

野鸦椿果实乙酸乙酯萃取物化学成分及对 HepG2 细胞抑制作用研究

康钦钊^{1†}, 叶章楷^{2†}, 曾佑琴³, 谭玉柱^{1,4*}, 陈胡兰^{1,3*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ²新疆师范大学, 乌鲁木齐 830000;

³成都中医药大学医学技术学院; ⁴西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

摘要: 研究野鸦椿 (*Euscaphis japonica* (Thunb.) Dippel.) 干燥成熟果实的乙酸乙酯部位化学成分及对 HepG2 细胞的抑制作用。采用多种柱色谱技术和半制备 HPLC 分离技术, 对野鸦椿果实的乙酸乙酯部分进行分离纯化, 分离所得化合物运用核磁共振技术进行结构鉴定。并采用 HepG2 细胞模型对这些化合物的抗肿瘤作用进行探究。最终分离得到 17 个化合物, 分别鉴定为齐墩果酸(1)、6 β -羟基白桦脂酸(2)、木鳖子酸(3)、2-氧代坡模酸(4)、坡模酸(5)、熊果酸(6)、23-醛坡模酸(7)、1-氧泰国树脂酸(8)、annurcoic acid(9)、马斯里酸(10)、山柰酚(11)、柚皮素(12)、芹菜素(13)、木犀草素(14)、圣草酚(15)、没食子酸甲酯(16)、原儿茶酸(17)。其中, 化合物 2、9、12~15 为首次从野鸦椿属中分离得到。化合物 2、5、6、10、13 对 HepG2 细胞有抑制作用。化合物 5 可抑制 HepG2 细胞增殖和迁移, 阻滞细胞周期于 G1 期; 促进细胞内活性氧的积累, 降低线粒体膜电位, 促进细胞凋亡。

关键词: 野鸦椿; 化学成分; 三萜; 结构鉴定; HepG2 细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)9-1472-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.9.003

Study on the chemical constituents from ethyl acetate extracts of *Euscaphis japonica* fruits and their inhibitory effect on HepG2 cells

KANG Qin-zhao^{1†}, YE Zhang-kai^{2†}, ZENG You-qin³, TAN Yu-zhu^{1,4*}, CHEN Hu-lan^{1,3*}

¹College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

²Xinjiang Normal University, Urumqi 830000, China; ³College of Medical Technology,

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; ⁴State Key Laboratory of Southwestern

Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: This study aims to investigate the chemical constituents of ethyl acetate extracts of *Euscaphis japonica* dry and mature fruits and their inhibition effect on HeG2 cells. The ethyl acetate part of *E. japonica* fruits was purified by various column chromatography and semi-prepared HPLC. The isolated compounds were identified by NMR technology. The HepG2 cell model was used to explore the anti-tumor effects of these compounds. Seventeen compounds were isolated and identified as oleanolic acid (1), 6 β -hydroxybetulinic acid (2), momordic acid (3), 2-oxopomolic acid (4), pomolic acid (5), ursolic acid (6), 23-aldehydepomolic acid (7), 1-oxosiaresinolic acid (8), annurcoic acid (9), maslinic acid (10), kaempferol (11), naringenin (12), apigenin (13), luteolin (14), eriodictyol (15), methyl gallate (16), protocatechuic acid (17). Among them, compounds 2, 9, 12-15 were first isolated from the genus. Compounds 2, 5, 6, 10, 13 had an inhibitory effect on HepG2 cells. Compound 5 inhibited HepG2 cell proliferation and migration, blocked the cell cycle in G1 phase; promoted the accumulation of reactive oxygen species, reduced the mitochondrial membrane potential, and promoted apoptosis.

Key words: *Euscaphis japonica* (Thunb.) Dippel.; chemical constituents; triterpenes; structural identification; HepG2 cells; cell apoptosis

收稿日期: 2024-03-12

接受日期: 2024-06-21

基金项目: 厅局级项目-重庆市食品药品检验检测研究院(322019047); “杏林学者”学科人才科研提升计划-青基人才专项(330022010)

† 共同第一作者

* 通信作者 Tel: 86-018683686528, E-mail: tanyuzhu@cdutcm.edu.cn, chenlulan@cdutcm.edu.cn

野鸦椿(*Euscaphis japonica* (Thunb.) Dippel.) 是省沽油科野鸦椿属植物,为落叶小乔木或灌木,生长于山坡、河边的丛林或灌丛中,除西北地区,全国各地都有分布,主要产于江南及西南地区^[1]。野鸦椿果实是中药材野鸦椿的药材植物基源,又称鸡眼睛,鸡肾果等。野鸦椿具有理气止痛,祛风止痒,消肿散结的功效,可以用于治疗头痛,眩晕,胃痛,子宫下垂,阴痒,脱肛等病症^[2]。野鸦椿也是中成药感冒解毒片和血脉通胶囊的主要组成药物,临床上也可以治疗感冒,胸痹^[3]。野鸦椿富含黄酮、木脂素、三萜、酚酸等化学成分,具有抗肿瘤、抗肝纤维化、抗氧化、抗炎、降血脂、抗菌等药理作用^[3-5]。

肝癌是一种常见的高发性恶性肿瘤,死亡率常年居高不下^[6]。肝细胞癌是肝癌中最常见类型,超75%的肝癌都属于肝细胞癌范畴^[7]。人肝癌细胞(HepG2)是一类常见的引发肝细胞癌的肿瘤细胞系,可作为研究肝癌发生、体外药物作用的理想细胞模型^[8]。近些年,随着越来越多天然产物被证明具有良好的抗肿瘤活性,从天然产物中发现新的抗癌药物成为一个重要的研究领域。野鸦椿被证实对多种癌细胞系有抑制活性,但是未见抗肝癌细胞活性的报道^[9]。为了进一步丰富野鸦椿化学成分库,并发现潜在抗肿瘤活性化合物,本研究对野鸦椿果实乙酸乙酯部分进行分离纯化,并进一步探索分离得到的化合物对 HepG2 细胞抑制作用。旨在促进野鸦椿的研究与开发利用,为潜在的抗肝癌药物的发现提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:半制备梯度液相系统(LC52型,赛谱锐思科技有限公司);快速液相制备色谱系统(HS-1200P18型,天津博纳艾杰尔科技有限公司);倒置荧光显微镜(CKX53型,奥林巴斯);CO₂培养箱(HCP-168型,青岛海尔生物医疗股份有限公司);流式细胞仪(FACSCanto II型,美国BD公司);光吸收全波长酶标仪(ReadMax 1200型,上海闪谱生物科技有限公司);标准试剂超纯水机(WBZ1001-UP型,安徽皖仪科技股份有限公司);低速离心机(L-500型,长沙湘仪离心机仪器有限公司);核磁共振波谱仪(Avance NEO-600, Avance NEO-700 spectrometers, Bruker 公司)。

试剂:石油醚、甲醇、乙酸乙酯、正丁醇、二氯甲烷(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);DMEM

培养液(批号:23258911, Biosharp);胎牛血清(批号:23296655, Biosharp);青霉素-链霉素溶液(批号:68060500, 100 ×, Biosharp);1 × PBS 缓冲液(批号:23314817, pH7.2 ~ 7.4, Biosharp);CCK-8 试剂盒(批号:23264618; Biosharp);胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)含酚红(批号:2308002, Solarbio);二甲亚砜(批号:401Q035;细胞培养级, Solarbio);活性氧检测试剂盒(批号:2311004; Solarbio);线粒体膜电位检测试剂盒(批号:0103A24, Leagene);碘化丙啶 PI 染色液(批号:1211A23, 含 RNase, Leagene);细胞凋亡试剂盒(批号:230712L01-53; FITC-Annexin V/PI, Uelandy);紫杉醇(批号: C15703695, 纯度 > 98%, 上海麦克林生化科技股份有限公司)。

1.2 材料

野鸦椿果实购买于安徽亳州药材市场,经成都中医药大学王光志教授鉴定为省沽油科野鸦椿属野鸦椿 *Euscaphis japonica* (Thunb.) Dippel. 的干燥成熟果实,保存于成都中医药大学中药化学提取分离鉴定实验室,果实粉碎后过3号筛备用。

人肝癌细胞(HepG2)购买于中国科学院上海细胞库。

1.3 方法

1.3.1 提取与分离

将干燥野鸦椿果实 10 kg, 粉碎, 用甲醇渗漉提取, 提取 48 h, 过滤; 滤渣再加入 50% 甲醇渗漉提取, 提取 48 h, 过滤。合并两次提取液, 浓缩得浸膏约 1 480 g。浸膏依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取 5 次, 得到 34.3 g 石油醚部位、117.3 g 乙酸乙酯部位和正丁醇部位 187.6 g。乙酸乙酯部位用硅胶柱色谱纯化, 以石油醚-乙酸乙酯, (100:0→0:100) 进行洗脱, 随后再用甲醇洗脱剩余部分, 所得洗脱液经薄层点板显色后, 划分为 10 个段: Y-1 ~ Y-10 段。

将 Y-4 段经正相硅胶柱, 以石油醚-乙酸乙酯 (50:1→1:1) 进行洗脱, 洗脱液经 TLC 显色分析, 得到 6 个流分: Y-4-1 ~ Y-4-6。将 Y-4-4 经葡聚糖凝胶柱 (Sephadex LH-20), 用二氯甲烷-甲醇 (3:2) 进行洗脱, 分为 3 个流分: Y-4-4a ~ Y-4-4c。Y-4-4c 段采用半制备高效液相 (HPLC) C-18 反相硅胶柱进行纯化, 甲醇-水 (92:8) 洗脱, 流速 2 mL/min, 分离到化合物 **1** (10.3 mg, $t_R = 28.3$ min)。将 Y-4-5 段经正相硅胶柱, 以石油醚-乙酸乙酯 (20:1→1:1) 进行洗脱, 洗脱液经 TLC 显色分析, 得到 6 个流分: Y-4-5a

~Y-4-5f。Y-4-5d 段经葡聚糖凝胶柱(Sephadex LH-20),用二氯甲烷-甲醇(2:3)进行洗脱,洗脱液经 TLC 显色分析,得到 10 个流分:Y-4-5d-1 ~ Y-4-5d-10。Y-4-5d-6 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(95:5)洗脱,流速 2 mL/min,将其分为 3 个流分:Y-4-5d-6-1 ~ Y-4-5d-6-3。Y-4-5d-6-3、Y-4-5d-6-2 段分别经半制备高效液相分离纯化(洗脱条件:甲醇-水(88:12),流速 2 mL/min),得到化合物 **3**(3.2 mg, $t_R = 30$ min)和 **4**(3.5 mg, $t_R = 19.6$ min)。Y-4-5d-7 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(90:10)洗脱,流速 2 mL/min,分离到化合物 **2**(2.4 mg, $t_R = 20.8$ min)。Y-4-5e 段经中压半制备液相 C-18 反相硅胶柱划段,甲醇-水(90:10)洗脱,流速 20 mL/min,将其分为 5 个流分:Y-4-5e-1 ~ Y-4-5e-5。Y-4-5e-3 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(88:12)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **5**(55.2 mg, $t_R = 17.5$ min)。Y-4-5e-4 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(88:12)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **6**(5.1 mg, $t_R = 30.4$ min)。

Y-5 段经中压半制备液相 C-18 反相硅胶柱划段,甲醇-水(50:50→100:0)梯度洗脱 50 min,甲醇-水(100:0)等度洗脱 30min,流速 25 mL/min,将其分为 16 个流分:Y-5-1 ~ Y-5-16。将 Y-5-4 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(65:35)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **12**(6.5 mg, $t_R = 23.5$ min)。将 Y-5-4 段利用制备薄层色谱技术进行分离纯化,以二氯甲烷-甲醇(10:1)为展开剂,得到化合物 **11**(3.2 mg, $R_f = 0.3226$)。将 Y-5-9 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(80:20)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **8**(9.2 mg, $t_R = 24.5$ min)。将 Y-5-10 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(80:20)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **7**(4.5 mg, $t_R = 28.3$ min)。

Y-6 段经正相硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯(20:1→1:1)进行洗脱,洗脱液经 TLC 显色分析,得到 8 个流分:Y-6-1 ~ Y-6-8。Y-6-1 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(90:10)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **9**(3.7 mg, $t_R = 14.2$ min)。Y-6-4 段经中压半制备液相 C-18 反相硅胶柱划段,甲醇-水(50:50→100:0)梯度洗脱 50 min,甲醇-水(100:0)等度洗脱 40 min,流速 25 mL/min,

将其分为 7 个流分:Y-6-4-1 ~ Y-6-4-7。将 Y-6-4-1 段采用半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(25:75)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **17**(7.1 mg, $t_R = 18.5$ min)和化合物 **16**(10.6 mg, $t_R = 23.8$ min)。Y-6-5 段经中压半制备液相 C-18 反相硅胶柱划段,甲醇-水(50:50→100:0)梯度洗脱 50 min,甲醇-水(100:0)等度洗脱 30 min,流速 25 mL/min,将其分为 9 个流分:Y-6-5-1 ~ Y-6-5-9。Y-6-5-2 经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(60:40)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **14**(16.7 mg, $t_R = 23.6$ min)。Y-6-5-8 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(90:10)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **10**(12.2 mg, $t_R = 14.2$ min)。Y-6-7 段经半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(95:5)洗脱,流速 2 mL/min,得到 2 个流分:Y-6-7-1 和 Y-6-7-2。Y-6-7-2 段采用半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱进行二次制备,甲醇-水(78:22)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **13**(3.2 mg, $t_R = 19.4$ min)。

Y-7 段经正相硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯(20:1→1:1)进行洗脱,洗脱液经 TLC 显色分析,得到 9 个流分:Y-7-1 ~ Y-7-9。将 Y-7-4 利用半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱分离纯化,甲醇-水(92:8)洗脱,流速 2 mL/min,得到 2 个流分:Y-7-4-1 和 Y-7-4-2。将 Y-7-4-2 再利用半制备高效液相 C-18 反相硅胶柱进行二次制备,甲醇-水(80:20)洗脱,流速 2 mL/min,得到化合物 **15**(3.9 mg, $t_R = 14.4$ min)。

1.3.2 肝癌细胞增殖抑制活性考察

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(100 mg/L 链霉素和 1×10^5 IU/L 青霉素)在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养人肝癌细胞(HepG2 细胞)。细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板中(每孔 100 μL 细胞液),培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 含不同浓度化合物的培养基,设置 6 个复孔,继续培养 24 h,每孔加入 10% CCK-8 溶液 100 μL,继续培养 1 h,酶标仪于 450 nm 处,测定吸光度(A)。以公式(1)计算细胞抑制率(I),利用软件 SPSS 计算总三萜抑制肝癌细胞增殖的 IC₅₀。

$$I = (A_C - A_S) / (A_C - A_B) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_C 和 A_S 、 A_B 分别表示对照组、给药组和空白组的吸光度。

1.3.3 细胞增殖集落实验

HepG2 细胞的增殖能力采用集落形成法评估。

将细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种于 6 孔板中,用 DMEM(10% 胎牛血清)培养 24 h。然后用不同浓度坡模酸(pomolic acid, PMS)(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 12 h。然后,继续用 DMEM(10% 胎牛血清)培养 2 周,期间每 2 d 换液,培养结束后用 PBS 洗涤细胞 2 次,用 4% 多聚甲醛(PFA)固定 20 min,用结晶紫溶液染色 15 min。

1.3.4 细胞划痕实验

将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,用 DMEM(10% 胎牛血清)培养 48 h。当细胞生长到融合时,用不同浓度 PMS(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)刺激细胞 12 h。然后使用 200 μL 的移液管尖端划伤细胞层,并用 PBS 洗涤两次。然后继续使用无血清培养基培养细胞,并在显微镜下拍摄细胞 0、8、16、24、48 h 的愈合情况,使用 Image J 软件处理图片并计算细胞愈合面积与初始面积的比值。

1.3.5 细胞周期

将细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h。用不同浓度 PMS(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)处理 12 h 后,0.25% 胰蛋白酶处理,收集细胞,PBS 洗涤,预冷的 70% 乙醇重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。用 PBS 洗涤去除乙醇后,将细胞悬浮在 PI 染色溶液中。细胞液过 200 目细胞滤网,采用流式细胞术检测细胞周期,并采用 Flow Jo 软件进行分析。

1.3.6 活性氧水平检测

将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h。用不同浓度 PMS(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)处理 12 h,吸去原有培养液,按照检测试剂盒方法操作加入 DCFH-DA 探针,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。随后 PBS 洗涤细胞三次,充分去除残余 DCFH-DA。加入 1 mL 细胞培养基,使用荧光显微镜观察并记录细胞的染色情况,用 Image J 对实验数据进行处理。

1.3.7 线粒体膜电位变化检测

将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h,然后用不同浓度 PMS(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)处理 12 h。按照线粒体膜电位检测试剂盒说明配制相关试剂,去除原有细胞培养液,PBS 洗涤一次,按照试剂盒说明进行操作,荧光显微镜下观察并记录细胞染色情况,用 Image J 对实验数据进行处理。

1.3.8 细胞凋亡

将细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,

培养 24 h。然后用不同浓度 PMS(0、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)处理 12 h,收集细胞。按照试剂盒说明配制结合缓冲液,加入适量结合缓冲液重悬细胞,取 100 μL 细胞悬液分别加入 5 μL Annexin V-FITC 染液和 10 μL PI 染液,室温避光孵育 15 min。随后补加 400 μL 结合缓冲液,过 200 目细胞滤网,样品尽快流式细胞仪检测,并用 Flow Jo 软件分析数据。

2 结果与分析

2.1 化合物结构鉴定

化合物 1 白色粉末; ^1H NMR(700 MHz, CD_3OD) δ :5.24(1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-12), 3.14(1H, dd, $J = 11.6, 4.6$ Hz, H-3), 2.85(1H, dd, $J = 14.2, 4.6$ Hz, H-18), 2.00(1H, td, $J = 13.6, 4.1$ Hz, H-16), 1.16(3H, s, H-27), 0.97(3H, s, H-23), 0.94(3H, s, H-30), 0.94(3H, s, H-25), 0.90(3H, s, H-29), 0.82(3H, s, H-26), 0.77(3H, s, H-24); ^{13}C NMR(175 MHz, CD_3OD) δ :40.0(C-1), 28.0(C-2), 79.8(C-3), 40.0(C-4), 56.9(C-5), 19.6(C-6), 34.1(C-7), 40.7(C-8), 49.2(C-9), 38.3(C-10), 24.6(C-11), 123.7(C-12), 145.4(C-13), 43.2(C-14), 29.9(C-15), 24.1(C-16), 47.8(C-17), 42.9(C-18), 47.4(C-19), 31.7(C-20), 35.0(C-21), 34.0(C-22), 29.0(C-23), 16.4(C-24), 16.0(C-25), 17.9(C-26), 26.5(C-27), 182.2(C-28), 33.7(C-29), 24.2(C-30)。该化合物数据与文献^[10]结果基本一致,鉴定为齐墩果酸。

化合物 2 白色粉末;HR-ESI-MS: m/z 495.3433 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (计算值 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NaO}_4$, 495.3445),分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$ 。 ^1H NMR(700 MHz, CDCl_3) δ :4.74(1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-29), 4.61(1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-29), 4.51(1H, t, $J = 3.0$ Hz, H-6), 3.13(1H, m, H-3), 3.02(1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-19), 1.69(3H, s, H-30), 1.27(3H, s, H-26), 1.19(3H, s, H-25), 1.15(3H, s, H-24), 1.06(3H, s, H-23), 0.94(3H, s, H-27); ^{13}C NMR(175 MHz, CDCl_3) δ :40.8(C-1), 27.7(C-2), 79.3(C-3), 39.8(C-4), 55.8(C-5), 69.1(C-6), 41.8(C-7), 39.9(C-8), 51.3(C-9), 36.9(C-10), 21.1(C-11), 25.7(C-12), 37.5(C-13), 42.8(C-14), 32.3(C-15), 29.9(C-16), 56.5(C-17), 49.5(C-18), 47.0(C-19), 150.6(C-20), 37.0(C-21), 30.7(C-22), 27.8(C-23), 17.1(C-24), 17.9(C-25), 17.2(C-26), 15.1(C-27), 181.5

(C-28), 109.8 (C-29), 19.6 (C-30)。与文献^[11-13]的¹H NMR 和¹³C NMR 数据对比,发现化合物 **2** 与已知化合物(6 β -羟基白桦脂酸)很相似,但存在差异,随后对化合物 **2** 的 HSQC、HMBC、H-H COSY 和 NOESY 的数据进行分析,发现化合物 **2** 结构确实与文献结构一致,故鉴定为 6 β -羟基白桦脂酸。

化合物 3 白色粉末;¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ : 5.30 (1H, t, J = 3.8 Hz, H-12), 3.49 (1H, dd, J = 12.2, 4.8 Hz, H-3), 3.03 (1H, t, J = 12.0 Hz, H-2), 2.82 (1H, dd, J = 13.9, 4.5 Hz, H-18), 2.37 (2H, m, H-2, 9), 1.29 (3H, s, H-27), 1.17 (3H, s, H-25), 1.05 (3H, s, H-23), 1.01 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-26), 0.91 (3H, s, H-30), 0.82 (3H, s, H-29);¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ : 212.5 (C-1), 44.2 (C-2), 78.8 (C-3), 39.3 (C-4), 54.2 (C-5), 17.9 (C-6), 34.0 (C-7), 41.4 (C-8), 39.3 (C-9), 52.6 (C-10), 25.9 (C-11), 123.5 (C-12), 142.6 (C-13), 42.0 (C-14), 27.8 (C-15), 23.7 (C-16), 46.8 (C-17), 39.4 (C-18), 45.7 (C-19), 30.8 (C-20), 32.7 (C-21), 33.2 (C-22), 28.6 (C-23), 16.2 (C-24), 15.1 (C-25), 17.9 (C-26), 25.3 (C-27), 182.4 (C-28), 32.6 (C-29), 23.1 (C-30)。该化合物数据与文献^[14]结果基本一致,鉴定为木鳖子酸。

化合物 4 白色粉末;¹H NMR (700 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (1H, t, J = 3.3 Hz, H-12), 3.90 (1H, d, J = 3.8 Hz, H-3), 2.47 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-1), 2.10 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-1), 1.31 (3H, s, H-27), 1.21 (3H, s, H-29), 1.19 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-30), 0.88 (3H, s, H-25), 0.73 (3H, s, H-26), 0.69 (3H, s, H-24);¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃) δ : 53.1 (C-1), 211.2 (C-2), 83.0 (C-3), 45.9 (C-4), 54.6 (C-5), 18.8 (C-6), 32.5 (C-7), 40.5 (C-8), 47.4 (C-9), 43.9 (C-10), 23.7 (C-11), 128.6 (C-12), 138.4 (C-13), 41.2 (C-14), 29.5 (C-15), 25.5 (C-16), 47.8 (C-17), 53.2 (C-18), 73.2 (C-19), 41.5 (C-20), 27.6 (C-21), 37.5 (C-22), 28.4 (C-23), 16.7 (C-24), 16.3 (C-25), 16.6 (C-26), 24.5 (C-27), 182.2 (C-28), 26.1 (C-29), 16.3 (C-30)。该化合物数据与文献^[15]结果基本一致,鉴定为 2-氧代坡模酸。

化合物 5 白色粉末;¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ : 5.29 (1H, t, J = 3.7 Hz, H-12), 3.16 (1H,

dd, J = 11.6, 4.6 Hz, H-3), 2.51 (1H, s, H-18), 1.34 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-30), 0.80 (3H, s, H-29), 0.79 (3H, s, H-25);¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ : 39.9 (C-1), 27.9 (C-2), 79.8 (C-3), 39.8 (C-4), 56.8 (C-5), 19.6 (C-6), 34.2 (C-7), 41.1 (C-8), 48.8 (C-9), 38.1 (C-10), 24.7 (C-11), 129.5 (C-12), 140.0 (C-13), 42.6 (C-14), 29.6 (C-15), 26.6 (C-16), 49.3 (C-17), 55.1 (C-18), 73.6 (C-19), 43.1 (C-20), 27.3 (C-21), 39.0 (C-22), 28.8 (C-23), 16.6 (C-24), 15.9 (C-25), 17.5 (C-26), 24.8 (C-27), 182.3 (C-28), 27.1 (C-29), 16.3 (C-30)。该化合物数据与文献^[16]结果基本一致,鉴定为坡模酸。

化合物 6 白色粉末;¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ : 5.24 (1H, t, J = 3.7 Hz, H-12), 3.16 (1H, dd, J = 11.7, 4.5 Hz, H-3), 1.13 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-29), 0.97 (3H, s, H-26), 0.89 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-30), 0.86 (3H, s, H-24), 0.79 (3H, s, H-25);¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ : 40.0 (C-1), 27.9 (C-2), 79.7 (C-3), 39.8 (C-4), 56.7 (C-5), 19.5 (C-6), 34.3 (C-7), 40.8 (C-8), 49.3 (C-9), 38.1 (C-10), 24.4 (C-11), 126.9 (C-12), 139.6 (C-13), 43.2 (C-14), 29.2 (C-15), 25.3 (C-16), 49.4 (C-17), 54.4 (C-18), 40.4 (C-19), 40.4 (C-20), 31.8 (C-21), 38.1 (C-22), 28.8 (C-23), 16.4 (C-24), 16.0 (C-25), 17.7 (C-26), 24.1 (C-27), 181.7 (C-28), 17.8 (C-29), 21.6 (C-30)。该化合物数据与文献^[17]结果基本一致,鉴定为熊果酸。

化合物 7 白色粉末;¹H NMR (700 MHz, CD₃OD) δ : 9.31 (1H, s), 5.30 (1H, t, J = 3.8 Hz), 1.37 (3H, s), 1.20 (3H, s), 1.02 (3H, s), 0.99 (3H, s), 0.93 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.81 (3H, s);¹³C NMR (175 MHz, CD₃OD) δ : 39.4 (C-1), 27.0 (C-2), 72.9 (C-3), 56.8 (C-4), 48.7 (C-5), 21.8 (C-6), 33.5 (C-7), 41.4 (C-8), 48.5 (C-9), 36.9 (C-10), 24.6 (C-11), 129.1 (C-12), 140.1 (C-13), 42.7 (C-14), 29.6 (C-15), 26.6 (C-16), 48.5 (C-17), 55.1 (C-18), 73.6 (C-19), 43.1 (C-20), 27.3 (C-21), 39.0 (C-22), 208.6 (C-23), 9.4 (C-24), 16.1 (C-25), 17.5 (C-26), 24.8 (C-27), 180.4 (C-28), 27.1 (C-29),

16. 6(C-30)。该化合物数据与文献^[9]结果基本一致,鉴定为23-醛坡模酸。

化合物 8 白色粉末;¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ :5.29(1H, t, J = 3.8 Hz, H-12), 3.35(1H, dd, J = 12.1, 4.8 Hz, H-3), 3.27(1H, d, J = 3.8 Hz, H-19), 3.10(1H, t, J = 12.0 Hz, H-2), 1.32(3H, s, H-23), 1.31(3H, s, H-24), 1.03(3H, s, H-27), 1.00(3H, s, H-25), 0.96(3H, s, H-29), 0.94(3H, s, H-26), 0.83(3H, s, H-30);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ :215.4(C-1), 45.4(C-2), 79.8(C-3), 40.5(C-4), 55.9(C-5), 19.0(C-6), 33.8(C-7), 40.5(C-8), 40.8(C-9), 54.1(C-10), 26.5(C-11), 125.4(C-12), 143.8(C-13), 42.8(C-14), 29.6(C-15), 28.6(C-16), 46.8(C-17), 45.1(C-18), 82.3(C-19), 36.1(C-20), 29.5(C-21), 34.0(C-22), 28.7(C-23), 16.6(C-24), 15.3(C-25), 18.2(C-26), 25.1(C-27), 182.3(C-28), 29.0(C-29), 25.2(C-30)。该化合物数据与文献^[15]结果基本一致,鉴定为1-氧泰国树脂酸。

化合物 9 白色粉末;¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ :5.30(1H, t, J = 3.8 Hz, H-12), 4.58(1H, dd, J = 12.7, 6.4 Hz, H-1), 2.51(1H, s, H-18), 2.30(1H, dd, J = 12.4, 6.4 Hz, H-2), 1.32(3H, s, H-27), 1.30(3H, s, H-25), 1.19(3H, s, H-29), 1.12(3H, s, H-23), 1.11(3H, s, H-24), 0.92(3H, d, J = 6.7 Hz, H-30), 0.86(3H, s, H-26);¹³C NMR(175 MHz, CD₃OD) δ :70.4(C-1), 50.5(C-2), 217.1(C-3), 49.5(C-4), 58.9(C-5), 20.4(C-6), 33.9(C-7), 41.2(C-8), 48.3(C-9), 38.9(C-10), 24.8(C-11), 128.9(C-12), 140.3(C-13), 42.7(C-14), 29.6(C-15), 26.6(C-16), 48.9(C-17), 55.1(C-18), 73.5(C-19), 43.1(C-20), 27.3(C-21), 39.0(C-22), 25.4(C-23), 22.1(C-24), 16.4(C-25), 17.7(C-26), 24.8(C-27), 182.3(C-28), 27.0(C-29), 16.6(C-30)。该化合物数据与文献^[18]结果基本一致,鉴定为annurcoic acid。

化合物 10 白色粉末;¹H NMR(600 MHz, CD₃OD) δ :5.25(1H, t, J = 3.7 Hz, H-12), 3.61(1H, m, H-2), 2.90(1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 2.85(1H, dd, J = 14.0, 4.6 Hz, H-18), 1.16(3H, s, H-23), 1.01(3H, s, H-27), 1.00(3H, s, H-24), 0.94(3H, s, H-30), 0.91(3H, s, H-25), 0.81(3H, s, H-26), 0.80

(3H, s, H-29);¹³C NMR(150 MHz, CD₃OD) δ :48.1(C-1), 69.5(C-2), 84.5(C-3), 40.6(C-4), 56.7(C-5), 19.6(C-6), 33.9(C-7), 40.5(C-8), 48.8(C-9), 39.3(C-10), 24.6(C-11), 123.5(C-12), 145.3(C-13), 42.7(C-14), 28.8(C-15), 24.0(C-16), 47.6(C-17), 42.9(C-18), 47.2(C-19), 31.6(C-20), 34.9(C-21), 33.8(C-22), 29.3(C-23), 17.1(C-24), 17.5(C-25), 17.7(C-26), 26.4(C-27), 181.8(C-28), 33.6(C-29), 24.0(C-30)。该化合物数据与文献^[19]结果基本一致,鉴定为马斯里酸。

化合物 11 黄色粉末;¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ :8.09(2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.92(2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.42(1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.19(1H, d, J = 2.1 Hz, H-6);¹³C NMR(175 MHz, CD₃OD) δ :148.1(C-2), 137.2(C-3), 177.5(C-4), 158.3(C-5), 99.3(C-6), 165.6(C-7), 94.5(C-8), 162.5(C-9), 104.5(C-10), 123.7(C-1'), 130.7(C-2', 6'), 116.3(C-3', 5'), 160.6(C-4')。该化合物数据与文献^[20]结果基本一致,鉴定为山柰酚。

化合物 12 黄色粉末;¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ :7.32(2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.82(2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', 5'), 5.89(2H, dd, J = 7.8, 2.2 Hz, H-8, 6), 5.35(1H, dd, J = 13.0, 3.0 Hz, H-2), 3.12(1H, dd, J = 17.1, 13.0 Hz, H-3 α), 2.70(1H, dd, J = 17.1, 3.0 Hz, H-3 β);¹³C NMR(175 MHz, CD₃OD) δ :80.5(C-2), 44.1(C-3), 197.8(C-4), 164.9(C-5), 97.0(C-6), 168.4(C-7), 96.2(C-8), 165.5(C-9), 103.4(C-10), 131.1(C-1'), 129.0(C-2', 6'), 116.3(C-3', 5'), 159.1(C-4')。该化合物数据与文献^[21]结果基本一致,鉴定为柚皮素。

化合物 13 黄色粉末;¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ :7.85(2H, d, J = 8.6 Hz, H-2', 6'), 6.93(2H, d, J = 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.59(1H, s, H-3), 6.46(1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.21(1H, d, J = 2.1 Hz, H-6);¹³C NMR(175 MHz, CD₃OD) δ :166.3(C-2), 103.8(C-3), 183.9(C-4), 159.4(C-5), 100.1(C-6), 166.0(C-7), 95.0(C-8), 163.2(C-9), 105.3(C-10), 123.3(C-1'), 129.5(C-2', 6'), 117.0(C-3', 5'), 162.8(C-4')。该化合物数据与文献^[22]结果基本一致,鉴定为芹菜素。

化合物 14 黄色粉末;¹H NMR(700 MHz, CD₃OD) δ :7.38(2H, m, H-2', 6'), 6.90(1H, d, J =

8.2 Hz, H-5'), 6.54 (1H, s, H-3), 6.44 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ : 166.0 (C-2), 103.9 (C-3), 183.9 (C-4), 159.4 (C-5), 100.1 (C-6), 166.4 (C-7), 95.0 (C-8), 163.2 (C-9), 105.3 (C-10), 120.3 (C-1'), 114.1 (C-2'), 147.0 (C-3'), 151.0 (C-4'), 116.8 (C-5'), 123.7 (C-6')。该化合物数据与文献^[23]结果基本一致,鉴定为木犀草素。

化合物 15 黄色粉末; ^1H NMR (700 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.92 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 6.79 (2H, d, $J = 1.9$ Hz, H-5', 6'), 5.90 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.28 (1H, dt, $J = 12.8, 2.4$ Hz, H-2), 3.07 (1H, dd, $J = 17.2, 12.9$ Hz, H-3), 2.70 (1H, dt, $J = 17.1, 2.4$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (175 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 44.1 (C-2), 80.5 (C-3), 197.8 (C-4), 165.5 (C-5), 97.0 (C-6), 168.4 (C-7), 96.2 (C-8), 164.9 (C-9), 103.4 (C-10), 131.8

(C-1'), 114.7 (C-2'), 146.5 (C-3'), 146.9 (C-4'), 116.2 (C-5'), 119.3 (C-6')。该化合物数据与文献^[24]结果基本一致,鉴定为圣草酚。

化合物 16 白色粉末; ^1H NMR (700 MHz, CD_3OD) δ : 7.04 (2H, s, H-2, 6), 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ : 121.4 (C-1), 110.0 (C-2, 6), 146.5 (C-3, 5), 139.8 (C-4), 169.0 (C-7), 52.3 (C-8)。该化合物数据与文献^[25]结果基本一致,鉴定为没食子酸甲酯。

化合物 17 无色针晶 (甲醇); ^1H NMR (700 MHz, CD_3OD) δ : 7.41 (1H, brs, H-2), 7.40 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5); ^{13}C NMR (175 MHz, CD_3OD) δ : 123.2 (C-1), 117.7 (C-2), 146.1 (C-3), 151.5 (C-4), 115.7 (C-5), 123.9 (C-6), 170.3 (C-7)。该化合物数据与文献^[26]结果基本一致,鉴定为原儿茶酸。

化合物 1~17 的结构见图 1。

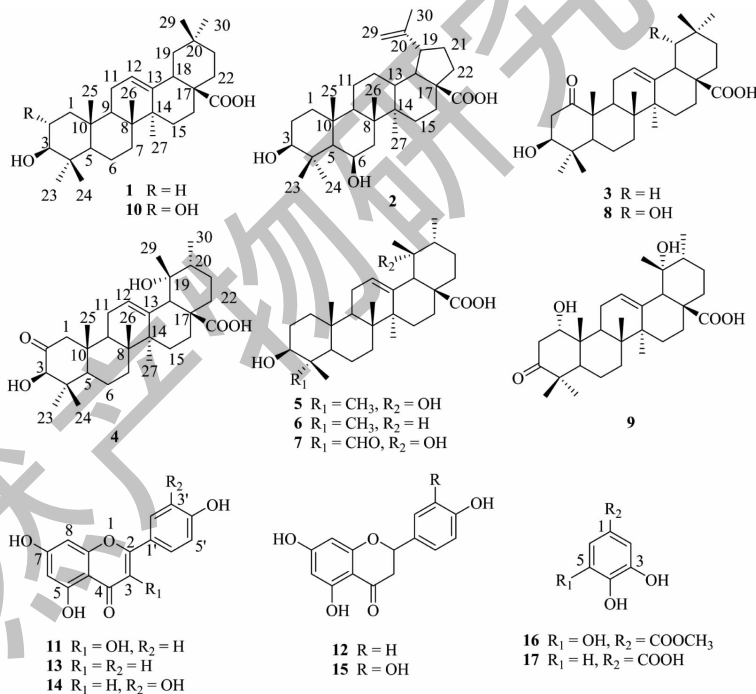


图 1 化合物 1~17 的结构

Fig. 1 Structures of compounds 1-17

2.2 化合物对 HepG2 细胞的抑制作用

为了从野鸦椿果实中发现具有抗 HepG2 细胞活性的化合物,本研究采用 CCK-8 法对分离到的化合物进行活性筛选。实验结果见表 1,化合物 2、5、6、10、13 在给药 24 h 的情况下对 HepG2 细胞具有

一定抑制作用,其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 28.41 ± 1.15 、 31.03 ± 0.72 、 41.42 ± 0.65 、 15.43 ± 0.67 、 43.64 ± 2.23 $\mu\text{mol/L}$ 。其余化合物的 IC_{50} 均大于 100 $\mu\text{mol/L}$,没有表现出对 HepG2 细胞的抑制作用。阳性药紫杉醇的 IC_{50} 为 10.32 ± 0.90 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 化合物对 HepG2 细胞的抑制活性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 1 The inhibitory activity of compounds on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)	化合物 Compound	IC ₅₀ (μmol/L)
1	>100	10	15.43 ± 0.67
2	28.41 ± 1.15	11	>100
3	>100	12	>100
4	>100	13	43.64 ± 2.23
5	31.03 ± 0.72	14	>100
6	41.42 ± 0.65	15	>100
7	>100	16	>100
8	>100	17	>100
9	>100	紫杉醇 Paclitaxel	10.32 ± 0.90

2.3 PMS 抑制 HepG2 细胞增殖和迁移

细胞集落实验结果见图 2, 与对照组相比, 实验组 HepG2 细胞随着坡模酸浓度的升高, 在 6 孔板中的细胞群落明显减少, 说明坡模酸可以有效的抑制 HepG2 细胞的增殖, 且呈剂量依赖性。细胞划痕实验结果见图 3 和图 4, 与对照组相比, 30 μmol/L 和 50 μmol/L 组划痕愈合程度明显降低, 说明 PMS 能

有效抑制 HepG2 细胞的迁移能力, 呈剂量依赖性。

2.4 PMS 对 HepG2 细胞周期的影响

为了探究坡模酸是否会影响到 HepG2 细胞的细胞周期, 对这些细胞进行 PI 染色, 并使用流式细胞术进行分析, 结果如图 5 和图 6 所示。与对照组 (G1 期: 64.1%; S 期: 17.7%; G2 期: 9.56%) 相比, PMS 进行给药后, 10 μmol/L 组 (G1 期: 74.3%; S

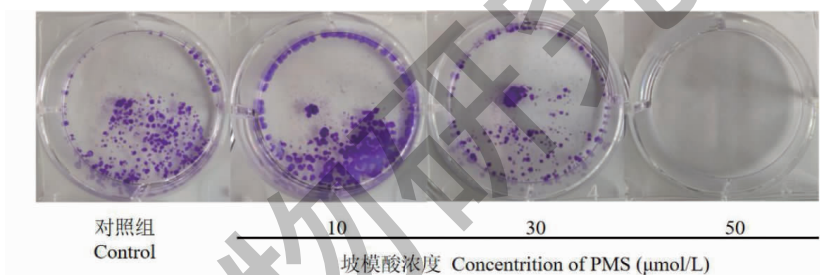


图 2 PMS 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Effects of PMS on the proliferation capacity of HepG2 cells

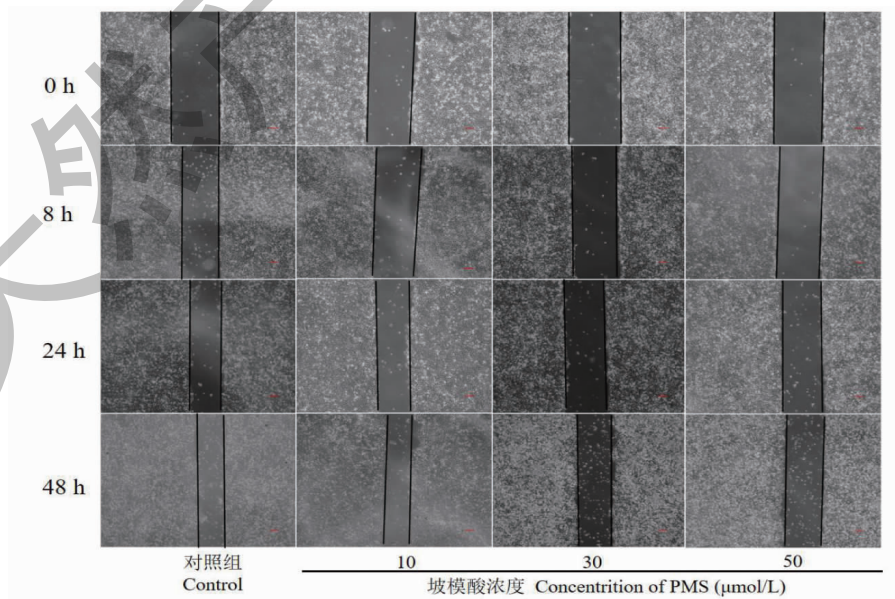


图 3 PMS 对 HepG2 细胞迁移能力的影响

Fig. 3 Effect of PMS on the migratory ability of HepG2 cells

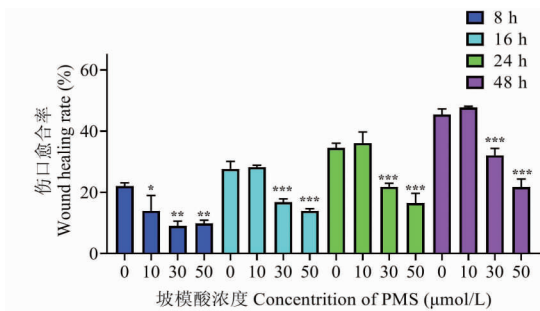


图4 PMS对伤口愈合能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of PMS on the wound-healing capacity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组(0 μmol/L)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,下同。Note:Compared with the control group (0 μmol/L),* $P < 0.05$;** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,the same below.

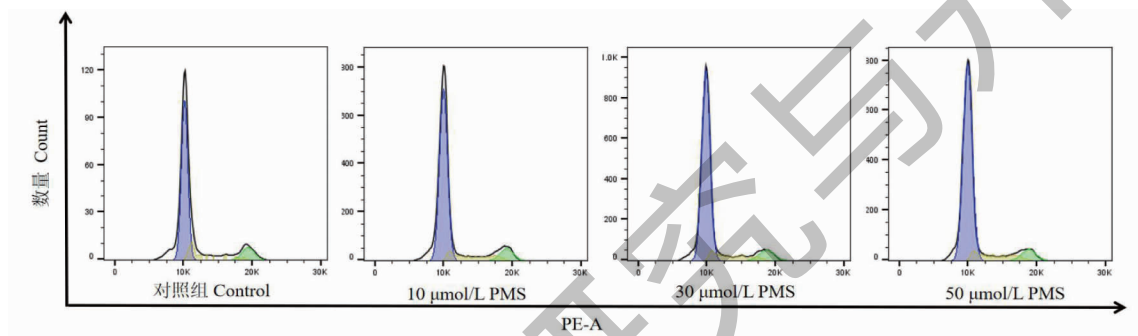


图5 HepG2细胞周期流式细胞图

Fig. 5 HepG2 cell-cycle flow cytometry diagram

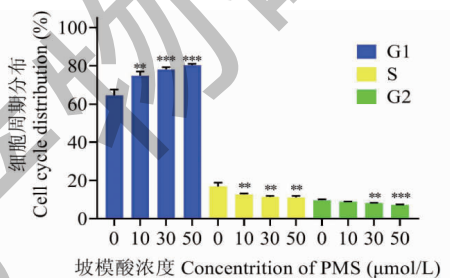


图6 PMS对HepG2细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of PMS on the cell cycle of HepG2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

期:13.1%;G2期:8.84%)、30 μmol/L组(G1期:78.0%;S期:11.9%;G2期:8.02%)、50 μmol/L组(G1期:80.2%;S期:11.8%;G2期:7.31%)的HepG2细胞处于G1期的细胞数量显著增加;而处于S期和G2期的细胞明显减少。这说明PMS可以将HepG2细胞阻滞在G1期,从而抑制细胞的增殖,且呈剂量依赖性。

2.5 PMS对HepG2细胞活性氧水平的影响

通过荧光显微镜分析HepG2细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,结果见图7和图8,与对照组相比,随着PMS浓度的增加,HepG2细

胞中ROS的荧光强度在逐渐升高,呈剂量依赖性。说明坡模酸可以促进细胞内ROS的积累,进而诱导细胞凋亡。

2.6 PMS对HepG2细胞线粒体膜电位的影响

荧光显微镜结果见图9和图10,对照组的JC-1主要以聚合物存在,表现为红色荧光,说明细胞线粒体膜电位正常;而不同浓度PMS处理后,JC-1聚合物减少,JC-1单体增多,表现为红色荧光减少,绿色荧光增多,说明PMS处理后细胞线粒体膜电位出现下降,且呈剂量依赖性。这些结果表明,PMS可以通过线粒体途径,诱导线粒体膜电位变化,进而促进细胞的凋亡。

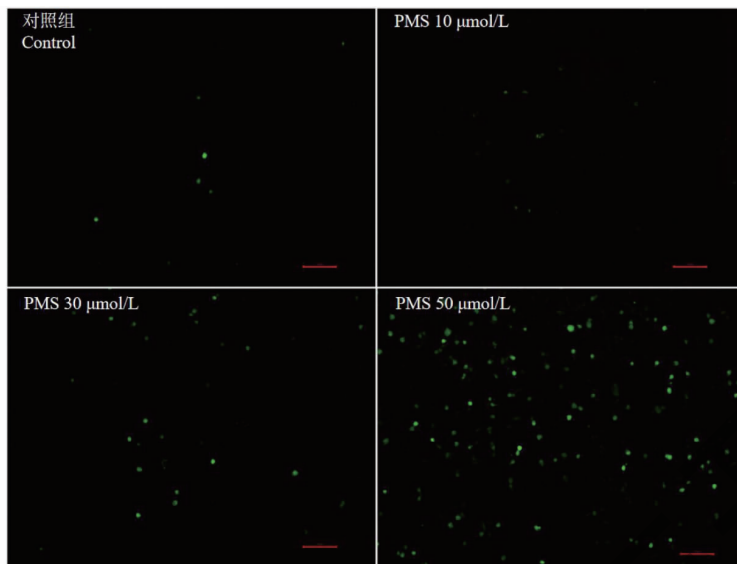


图 7 HepG2 细胞 ROS 水平荧光显微镜图

Fig. 7 Fluorescence micrographs of ROS levels in HepG2 cells

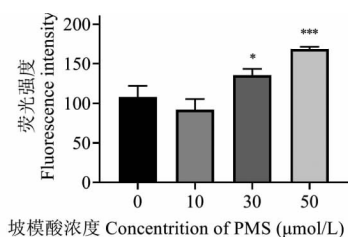


图 8 PMS 对 HepG2 细胞 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of PMS on the ROS levels in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 PMS 对 HepG2 细胞凋亡的影响

为了进一步探究 PMS 对 HepG2 细胞凋亡的影响,我们采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对细胞进行染色,并使用流式细胞术进行分析,结果见图 11 和图 12。与对照组相比,30 μmol/L 组和 50 μmol/L 组的凋亡细胞比例显著增加,其中晚期凋亡细胞的增加最为显著;而 10 μmol/L 组的早期凋亡和晚期凋亡的细胞比例均没有显著变化。

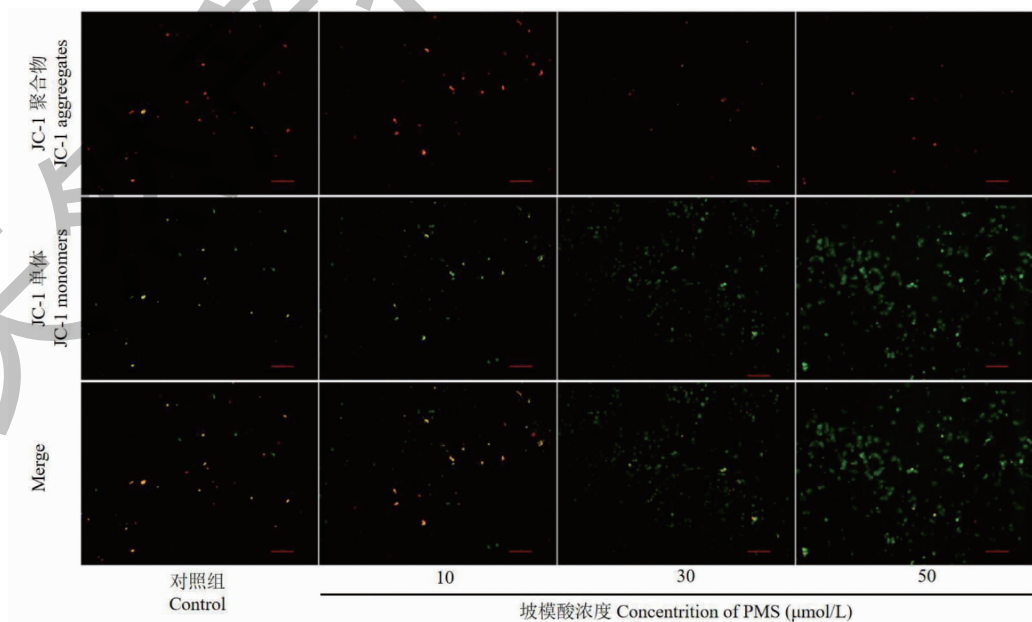


图 9 HepG2 细胞线粒体膜电位荧光显微镜图

Fig. 9 Fluorescence microscopy plots of the mitochondrial membrane potential in HepG2 cells

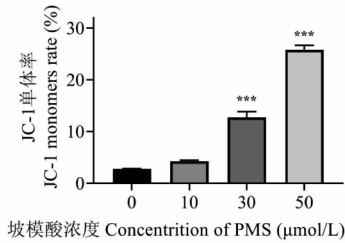


图 10 PMS 对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effect of PMS on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

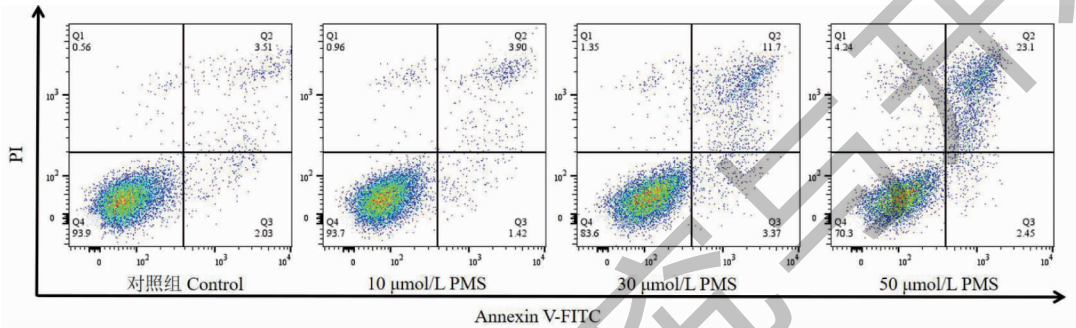


图 11 HepG2 细胞凋亡流式细胞图

Fig. 11 HepG2 apoptosis flow cytogram

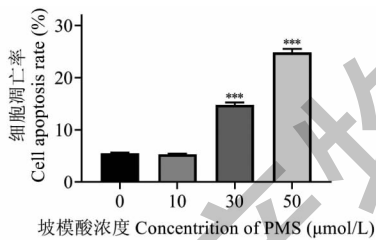


图 12 PMS 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Effect of PMS on HepG2 cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

形成 G1 期阻滞,从而抑制细胞的增殖,这与一些天然抗肿瘤药物的作用相似。线粒体凋亡是经典的凋亡途径之一,线粒体膜电位变化与之密切相关^[28],一旦线粒体跨膜电位消散,细胞将进入不可逆的线粒体凋亡^[29]。研究表明,ROS 可以参与细胞凋亡的启动,过高的 ROS 水平会引起氧化应激反应并诱导线粒体膜电位下降,进而引发细胞凋亡^[30]。坡模酸处理后,HepG2 细胞中 ROS 水平显著升高,细胞线粒体膜电位下降,细胞凋亡水平显著升高,说明坡模酸的促凋亡作用可能与线粒体介导的细胞凋亡途径有关。以上研究结果,为野鸦椿进一步开发利用提供了实验依据。

3 讨论与结论

本研究从野鸦椿果实乙酸乙酯萃取物中分离到 17 个化合物,三萜类 10 个(1~10),黄酮类 5 个(11~15),酚酸类 2 个(16~17)。其中化合物 2、9、12~15 为首次从野鸦椿属中分离得到。化合物 2、5、6、10、13 对 HepG2 细胞有抑制作用。化合物 5 (坡模酸)能够显著抑制细胞的增殖和迁移能力。细胞增殖与细胞的有丝分裂密切相关,而在癌细胞中,它会变得异常活跃,导致细胞过度增殖,进而发展成恶性肿瘤。本研究发现,坡模酸干预后,HepG2 细胞

参考文献

- 1 Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1981: 23-24.
- 2 Nanjing University of Chinese Medicine. Dictionary of traditional Chinese medicine (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 2979-2980.
- 3 Tang LJ, Luo W, Chen HL. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of *Euscaphis* plants [J]. Chem Ind Forest Prod (林产化学与工业), 2023, 43: 153-170.
- 4 Liang W-X, Ni L, Zou X-X, et al. Research progress on chemical constituents of *Euscaphis* and their pharmacological effects [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 1220-1226.
- 5 Man X-Z, Tan Y, Pei G. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Euscaphis* plants from China [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 723-730.
- 6 Qayum K, Kar I, Rashid U, et al. Effects of surgery, chemotherapy, and radiation on hepatocellular carcinoma patients: A SEER-based study [J]. Ann Med Surg (Lond), 2021, 69:

- 102782.
- 7 Sayiner M, Golabi P, Younossi ZM. Disease burden of hepatocellular carcinoma: a global perspective [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64:910-917.
- 8 Zhou JQ, Li HJ L, Zeng YH, et al. Baicalin induces ferroptosis in HepG2 cells by inhibiting ROS-mediated PI3K / Akt / FoxO3a signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2024, 49:1327-1334.
- 9 Cheng JJ, Zhang LJ, Cheng HL, et al. Cytotoxic hexacyclic triterpene acids from *Euscaphis japonica* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73:1655-1658.
- 10 Kishikawa A, Amen Y, Shimizu K. Anti-allergic triterpenes isolated from olive milled waste [J]. *Cytotechnology*, 2017, 69:307-315.
- 11 Estrada O, Contreras W, Acha G, et al. Chemical constituents from *Licania cruegeriana* and their cardiovascular and antiplatelet effects [J]. *Molecules*, 2014, 19:21215-21225.
- 12 Bilia AR, Morelli I. New lupane derivatives from the leaves of *Licania pyrifolia* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59:297-300.
- 13 Wickramasingha WGD, Jayasinghe S, Karunaratne DN, et al. Design and synthesis of novel derivatives of 6 β -hydroxy betunolic acid as antibacterial agents [J]. *Tetrahedron*, 2022, 128:133125.
- 14 Xiang DB, Hu QM, Tan Y, et al. Isolation and identification of triterpenoids from fruits of *Euscaphis fukienensis* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2015, 37:793-796.
- 15 Man XZ, Zhou F, Tan Y, et al. Chemical constituents from *Euscaphis fukienensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2019, 50:5924-5929.
- 16 Oanh VTK, Ha NTT, Duc HV, et al. New triterpene and norditerpene derivatives from the leaves of *Adinandra poilanei* [J]. *Phytochem Lett*, 2021, 46:110-113.
- 17 Chen XG, You RR, He DD, et al. Chemical constituents from Tibetan medicine *Swertia chirayita* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:5112-5116.
- 18 Hao Y, Luo XL, Wang M, et al. Chemical constituents of Bai medicine *Rubus delavayi* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2022, 31:27-30.
- 19 Jia RF, Liu HX, Huang ML, et al. Chemical constituents from *Agastache rugosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52:2284-2289.
- 20 Dong LM, Kong LX, Chen DDX, et al. Study on chemical constituents and antioxidant activities of flavonoids in fig [J]. *Chin Food Saf Mag* (食品安全导刊), 2023, 34:93-95.
- 21 Liu RH, Wen XC, Shao F, et al. Flavonoids from heartwood of *Dalbergia cochinchinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8:89-93.
- 22 Chang Y, Zhang P, Zhang X, et al. Cytotoxic activities of flavonoids from a traditional Mongolian medicinal herb *Clematis aethusifolia* Turcz [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31:1223-1227.
- 23 Yang TL, Qin LL, Feng D, et al. Chemical constituents of ethyl acetate extract from *Ajuga ovalifolia* var. *calantha* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26:188-194.
- 24 Gu P, Juan H, Ying-Jun Z, et al. Chemical constituents of *Schoenoplectus tabernaemontani* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51:4902-4906.
- 25 Yan YY, Liu G, Zhang XY, et al. A new monoterpene glycoside compound from roots of *Paeonia lactiflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51:5924-5928.
- 26 Lu AM, Fu H, Qin ZM, et al. Chemical constituents from caulis of *Whitfordiodendron filipes* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2019, 42:324-326.
- 27 Zhang SS, Han Y, Hou YD, et al. Study on the chemical constituents and antitumor activity of ethyl acetate extract of *Lindera reflexa* from Hunan Province [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报): 1-20 [2024-04-30]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2023-1279>.
- 28 Burke PJ. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3:857-870.
- 29 Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843:2240-2252.
- 30 Zhao Q, Zhong J, Bi Y, et al. Gambogic acid induces Noxa-mediated apoptosis in colorectal cancer through ROS-dependent activation of IRE1 α /JNK [J]. *Phytomedicine*, 2020, 78:153306.