

蜡梅枝叶化学成分及其抗病毒活性

史琳婧^{1,2} 杨世仙^{2,3} 毕峻龙⁴ 尹革芬^{4*} 王跃虎^{2*}¹中南大学药学院,长沙 410078; ²中国科学院昆明植物研究所资源植物与生物技术所级重点实验室;³云南农业大学园林园艺学院; ⁴云南农业大学动物科技学院,昆明 650201

摘要: 利用各种色谱技术从蜡梅枝叶中共分离得到 10 个化合物,通过波谱学方法将其鉴定为 (+)-Calycanthine (**1**)、(-)-Folicanthine (**2**)、(-)-Chimonanthine (**3**)、异秦皮啶 (**4**)、3,3'-双异秦皮啶 (**5**)、Euoniside (**6**)、山奈酚-3-O-芸香糖苷 (**7**)、3,4-二羟基苯乙腈 (**8**)、Di-O-methylcrenatin (**9**) 和 Acanthoside B (**10**)。化合物 **4**~**10** 为首次从该植物中发现。采用细胞病变效应法测试了化合物 **1**~**5** 与 **8** 对猪繁殖与呼吸综合征病毒的抑制活性,化合物 **2** ($IC_{50} = 58.9 \pm 10.2 \mu\text{M}$; $TI = 19.3$)、**3** ($IC_{50} = 68.9 \pm 3.1 \mu\text{M}$; $TI = 17.9$) 与 **8** ($IC_{50} = 80.5 \pm 16.9 \mu\text{M}$; $TI > 19.9$) 显示出了弱的抑制活性。

关键词: 蜡梅科; 蜡梅; 生物碱; 猪繁殖与呼吸综合征病毒

中图分类号: R284.2; Q946.91

文献标识码: A

Chemical Constituents from the Branches and Leaves of *Chimonanthus praecox* with Antiviral Activity Investigations

SHI Lin-jing^{1,2}, YANG Shi-xian^{2,3}, BI Jun-long⁴, YIN Ge-fen^{4*}, WANG Yue-hu^{2*}

¹School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410078, China; ²Key Laboratory of Economic Plants and Biotechnology, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences; ³College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University; ⁴College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Ten compounds were isolated from the branches and leaves of *Chimonanthus praecox* by various chromatographic techniques. By spectroscopic methods, their structures were elucidated as (+)-calycanthine (**1**), (-)-folicanthine (**2**), (-)-chimonanthine (**3**), isofraxidin (**4**), 3,3'-biisofraxidin (**5**), euoniside (**6**), kaempferol-3-O-rutinoside (**7**), 3,4-dihydroxybenzofuran (**8**), di-O-methylcrenatin (**9**) and acanthoside B (**10**). Among them, compounds **4-10** were obtained from the herb for the first time. The inhibitory activity of compounds **1-5** and **8** against porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV) was measured by the cytopathic effect (CPE) method. Compounds **2** ($IC_{50} = 58.9 \pm 10.2 \mu\text{M}$; $TI = 19.3$), **3** ($IC_{50} = 68.9 \pm 3.1 \mu\text{M}$; $TI = 17.9$) and **8** ($IC_{50} = 80.5 \pm 16.9 \mu\text{M}$; $TI > 19.9$) showed weak effect on PRRSV.

Key words: Calycanthaceae; *Chimonanthus praecox*; alkaloids; PRRSV

蜡梅 (*Chimonanthus praecox* Link) 是蜡梅科 (Calycanthaceae) 蜡梅属落叶灌木或小乔木,主要分布于我国南方,是传统庭院名花和园林绿化植物。其根、叶可药用,用于治疗跌打、腰痛、风湿麻木、风寒感冒等。其花亦用于治疗头晕、胸闷、梅核气、咽喉肿痛、百日咳、小儿麻疹等。果实有健脾止泻功效,常用于治疗腹泻久痢等症^[1]。前人对其根、果

实、叶和花的化学成分进行过研究,发现了色胺来源的生物碱、花青素、黄酮醇、倍半萜及其糖苷以及苯丙素糖苷等^[2-7]。其中生物碱 (+)-Calycanthine 和 (-)-Folicanthine 有抗真菌活性^[6], (-)-Chimonanthine、(-)-Calycanthidine 和 (-)-Folicanthine 有细胞毒活性^[7]。为了从天然产物中筛选动物病毒抑制剂^[8],我们对蜡梅枝叶的化学成分进行了研究,并测试了分离物对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 的抑制活性。

收稿日期: 2012-02-17 接受日期: 2012-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160509)

* 通讯作者 E-mail: yingefen383@sohu.com; wangyuehu@mail.kib.ac.cn

1 仪器与材料

旋光通过 JASCO DIP-370 型数字式旋光仪测定; NMR 在 Bruker AM-400 和 DRX-500 核磁共振仪上测量(TMS 为内标); FAB-MS 由 VG Auto Spec-3000 质谱仪测定; ESI-MS 由 API Qstar Pulsar I 质谱仪测定; Sephadex LH-20 是 GE Healthcare Bio-Sciences AB 产品; D101 大孔树脂、硅胶 GF₂₅₄ 与柱层析用硅胶 G(80 ~ 100 目, 300 ~ 400 目) 为青岛美高集团有限公司的产品; C-18 反相硅胶(40 ~ 75 μm) 来自美国的 Fuji Silysia Chemical LTD 的产品; 高效液相色谱仪为 Agilent 1200(色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ 9.4 (250 mm 5 μm); 旋转蒸发仪是 BUCHI 公司的 Rotavapor R11。

植物材料于 2009 年 8 月采自云南省昆明市, 经中国科学院昆明植物研究所胡光万博士鉴定为蜡梅 (*Chimonanthus praecox*)。

2 提取与分离

蜡梅枝、叶(3.6 kg) 干燥、粉碎, 用甲醇回流提取 3 次(4.3、3 h), 浓缩后得浸膏, 加适量水混悬, 石油醚萃取(弃), 无机相用 1% HCl 调 pH 值至 1, 乙酸乙酯萃取(弃)。无机相用 5% NaOH 调 pH 值至 10, 用氯仿萃取。氯仿萃取物部分(5 g) 用中压反相硅胶层析, 50% 甲醇洗脱部分经 Sephadex LH-20 (MeOH) 和制备性 TLC(氯仿-甲醇-二乙胺 5:1:0.05) 分离得到化合物 1(11.2 mg) 和 3(87.7 mg); 70% ~ 80% 甲醇洗脱部分合并经 Sephadex LH-20 (MeOH) 和制备性 TLC(氯仿-甲醇-二乙胺 5:1:0.05) 得到化合物 2(35.2 mg)。

氯仿萃取后的无机相用 1% HCl 调 pH 值至 7, D101 大孔树脂柱层析分离, 分别用水与 95% 乙醇洗脱。取 95% 乙醇部分经硅胶柱层析, 用氯仿-甲醇梯度洗脱。氯仿-甲醇(5:1) 洗脱部分经中压反相硅胶柱层析, 10% ~ 30% 甲醇洗脱部分用 Sephadex LH-20 (MeOH) 和制备性 TLC 分离得到化合物 8(18.6 mg; 氯仿-甲醇 5:1) 和 9(13.4 mg; 氯仿-甲醇 3:1); 40% ~ 50% 甲醇洗脱部分用 Sephadex LH-20 (MeOH) 和硅胶柱色谱(氯仿-甲醇 5:1) 分离得到化合物 4(18.0 mg); 60% 甲醇洗脱部分经 Sephadex LH-20 (MeOH) 柱层析后得到化合物 5(20.8 mg)。氯仿-甲醇(2:1) 洗脱部分经中压反相硅胶柱层析, 20% 甲醇洗脱部分用 Sephadex LH-20

(MeOH) 柱层析后重结晶得到化合物 6(14.1 mg); 40% ~ 50% 甲醇洗脱部分用 Sephadex LH-20 (MeOH) 和制备性 TLC 分离得到化合物 7(28.7 mg; 氯仿-甲醇 3:1) 和 10(17.8 mg; 氯仿-甲醇, 5:1)。

3 生物活性测定

3.1 细胞系与病毒

Marc-145 细胞(中国科学院上海细胞库) 用含有 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS; HyClone Co.) 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的营养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的培养箱中进行培养。待细胞长至单层时, 使用 0.25% 胰酶(HyClone Co.) 进行消化, 根据实验的需要转入 96 孔培养板进行培养。本实验所使用的 PRRSV(YN-1 株) 在云南分离获得^[9]。该毒株在 Marc-145 细胞上的半数感染量(50% Tissue culture infectious dose, TCID₅₀) 为 $10^{-5.3}$ TCID₅₀/0.1 mL。

3.2 化合物细胞毒性测定

化合物对 Marc-145 细胞的毒性使用 WST-8 方法进行测定^[10]。简单来说, 将密度为 1×10^4 cells/mL 的 Marc-145 cells 加入 96 孔培养板中培养至单层, 将化合物 1 ~ 5 和 8 以及阳性对照磷酸替米考星(湖北恒硕生物化工有限公司) 用 DMEM 培养液(Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone Co.) 做 2 倍连续稀释, 每个梯度浓度接种 3 个细胞孔, 混合液总量为 100 μl 。同时设正常细胞对照、培养液对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 3 d 后, 每孔加入 10 μl CCK-8 溶液(Cell Counting Kit-8, Beyotime Co.) 在细胞培养箱内继续孵育 1.5 h, 酶标仪(Bio-Tek ELx 800) 在 450 nm 处阅读 OD 值。根据 OD 值计算细胞存活率及 50% 细胞毒性浓度(CC₅₀)。

3.3 抗病毒活性实验

化合物抗病毒活性使用 CPE 抑制实验进行评价^[11]。将 Marc-145 细胞接种于 96 孔培养板中, 使之长满单层; 将测试化合物分别做 2 倍连续稀释, 将不同浓度提取物及阳性药物分别与 500 TCID₅₀/0.1 mL 病毒液混合, 然后将病毒药物混合液加入细胞中, 同时设正常细胞对照组(不含药物和病毒), 病毒对照组(只含病毒)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中继续培养, 逐日观察 CPE, 在显微镜下可见细胞出现圆缩、聚集, 最后脱落。4 d 后根据 CPE 结果判订药

物有效抑制 50% 细胞出现病变的浓度 (50% inhibition concentration, IC_{50}) ,并计算药物治疗指数 (TI = CC_{50}/IC_{50}) 。

3.4 荧光定量 RT-PCR 检测 PRRSV mRNA 表达的变化

应用 RT-PCR 方法检测了化合物 2、3 和 8 (设 4 个浓度) 对 PRRSV ORF7 和 NSP9 基因 mRNA 表达的影响^[12]。给药培养 4 d 后,使用 RNA 提取试剂 RNAisoTM Plus (TaKaRa Biotechnology, 中国大连),按照说明书提取药物组和病毒对照组的总 RNA,所提取 RNA 使用 30 μ l RNase-free 水溶解,待 RNA 完全溶解后于 (80 $^{\circ}$ C 保存。所使用引物根据 GenBank 参考序列 PRU87392,利用 Primer5.0 和 Oligo6 软件在 PRRSV ORF7 和 NSP9 保守区域分别设计了一段长为 330 bp 和 162 bp 的引物。ORF7 引物序列为:上游 5'-AATGGCCAGCCAGTCAATCA-3' 和下游 5'-TCATGCTGAGGGTGATGCTG-3'。NSP9 引物序列为:上游 5'-CACTAAAGAGGAAGTCCGACTCA-3' 和下游 5'-GGTATGTCTCCAAACCTTGATTCTG-3'。内参基因 beta-actin,引物序列为:上游引物 5'-ATCCAGGCTGTGCTGTCC-3',下游引物 5'-GAGGATCTTCATGAGGTACTCG-3'。

将所提取总 RNA 使用 PrimeScript RT[®] Reagent Kit (TaKaRa) 反转录为 cDNA,反应体系为 10 μ L,其中 RNase Free dH₂O 4.5 μ L,5 \times PrimeScript Buffer 2 μ L,PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μ L,Random 6 mers (100 μ M) 0.5 μ L,Oligo dT Primer (50 μ M) 0.5 μ L,总 RNA 2 μ L。反应程序为:37 $^{\circ}$ C,15 min;85 $^{\circ}$ C,5 sec。PCR 反应体系为 25 μ L,其中 SYBR[™] Primix Ex Taq[™] II (TaKaRa) 12.5 μ L,PCR Forward Primer (10 μ M) 0.5 μ L,PCR Reverse Primer (10 μ M) 0.5 μ L,dH₂O 9.5 μ L,cDNA 2 μ L。使用 iQ5 real time PCR 仪 (Bio-Rad, Co. Ltd.) 进行扩增反应程序为:1 个循环 (95 $^{\circ}$ C,30 sec),然后 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C,5 sec;60 $^{\circ}$ C,30 sec)。

3.5 统计分析

所有的实验进行三个重复,数据使用平均值 \pm 标准差 (SD) 表示。数据分析使用 SPSS17.0 统计软件进行分析,* 表示差异极其显著 ($P < 0.001$)。

4 结构鉴定与生物活性筛选结果

从蜡梅枝叶甲醇提取物中共分离得到 10 个化合物 (部分化合物结构式见图 1),通过与文献对比

波谱数据对其结构进行了鉴定,这些化合物包括 3 个色胺来源的生物碱即 (+)-Calycanthine (1)^[6]、(-)-Folicanthine (2)^[6] 和 (-)-Chimonanthine (3)^[13],3 个香豆素类成分即异秦皮啶 (4)^[14]、3,3'-双异秦皮啶 (5)^[15] 和 Euoniside (6)^[16] 以及一些其它成分:山奈酚-3-O-芸香糖苷 (7)^[17],3,4-二羟基苯乙腈 (8)^[18],Di-O-methylcrenatin (9)^[19] 和 Acanthoside B (10)^[20]。

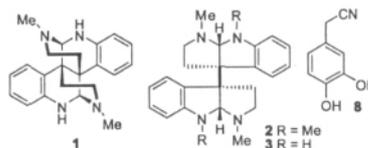


图 1 化合物 1~3 与 8 的结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-3 and 8

采用细胞病变效应法 (Cytopathic effect, CPE) 对化合物 1~5 与 8 的对 PRRSV 的抑制活性进行测试,化合物 2 ($IC_{50} = 58.9 \pm 10.2 \mu$ M; TI = 19.3)、3 ($IC_{50} = 68.9 \pm 3.1 \mu$ M; TI = 17.9) 与 8 ($IC_{50} = 80.5 \pm 16.9 \mu$ M; TI > 19.9) 显示了弱的抑制活性 (表 1)。由于目前尚没有猪繁殖与呼吸综合征的有效治疗药物,我们选用了兽用抗生素磷酸替米考星作为阳性对照药,其对 PRRSV 的抑制作用 ($IC_{50} = 225.1 \pm 27.4 \mu$ M) 比上述 3 个化合物的更弱,且治疗指数 (TI = 3.8) 较低。

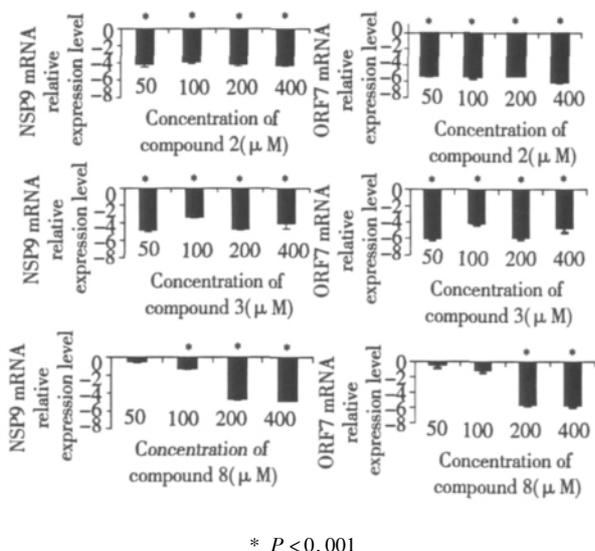
表 1 化合物 2、3 和 8 对 Marc-145 细胞感染的 PRRSV 病毒抑制效果

Table 1 The Inhibitory Effects of 2, 3 and 8 on PRRSV in Marc-145 Cells

化合物 Compound	CC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)	TI
(-)-Folicanthine (2)	1135.5 \pm 5.9	58.9 \pm 10.2	19.3
(-)-Chimonanthine (3)	1235.7 \pm 11.1	68.9 \pm 3.1	17.9
3,4-二羟基苯乙腈 (8)	> 1600	80.5 \pm 16.9	> 19.9
磷酸替米考星	855.4 \pm 74.9	225.1 \pm 27.4	3.8

在观察细胞病变的同时,通过荧光定量 RT-PCR 检测了 PRRSV mRNA 表达的变化。在给药 4 d 后,化合物 2、3 和 8 (浓度 50~400 μ M) 不同程度地下调了 PRRSV NSP9 与 ORF7 基因的相对表达量 (图 2)。

PRRSV 病毒的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp; nsp9) 是 PRRSV 病毒 RNA 合成的关键酶,由 NSP9 基因编码^[21]。ORF7 基因则编码 N 蛋白 (Nucleocapsid protein N),



* $P < 0.001$

图2 化合物2、3和8下调了NSP9(左)和ORF7(右)mRNA相对表达水平

Fig. 2 The NSP9 (left) and ORF7 (right) mRNA relative expression level reduced by compounds 2, 3 and 8

后者是病毒感染的细胞中含量最丰富的病毒蛋白,其功能是负责病毒粒子的组装和去组装^[22]。NSP9和ORF7 mRNA表达的下调表明PRRSV RNA的复制和病毒粒子的组装可能被测试的化合物所抑制。

参考文献

- Zhou MQ (周明芹), Chen LQ (陈龙清) *et al.* Progress in research and application of *Chimonanthus praecox*. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学) 2009 48: 2874-2877.
- Zhao HR (赵浩如), Ji QF (戡群芳) *et al.* Studies on constituents of roots of *Chimonanthus praecox*. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报) 1993 24(2): 76-77.
- Iwashina T, Konta F, Kitajima J. Anthocyanins and flavonols of *Chimonanthus praecox* (Calycanthaceae) as flower pigments. *J Jpn Bot* 2001 76: 166-172.
- Takayama H, Matsuda Y, Masubuchi K *et al.* Isolation, structure elucidation and total synthesis of two new *Chimonanthus* alkaloids, chimonamidine and chimonanthidine. *Tetrahedron*, 2004 60: 893-900.
- Kitajima M, Mori I, Arai K *et al.* Two new tryptamine-derived alkaloids from *Chimonanthus praecox* f. *concolor*. *Tetrahedron Lett* 2006 47: 3199-3202.
- Zhang JW, Gao JM, Xu T *et al.* Antifungal activity of alkaloids from the seeds of *Chimonanthus praecox*. *Chem Biodiversity* 2009 6: 838-845.
- Wang WX, Cao L *et al.* Constituents from *Chimonanthus praecox* (wintersweet). *Phytochem Lett* 2011 4: 271-274.
- Huang QQ, Bi JL, Sun QY *et al.* Bioactive isoquinoline alkaloids from *Corydalis saxicola*. *Planta Med* 2012 78: 65-70.
- Duan BF (段博芳), Shen YP (沈艳萍) *et al.* Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from Yunnan Province PRRSV. *Prog Vet Med* (动物医学进展) 2010 31(4): 11-15.
- Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K *et al.* A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem Pharm Bull* 1993 41: 1118-1122.
- Ma SC, He ZD, Deng XL *et al.* *In vitro* evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem Pharm Bull* 2001 49: 1471-1473.
- Lurchachaiwong W, Payungporn S, Srisatidnarakul U *et al.* Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2008 46: 55-60.
- Xiao BK (肖炳坤), Liu YM (刘耀明), Feng SX (冯淑香) *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Chimonanthus nitens* (I). *Chin Traditional and Herbal Drugs* (中草药) 2005 36: 187-189.
- Xu XD (许旭东), Hu XR (胡晓茹) *et al.* Studies on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2008 33: 900-902.
- Wang F (王菲), Yuan ST (袁胜涛), Zhu DN (朱丹妮). Active components of antitumor fraction from *Sarcandra glabra*. *Chin J Nat Med* (中国天然药物) 2007 5: 174-178.
- Tantray MA, Bhat BA *et al.* Two new coumarins from *Euonymus hamiltonianus*. *Chem Nat Compd* 2008 44: 10-12.
- Tong XG (仝晓刚), Cheng YX (程永现). Chemical constituents from *Acorus tatarinowii*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2011 23: 404-409.
- Li XJ (李效军), Jia RS (贾睿生), Chen W (陈炜) *et al.* Synthesis of 5,6-dihydroxyindole. *Speciality Petrochemicals* (精细石油化工) 2007 24(2): 53-55.
- Zhang DM (张东明), Li Y (李媛), Yu SS (庾石山). Glycosides from the stems of *Photinia parvifolia*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2004 16: 496-499.
- Vermes B, Seligmann O, Wagner H. Synthesis of biologically-active tetrahydro-furofuranlignan-(syringin, pinoselin)-monoglucosides and bisglucosides. *Phytochemistry* 1991 30: 3087-3089.
- Fang Y, Snijder EJ. The PRRSV replicase: Exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* 2010 154s(1-2): 61-76.
- Hao XF, Lu ZJ *et al.* Polymorphic genetic characterization of the ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China. *Virol J* 2011 8: 1-9.