):447-456.
- [6] 李珠莲,潘德济,吴勤丽,等. 土槿皮新二萜成分的研究Ⅱ. 土槿丙₂酸的结构证明和土槿甲酸、土槿乙酸、土槿丙酸和丙₂酸的结构沟通[J]. 化学学报,1982,40(8):757-760.
 - [7] 李珠莲,陈 科,潘德济,等. 土槿皮新二萜成分的研究Ⅲ. 土槿甲酸苷和土槿己酸苷的分离及结构测定[J]. 化学学报,1985,43(8):786-788.
 - [8] 李珠莲,陈 科,潘德济,等. 土槿皮新二萜成分的研究Ⅳ. 土槿丁酸和土槿戊酸的分离和结构测定[J]. 化学学报,1989,47(3):258-261.
 - [9] YANG S P, WU Y, YUE J M. Five new diterpenoids from *Pseudolarix kaempferi*[J]. J. Nat. Prod., 2002, 65: 1 041 - 1 044 .
 - [10] YANG S P, DONG L, WANG Y, et al. Antifungal diterpenoids of *Pseudolarix kaempferi*, and their structure - activity relationship study[J]. Bioorg. Med. Chem., 2003, 11: 4 577 - 4 584 .
 - [11] YANG S P, YUE J M. Two novel cytotoxic and antimicrobial triterpenoids from *Pseudolarix kaempferi* [J]. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001, 11: 3 119 - 3 122 .
 - [12] CHEN G F, LI Z L, PAN D J. The isolation and structural elucidation of four novel triterpene lactones, pseudolarolides A, B, C, D, from *Pseudolarix kaempferi*[J]. J. Nat. Prod., 1993, 56: 1 114 - 1 122 .
 - [13] CHEN G F, TAN C H, ZHU D Y. Pseudolarolides O and P, two novel triterpene dilactones from *Pseudolarix kaempferi*[J]. Helv. Chem. Acta., 2003, 86: 787-791.
 - [14] LI E, CLARK A M, HUFFORD C D. Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi*[J]. J. Nat. Prod., 1995, 58: 57-67.
 - [15] 龚显峰,王敏伟. 土槿皮乙酸体外诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中国药理学杂志,2005,40(8):589-591.
 - [16] 姜孟臣. 土槿皮乙酸对人黑素瘤细胞增殖抑制作用研究[J]. 中草药,2003,34(6):532-534.
 - [17] 龚显峰,王敏伟,田代真一,等. 土槿皮乙酸体外诱导 A375-S2 细胞凋亡[J]. 中国中药杂志,2005,30(1):55-57.
 - [18] TAN W F, ZHANG X W, DING J. Pseudolarix acid B inhibits angiogenesis by antagonizing the vascular endothelial growth factor - mediated anti - apoptotic effect [J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 499: 219 - 228.
 - [19] 卢玉娟,武庆克,李鹤玉,等. 土槿皮等三种中药抗真菌作用的超微结构观察[J]. 哈尔滨医科大学学报,1982,16(3):21
 - [20] CHEN G F, LI Z L, ZHU D Y. A novel eleven - membered - ring triterpene dilactone, pseudolarolide F and A related compound, pseudolarolide E, from *Pseudolarix kaempferi*[J]. J. Nat. Prod., 2001, 3: 321 - 323.
 - [21] ZHOU T X, ZHANG H P, ZHU Y N. New triterpene peroxides from *Pseudolarix kaempferi* [J]. Tetrahedron, 2004, 60: 4 931 - 4 936 .
 - [22] LI C X, HALA N, ELISOHLI, et al. Two auronols from *Pseudolarix amabilis*[J]. J. Nat. Prod., 1999, 62: 767 - 769.
 - [23] LIU P, GUO H Z. Benzoic acid allopuranosides from the bark of *Pseudolarix kaempferi* [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 1 395 - 1 398 .
 - [24] 何 佳,陈 钧,赵启美,等. 微量稀释法筛选金钱松内生真菌抗菌活性的研究[J]. 食品科学,2007, 28(4):199-203.
 - [25] 陈 虹,史丽丽,王 火,等. 土槿乙酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 天津药学,2006,18(6): 1-3.
 - [26] 张燕林,吕容真,颜阿林. 土槿皮乙酸抑制仓鼠卵子的受精能力[J]. 中国药理学报,1990,11(1): 60-62.
 - [27] 王伟成,顾芝萍,顾克仁,等. 土槿皮乙酸对妊娠大鼠子宫内膜及肌层血流量的影响[J]. 中国药理学报,1991,12(5):423-425.
 - [28] 周晓飞,梁子华,林 密,等. 土槿皮乙酸的药理学作用及其毒性反应[J]. 中国热带医学,2007,7(7):1 240-1 241.
 - [29] 王伟成,陆荣发,赵世兴,等. 土槿皮甲酸的抗生育作用和毒性[J]. 生殖与避孕,1989,9(1):34-37.
 - [30] 王伟成,游根娣,蒋秀娟,等. 土槿皮甲酸和乙酸的内分泌活性和它们对性激素,前列腺素,子宫,胎儿的影响[J]. 中国药理学报,1991,12(2):187-190.
 - [31] 何 佳,陈 钧,赵启美,等. 快速筛选金钱松内生真菌抗真菌活性的研究[J]. 中国中药杂志,2006, 31(21):1 759-1 763 .
 - [32] STIERLE A, STROBLE G, STIEFLE D. Taxol and taxane production by taxomyces and reanal, an endophytic fungus of pacific yew comments[J]. Science, 1993, 260: 214.
 - [33] STROBEL G, DAISY B, CASTILLOU, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. J. Nat. Prod., 2004, 67: 257.
 - [34] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生真菌研究新进展[J]. 植物学报,2001,43(9):881.

Research Status and Prospect of the Chemical Constituents and Bioactivities of *Pseudolarix kameferi*

LIU Hong-liang^{1,2}, HE Cheng-zhong³

(1. Faculty of Landscape Architecture, Southwest Forestry College, Kunming Yunnan 650224, China; 2. State Key Lab of Phytochemistry and Plant Resource in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Kunming Yunnan 650204, China; 3. Faculty of Resources, Southwest Forestry College, Kunming Yunnan 650224, China)

Abstract: *Pseudolarix kameferi* belongs to Pinaceae family, and its root bark is known as “Tu Jin Pi” commonly used in traditional Chinese medicine for treatment of skin diseases caused by microbial infection. The studies on chemical components and bioactivities of *P. kameferi* since 1980 s were reviewed, and the main research orientation related to this tree species in the future was also discussed.

Key words: *Pseudolarix kameferi*; chemical constituents; bioactivities

(上接第50页)

- | | |
|--|--|
| [3] HUBER S C, HUBER J L. Role and regulation sucrose phosphate synthase in higher plants [J]. <i>Plant Physiology</i> , 1996, 47: 431 – 445. | [7] DIEFFENBACH C W, DVEKSLER G S. PCR 技术实验指南(第一版)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 261 – 287. |
| [4] ISHIMARU K. Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate gene strategy [J]. <i>Planta</i> , 2004, 218: 388 – 395. | [8] 曹廷兵, 叶治家, 巩 燕, 等. 一种快速鉴定 RNA 质量的方法[J]. <i>第三军医大学学报</i> , 2002, 24(8): 992 – 993. |
| [5] 辉朝茂, 杨宇明, 杜 凡. 珍稀竹种巨龙竹(第一版)[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006: 1 – 13. | [9] 王关林, 方万筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 189 – 194. |
| [6] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社: 636 – 651. | [10] 赵大中, 陈 民, 种 康, 等. 高等植物发育基因的分离方法[J]. <i>植物生理学通讯</i> , 1997, 33(4): 312 – 317. |

Isolation and Cloning of Sucrose Phosphate Synthase Gene (*sps*) from *Dendrocalamus sinicus*

ZHANG Shao-zhi, WANG Yi, LIU Xiao-zhu

(Faculty of Resources, Southwest Forestry College, Kunming Yunnan 650224, China)

Abstract: The degenerating primer was designed and synthesized according to *sps* gene sequence of *Zea mays* and *Oryza sativa*. Taking the first cDNA strand of *Dendrocalamus sinicus* as template, the *sps* gene of this bamboo species was isolated and cloned by means of TD – PCR method, and 474 bp fragment was obtained by sequencing and cDNA sequence analysis. It was showed that the fragment was similar to the reported *sps* homologous genes of *Bambusa oldhamii*, *Lolium perenne* and *Hordeum vulgare* subspecies.

Key words: *Dendrocalamus sinicus*; sucrose phosphate synthase; degenerate primers; gene cloning