

DOI:10.16305/j.1007-1334.2025.z20250422001

三尖杉中 5 个生物碱类化合物的分离和生物活性研究

陈昊元, 秦加旭, 闫洪玲, 李海阳, 赵群飞, 贺庆利

上海中医药大学创新中药研究院, 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室(上海 201203)

【摘要】 目的 发掘三尖杉的生物碱类成分,并探索其生物活性。方法 利用硅胶色谱、葡聚糖凝胶 LH-20 色谱及半制备高效液相色谱等多种色谱技术,从三尖杉二氯甲烷部位分离生物碱类化合物;利用一维/二维核磁共振(1D/2D NMR)、高分辨电喷雾电离质谱(HR-ESI-MS)和电子圆二色谱(ECD)分析确定化合物结构;利用刃天青(Alamar Blue)法检测化合物对宫颈癌细胞 HeLa 的细胞毒性,以及化合物对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人角质形成细胞(HaCaT)氧化损伤的保护作用。结果 从三尖杉中共分离得到 5 个生物碱类化合物 Cephalocyclidin A-N-oxide (1)、(R)-Fortunine (2)、4-Hydroxycephalotaxine (3)、Cephalocyclidin A (4) 和 Wilsonine (5),其中 1 为新化合物。体外活性检测显示,生物碱类化合物 1~5 没有明显的抗宫颈癌活性,其对 HeLa 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)均>100 μmol/L。化合物 1~5 对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 氧化损伤均具有显著的保护作用(P<0.01),且能抑制 H₂O₂ 刺激引起的活性氧(ROS)水平升高,其中化合物 2、4 和 5 的差异具有统计学意义(P<0.05)。结论 从三尖杉中分离得到的 5 种无侧链的生物碱类化合物对宫颈癌细胞无明显的抑制作用,但对 H₂O₂ 诱导的 HaCaT 氧化损伤具有显著的保护作用。这些发现为三尖杉来源天然产物的功效研究提供了新的方向。

【关键词】 三尖杉;生物碱;肿瘤;生物活性;氧化损伤;保护作用;中药研究

Isolation and biological activities study of five alkaloid compounds from *Cephalotaxus fortunei*

CHEN Haoyuan, QIN Jiaxu, YAN Hongling, LI Haiyang, ZHAO Qunfei, HE Qingli

Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To investigate the alkaloid components of *Cephalotaxus fortunei* and explore their biological activities. **Methods** Alkaloids compounds were isolated from the dichloromethane fraction of *Cephalotaxus fortunei* using chromatographic techniques such as silica gel, glucan gel LH-20, and semi-preparative high-performance liquid chromatography. The structures of the compounds were elucidated via one-dimensional/two-dimensional nuclear magnetic resonance (1D/2D NMR), high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), and electronic circular dichroism (ECD) analyses. The cytotoxic effect against HeLa cervical cancer cells and protective activity against H₂O₂-induced oxidative damage in Human keratinocytes (HaCaT) were assessed using the Alamar Blue assay. **Results** Five alkaloids compounds Cephalocyclidin A-N-oxide (1), (R)-Fortunine (2), 4-Hydroxycephalotaxine (3), Cephalocyclidin A (4), and Wilsonine (5) were isolated, of which compounds 1 is a new compound. *In vitro* activity assays showed that alkaloid compounds 1~5 had no significant anti-cervical cancer activity, and the median inhibitory concentration (IC₅₀) values for these compounds against HeLa cells were all > 100 μmol/L. Compounds 1~5 all exhibited significant protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage in HaCaT (P<0.01), and were able to inhibit the increase of reactive oxygen (ROS) levels caused by H₂O₂ stimulation, among which the differences of compounds 2, 4 and 5 were statistically significant (P<0.05). **Conclusions** The five alkaloid compounds without side chains isolated from *Cephalotaxus fortunei* had no significant inhibitory effect on cervical cancer cells. However, they demonstrated notable protective activity against H₂O₂-induced oxidative damage in HaCaT. These findings suggest a new direction for the efficacy study of natural products derived from *Cephalotaxus fortunei*.

Keywords: *Cephalotaxus fortunei*; alkaloids; tumor; bioactivity oxidative damage; protective effect; Chinese materia medica research

[基金项目] 国家自然科学基金项目(22177075)

[作者简介] 陈昊元,男,硕士研究生,主要从事三尖杉碱类化合物的分离和生物合成研究工作

[通信作者] 贺庆利,研究员,博士研究生导师;

E-mail: qinglihe@shutcm.edu.cn

三尖杉(*Cephalotaxus fortunei*)为三尖杉科(*Cephalotaxaceae*)三尖杉属(*Cephalotaxus*)乔木,三尖杉科仅 1 属 9 种,分布于亚洲东部至南亚次大陆,以我国分布最为集中,主要分布于浙江、安徽、福建等地^[1]。三

尖杉作为中国传统药用植物,其性味苦寒兼具涩感,具有显著的抗肿瘤活性,临床常用于恶性淋巴瘤、急性白血病及肺癌等肿瘤的辅助治疗。20 世纪 70 年代,我国启动天然产物抗肿瘤活性成分筛选与分离研究计划,从海南粗榧中成功鉴定出三尖杉酯碱及高三尖杉酯碱,两者通过干扰核糖体功能特异性抑制癌细胞增殖,临床实践表明其可有效干预急性早幼粒细胞白血病、急性单核细胞白血病等血液系统恶性肿瘤^[2]。2012 年,高三尖杉酯碱经美国食品药品监督管理局(FDA)认证,被用于成人慢性粒细胞白血病临床治疗,系全球首个获此类适应证监管批准的小分子靶向药物,至今仍为 FDA 唯一授权的蛋白质翻译抑制剂^[2]。

三尖杉属次生代谢产物的核心组成为含氮杂环化合物(生物碱),依据其骨架特征可系统划分为两类:三尖杉碱型(Cephalotaxine-type)与高刺桐碱型(Homocrythrina-type)。其中,前者为三尖杉科植物的特异性组分;而后者除在该科植物中富集外,亦广泛分布于红豆杉科(Taxaceae)植物及部分被子植物中。早在 1954 年,Wall 等^[3]报道了三尖杉属植物含有生物碱类化合物;1963 年,Paudler 等^[4]从日本粗榧中首次分离得到晶状生物碱;1972 年,Abraham 等^[5]通过 X 射线单晶衍射确认了其结构。到目前为止,有 100 多种三尖杉属植物来源的生物碱成分被分离和鉴定^[6]。三尖杉科植物普遍存在着生长缓慢和药用价值高的特点,导致三尖杉科的药用植物被乱砍滥伐,多种三尖杉属植物被列入《中国生物多样性红色名录》^[7],特别是贡山三尖杉(*Cephalotaxus lanceolata*)和海南粗榧(*Cephalotaxus hainanensis*)已成为极危和濒危植物。

揭示三尖杉生物碱类次生代谢产物的生物合成机制,并通过微生物异源合成实现规模化制备,是推进该药用植物资源可持续开发的重要技术策略。然而,由于其化学结构的高度修饰性,该类化合物的核心合成途径尚未完全阐明。2023 年,乔飞团队率先解析了三尖杉属中苯乙基异喹啉生物碱(PIAs)的早期合成通路,发现关键的苯乙基异喹啉骨架合酶(ChPSS)通过皮克特-斯彭格勒缩合反应驱动 PIAs 与苜基异喹啉通路的分歧^[8]。本研究以江西修水产的三尖杉为研究对象,系统分离鉴定其生物碱类成分及潜在合成前体物质,同时评估目标抗宫颈癌活性及对过氧化氢(H₂O₂)诱导人角质形成细胞(HaCaT)氧化应激损伤的修复活性,旨在为后续解析其生物合成网络及关键酶功能提供物质基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 三尖杉枝叶采自江西省修水县竹坪乡板山(批号:P20240620XS),由北京时珍中草药技

术有限公司周成明博士鉴定为三尖杉(*Cephalotaxus fortunei*)。

DNA 分子量标准 Marker(批号:B500351-0500),生工生物工程(上海)股份有限公司;活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:MA0219-1),大连美仑生物技术有限公司;Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶(批号:P505-d1),南京诺唯赞生物科技有限公司;DNA 切胶回收试剂盒(批号:D6943-02),美国 OMEGA Bio-Tek 公司;100~200 目柱层析硅胶、200~300 目柱层析硅胶、HSGF254 型薄层层析硅胶板、葡聚糖凝胶 LH-20(批号分别为 P1916131、P3611748、P3537006、P3611748),上海泰坦科技股份有限公司;氘代氯仿(CDCl₃)、氘代甲醇(CD₃OD)、石油醚、二氯甲烷、甲醇(MeOH)、乙酸乙酯、95% 乙醇(批号分别为 PPEDAEQN、PCEDJHYH、PMDDURGN、PADH6R1X、RGDPRPXN、P3DHRR1X、MFR3RRHY),安耐吉(上海)医药化学有限公司;高效液相色谱(HPLC)用乙腈(批号:P241106520),美国 J.T. Baker 公司;刃天青(Alamar Blue,批号:R7107-5g),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.1.2 主要仪器 多功能酶标仪(型号:Spark),瑞士 Tecan 公司;PCR 扩增仪(型号:ProFlexTMBase),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DNA 电泳仪(型号:JY300C),北京六一生物科技有限公司;反相 HPLC 仪(型号:SIL-20ACHT UFLC),日本 Shimadzu 公司;凝胶图像采集系统(型号:GenoSens 1850),上海勤翔科学仪器有限公司;高速冷冻离心机(型号:Centrifuge 5910R),德国 Eppendorf 公司;反相高分辨液质联用色谱仪(型号:Agilent 6545 Accurate-Mass Q-TOF),美国 Agilent Technologies 公司;台式常温离心机(型号:Centrifuge 5245),德国 Eppendorf 公司;反相制备液相色谱仪(型号:Agilent 1260 Infinity II PrepLC System),美国 Agilent Technologies 公司;科思美析 π-NAP 色谱柱(型号:08089-01、08086-31),日本 Nacalai Tesque 公司;ZORBAX StableBond C₁₈ 色谱柱(型号:877250-102),美国 Agilent Technologies 公司;400 MHz 核磁共振(NMR)波谱仪(型号:AVANCE NEO),瑞士 Bruker 公司。

1.2 三尖杉枝叶的内部转录间隔区(ITS)序列鉴定

本研究选择从基因层面上鉴定三尖杉枝叶来源。参照改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取三尖杉枝叶的 DNA 全基因组^[9],以《中华人民共和国药典(2020 年版):四部》^[10]中所报道的植物 ITS 序列作为引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。通过 Phanta Max Super-Fidelity DNA 聚合酶克隆出 DNA 片段,琼脂糖凝胶电泳后,回收扩增片段,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果通过 BLAST 工具进行分析,鉴定枝叶物种来源。

表1 内部转录间隔区(ITS)引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
ITS2-F	ATGCGATACTTGCTGTGAAT	20
ITS3-R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	21

注:ITS2-F为扩增正向引物,ITS3-R为扩增反向引物。

1.3 三尖杉枝叶化合物的分离方法 将三尖杉干燥枝叶样本(20 kg)经粉碎预处理后,以8倍体积的95%乙醇冷浸处理12 h,随后采用加热回流法进行两次提取(每次2 h)。合并滤液并经减压浓缩至无醇味,获得深褐色浸膏。向浸膏中按1:2比例加入石油醚,进行液-液分配萃取,分离脂溶性杂质。所得酸性水相采用6 mol/L盐酸调节pH至2.5,低温静置12 h后真空抽滤除去沉淀。滤液经碳酸钠溶液碱化至pH 10后,以二氯甲烷进行3次反萃取,合并有机相并通过旋转蒸发浓缩获得二氯甲烷相。萃取后的水相经乙酸乙酯(1:2)2次萃取后,最终获得4个不同极性的组分:石油醚相(低极性)、二氯甲烷相(中极性)、乙酸乙酯相(高极性)及残余水相。对二氯甲烷相实施靶向分离:采用200~300目硅胶固定相色谱柱,以二氯甲烷-MeOH混合溶剂(初始比例100:0,终末比例0:100)进行极性梯度洗脱,依据洗脱液极性差异收集7个亚组分(编号Fr.1~Fr.7)。

Fr.2组分(21.6 g)经硅胶柱色谱系统分离,以石油醚-乙酸乙酯溶剂梯度(100:0~0:100)洗脱,获得15个次级组分(Fr.2.1~Fr.2.15)。其中Fr.2.12(13.65 g)经凝胶色谱(流动相:二氯甲烷-MeOH,1:1)按时间分割为7个子组分(Fr.2.12.1~Fr.2.12.7)。Fr.2.12.3(3 g)通过半制备型HPLC系统,以MeOH-水(30%~50%)梯度洗脱,于保留时间(t_R =6 min)处收集获得化合物2(30 mg)。Fr.2.12.5(4.3 g)经相同HPLC系统(MeOH-水,40%~60%),在 t_R =7.2 min时分离出化合物5(40 mg)。

Fr.5组分(83 g)进行MCI柱层析分别以30%、50%、70%、95%、100%乙醇洗脱,分馏为5个次级组分(Fr.5.1~Fr.5.5)。Fr.5.3(36.5 g)通过硅胶柱色谱(二氯甲烷-MeOH,100:0~0:100)进一步细分出13个子组分(Fr.5.3.1~Fr.5.3.13)。Fr.5.3.12(5.4 g)经HPLC(MeOH-水,25%~50%)梯度洗脱,在 t_R =6.4 min时分离得到化合物1(23 mg)。Fr.5.3.4(11.5 g)采用凝胶色谱(二氯甲烷-MeOH,1:1)按洗脱顺序拆分为10个亚组分(Fr.5.3.4.A~Fr.5.3.4.J)。其中Fr.5.3.4.C(3.5 g)经HPLC(MeOH-水,10%~40%)于 t_R =8.8 min处纯化出化合物3(21 mg);Fr.5.3.4.E(2.5 g)在相同系统(MeOH-水,40%~60%)中于 t_R =6.3 min时获得化合物4(16 mg)。

1.4 电子圆二色谱(ECD)检测 化合物的构象分析使用了Spartan 14软件和Gaussian 16W程序进行分子Merck力场(MMFF)和DFT/TDDFT计算^[11]。MMFF构象搜索在10 kcal/mol能量窗口内生成的低能量构象异构体使用DFT方法在B3LYP/6-31g(d)水平进行几何优

化。在B3LYP/6-31g(d)条件下,利用MeOH溶剂中的PCM溶剂模型进行ECD计算。使用SpecDis 1.71程序比较计算的曲线和实验ECD光谱^[12]。

1.5 NMR检测 分离纯化得到干燥样品,取适量(5~10 mg)样品,加入0.5 mL相应氘代试剂并溶解,转移至核磁管中,用NMR波谱仪进行检测,收集数据并使用MestReNova软件进行处理和分析。

1.6 生物碱类化合物活性检测

1.6.1 抗宫颈癌活性检测(Alamar Blue法) 人宫颈癌细胞HeLa常规培养于添加体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基中(37℃,体积分数5%的CO₂)。取对数生长期细胞,调整密度至 2×10^3 个/孔接种于96孔培养板,置于37℃、体积分数5%的CO₂的恒温孵育箱中持续培养24 h。随后梯度设置受试化合物浓度组(3.125~100 μmol/L),以平行样本设计原则向各孔施加不同剂量药物干预,同步设立对照(Control)组($n=3$)。完成药物暴露48 h后,向每孔定量添加10 μL浓度为0.2 g/L的Alamar Blue试剂,避光条件下持续培养6 h。采用全波长酶标检测系统在570 nm特征吸收峰处采集光密度(OD)数据,并计算细胞存活率,所有数据均以无化合物处理的Control组的平均值为基准进行标准化,计算公式:细胞存活率(%)=(实验组测量平均OD值/Control组平均OD值)×100%。继而通过非线性回归模型拟合计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

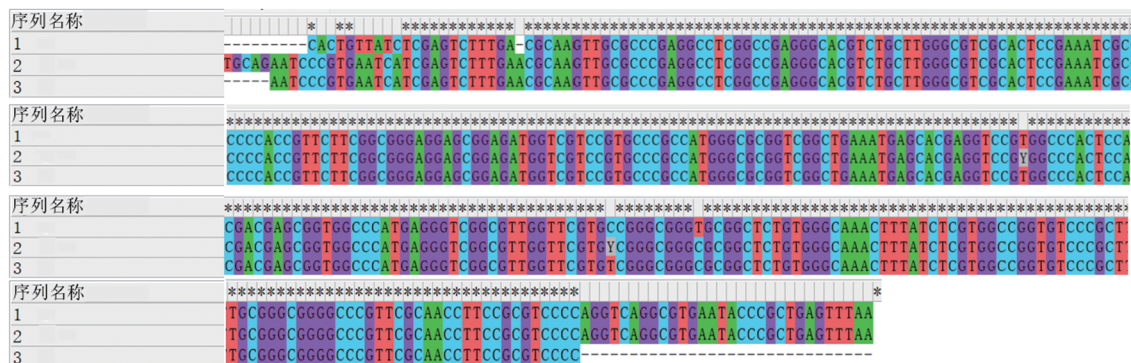
1.6.2 H₂O₂诱导的氧化损伤保护作用检测(Alamar Blue法) HaCaT在体积分数10%胎牛血清和1%抗生素混合物(青霉素和链霉素)的DMEM培养基中培养(37℃、体积分数5%的CO₂)。HaCaT(1.5×10^4 个/孔)接种于96孔板中培养12 h,然后用不同浓度(20、50或100 μmol/L)的化合物或100 μmol/L维生素E,预处理2 h。随后,预处理的细胞再用600 μmol/L H₂O₂培养6 h以诱导氧化损伤^[13],同时设置未加H₂O₂预处理的对照,用于检测化合物的毒性。最后采用Alamar Blue法测定细胞活力。

1.6.3 H₂O₂诱导的氧化损伤保护作用检测(ROS检测试剂盒法) 首先,以相同的方式对HaCaT进行化合物预处理及诱导氧化损伤,随后根据ROS检测试剂盒说明书,向每孔中加入终浓度为10 μmol/L的DCFH-DA(用无血清培养液稀释),37℃细胞培养箱内避光孵育25 min。用无血清培养液洗涤3次,除去多余DCFH-DA。利用多功能酶标仪进行扫描(488 nm激发波长,525 nm发射波长),采集荧光强度数据。

1.7 统计学方法 使用GraphPad Prism 10.1.2软件进行数据处理、统计分析和图形绘制。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析比较数据是否存在显著性差异。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三尖杉枝叶鉴定 使用 ITS 引物进行 PCR 扩增, 结果显示江西修水来源的药材有着明亮的电泳条带。



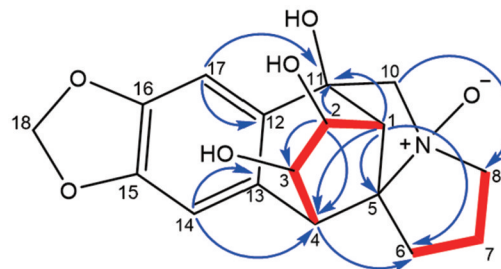
注: 1 为江西修水三尖杉序列, 2 为 Zuniga 等报道的三尖杉序列(来源: 史密森尼国家自然历史博物馆)^[14], 3 为 Li 等报道的三尖杉序列(来源: 中国植物条形码研究团队)^[15]。

图1 三尖杉内部转录间隔区(ITS)序列比对

2.2 三尖杉化合物分离结果分析 化合物 1 (23 mg) 为黄色油状物, $[\alpha]_D^{20}$ -36.21 (c 0.6, MeOH)。通过高分辨质谱 (HR-ESI-MS) $[M+H]^+$ m/z 334.129 9 (计算值 334.129 1, 对应分子式 $C_{17}H_{20}NO_6$) 结合氢核磁共振 (^1H NMR) 和碳核磁共振 (^{13}C NMR) 以及无畸变极化转移技术 (DEPT) 谱, 确定其分子式为 $C_{17}H_{19}NO_6$, 不饱和度为 9, 其 NMR 数据归属见表 2。通过分析化合物 1 的 ^1H NMR 谱 (400 MHz, CD_3OD), 发现在 δ_H 6.48 (1H, s) 和 6.92 (1H, s) 处有两个烯烃质子信号, 以及在 δ_H 4.37 (1H, t, $J=7.5$ Hz) 与 4.15 (1H, dd, $J=8.0, 4.8$ Hz) 处有两个连氧次甲基质子信号。在 δ_H 5.89 (2H, d, $J=4.0$ Hz) 处有 1 个连氧亚甲基质子信号。在 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) 谱图中共观察到 17 个碳信号, 结合 DEPT 谱可将其可分为: 5 个亚甲基信号 (δ_C 34.25, 24.69, 74.78, 82.27, 102.34), 6 个次甲基信号 (δ_C 58.37, 69.64, 74.08, 55.08, 109.76, 104.15) 和 6 个季碳信号 (δ_C 148.52, 148.20, 128.03, 134.95, 93.35, 81.24)。将化合物 1 和已知化合物 Cephalocyclidin A (4) 的 ^{13}C NMR 谱数据进行比对发现, 二者结构相似。其主要区别在于 C-8 (δ_C 74.78)、C-10 (δ_C 82.27) 的化学位移向低场移动, 结合 HR-ESI-MS, 我们推测化合物 1 的 N 上结合了 1 个 O, 根据氢-氢化学位移相关谱 (^1H - ^1H COSY) 的相关信号, 提示 C-1-C-2-C-3-C-4 和 C-6-C-7-C-8 的碳链连接顺序。碳-氢异核多键相关 (HMBC) 谱显示, H-1 与 C-4 (δ_C 55.08)、C-5 (δ_C 93.35)、C-6 (δ_C 34.25) 和 C-11 (δ_C 81.24) 相关, H-2 与 C-11 (δ_C 141.5)、C-4 (δ_C 55.08) 和 C-3 (δ_C 74.08) 相关, H-4 与 C-6 (δ_C 34.25) 相关, H-14 与 C-13 (δ_C 128.03) 和 C-4 (δ_C 55.08) 相关, H-17 与 C-11 (δ_C 81.24) 和 C-12 (δ_C 134.95) 相关, H-10 与 C-1 (δ_C 58.37)、C-11 (δ_C 81.24)、C-8 (δ_C 74.78) 和 C-12 (δ_C

测序后进行序列比对, 结果显示该植物的 ITS 序列与 Zuniga 等^[14]和 Li 等^[15]所报道的三尖杉 ITS 序列有着极高的同源性, 同源性为 99.67%, 由此鉴定该药材为三尖杉 (*Cephalotaxus fortunei*)。见图 1。

134.95) 相关, 见图 2。将其命名为 Cephalocyclidin A-N-oxide, 结构式见图 3。经 SciFinder 数据库检索发现, 相关文献中并未记载该化合物的解析及 NMR 数据, 确定其为新化合物。

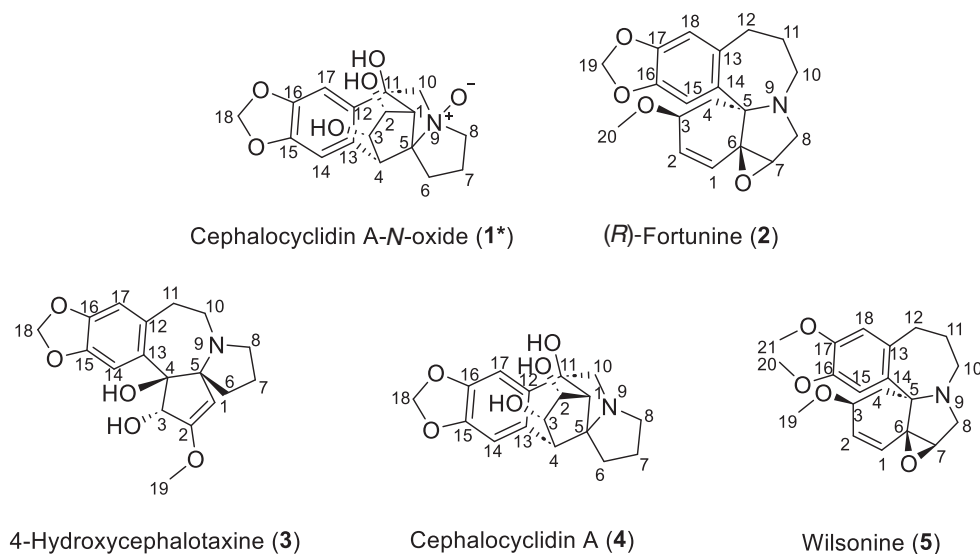


注: HMBC 为碳氢异核多键相关谱, 以红色线条表示; ^1H - ^1H COSY 为氢-氢化学位移相关谱, 以蓝色箭头表示。

图2 化合物 1 的关键 HMBC 和 ^1H - ^1H COSY 相关图

通过分析二维核间奥氏效应 (NOESY) 谱图和 ECD 谱图的量子化学计算数据阐明化合物 1 的立体构型。NOESY 相关性显示 H-1、H-2、H-3、H-4 和 H-6 位于分子平面的同一侧, 而 H-14 与 H-4 有 NOESY 相关性。最终通过 ECD 拟合计算以及实验 ECD 数据比较 (图 4), 确定其化合物的绝对构型为 (1R, 2R, 3S, 4S, 5R, 11S)。

化合物 2 (30 mg) 为黄棕色油状物, $[\alpha]_D^{20}$ 15.75 (c 0.8, MeOH)。通过 HR-ESI-MS $[M+H]^+$ m/z 328.154 9 (计算值 328.154 9, 对应分子式 $C_{19}H_{21}NO_4$), 结合 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 以及 DEPT 谱确定其分子式为 $C_{19}H_{21}NO_4$, 不饱和度为 10。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 数据: δ_H 6.95 (1H, s, H-18), 6.64 (1H, s, H-15), 6.07 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-2), 5.93 (2H, d, $J=9.7, 1.6$ Hz, H-19), 5.79 (1H, d, $J=10.2, 2.1$ Hz, H-1), 3.74 (1H, d, $J=12.3$ Hz, H-8), 3.51 (1H, m, H-3), 3.60 (1H, s,



注：“*”表示该化合物为新化合物。

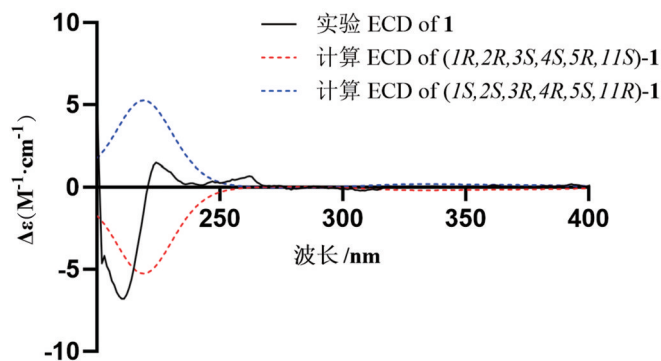
图3 三尖杉分离出的5个生物碱类化合物的化学结构式

表2 化合物1的核磁数据归属(^1H NMR 400 MHz, ^{13}C NMR 101 MHz, CD_3OD)

序号	δ_{H}	δ_{C}
1	3.00(1H, d, $J=6.9$ Hz)	58.37
2	4.37(1H, t, $J=7.5$ Hz)	69.64
3	4.15(1H, dd, $J=8.0, 4.8$ Hz)	74.08
4	3.12(1H, d, $J=4.8$ Hz)	55.08
5		93.35
6	2.18~2.10(2H, m, $J=9.9, 4.8$ Hz)	34.25
7	2.18(1H, m), 2.29(1H, m)	24.69
8	3.92(1H, m), 3.68(1H, dt, $J=12.4, 6.2$ Hz)	74.78
10	3.83(1H, d, $J=11.7$ Hz), 3.42(1H, d, $J=11.6$ Hz)	82.27
11		81.24
12		134.95
13		128.03
14	6.48(1H, s)	109.76
15		148.20
16		148.52
17	6.92(1H, s)	104.15
18	5.89(2H, d, $J=4.0$ Hz)	102.34

注： ^1H NMR为氢核磁共振， ^{13}C NMR为碳核磁共振， δ_{H} 为氢化学位移， δ_{C} 为碳化学位移， CD_3OD 为氘代甲醇。

H-7), 3.27(m, 1H, H-12), 3.33(3H, d, $J=1.0$ Hz, H-20), 3.21~2.98(4H, m, H-4, 8, 10), 2.71(1H, dt, $J=15.9, 3.7$ Hz, H-12), 1.91(2H, td, $J=12.5, 5.7$ Hz, H-11), 1.82(1H, m, $J=11.2$ Hz, H-4)。 ^{13}C NMR(101 MHz, CD_3OD)数据： δ_{C} 146.60(C-16), 145.34(C-17), 134.14(C-13), 133.38(C-2), 131.03(C-14), 126.69(C-1), 111.99(C-15), 109.66(C-18), 101.09(C-19), 75.98(C-3), 69.81(C-6), 68.98(C-5), 59.58(C-7), 56.25(C-20), 55.07(C-8), 49.81(C-10), 35.25(C-12),



注： $\Delta\epsilon$ 为摩尔吸光系数之差

图4 化合物1的实验电子圆二色谱(ECD)情况和计算ECD情况

31.88(C-4), 28.03(C-11)。以上数据与文献报道的(*R*)-Fortunine基本一致^[16],故鉴定化合物2为(*R*)-Fortunine,结构式见图3。

化合物3(21 mg)为棕褐色油状化合物,HR-ESI-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 332.150 2(计算值 332.150 3),确定其分子式为 $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ 。 ^1H NMR(400 MHz, MeOD)数据： δ_{H} 7.45(1H, s, H-14), 6.77(1H, s, H-17), 5.98(2H, d, $J=4.1$ Hz, H-18), 5.16(1H, s, H-1), 4.53(1H, s, H-3), 3.87(3H, s, H-19), 3.65(1H, td, $J=10.6, 6.2$ Hz, H-7), 3.58(1H, t, $J=10.2$ Hz, H-8), 3.33(2H, m, H-10, 8), 3.25~3.12(1H, m, H-10), 2.54(1H, m, $J=15.4, 7.7$ Hz, H-7), 2.45(1H, m, H-15), 2.11(1H, m, H-11), 2.02(1H, dd, $J=13.6, 8.3$ Hz, H-15), 1.95(1H, s, H-11)。 ^{13}C NMR(101 MHz, CD_3OD)数据： δ_{C} 167.02(C-2), 149.12(C-16), 148.87(C-15), 132.37(C-13), 129.75(C-12), 111.51(C-17), 109.67(C-16), 102.64(C-18), 92.61(C-1), 85.32(C-4), 84.92(C-3), 84.53(C-5), 58.26(C-19), 55.09(C-8), 49.31(C-10),

34.69(C-15), 29.58(C-7), 19.49(C-11)。以上数据与文献报道的 4-Hydroxycephalotaxine 基本一致^[17], 故可确定化合物 3 为 4-Hydroxycephalotaxine, 结构式见图 3。

化合物 4 (16 mg) 为棕褐色油状化合物, 通过 HR-ESI-MS $[M+H]^+$ m/z 318.136 6 (计算值 318.136 6), 确定其分子式为 $C_{17}H_{19}NO_5$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 数据: δ_H 6.94 (1H, s, H-17), 6.53 (1H, s, H-14), 5.87 (2H, s, H-18), 4.34 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-2), 4.17 (1H, dd, $J=8.0, 4.7$ Hz, H-3), 3.48 (1H, d, $J=10.3$ Hz, H-10), 3.36 (1H, m, $J=10.8, 5.4$ Hz, H-8), 3.26 (1H, d, H-10), 3.17 (1H, m, H-8), 3.07 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1), 2.95 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-4), 2.29 (1H, m, $J=14.4, 6.5$ Hz, H-7), 2.14 (2H, td, $J=8.0, 3.3$ Hz, H-6, 7), 1.92 (1H, m, $J=10.9, 6.5$ Hz, H-6)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) 数据: δ_C 149.41 (C-14), 148.36 (C-15), 135.79 (C-17), 126.35 (C-12), 111.18 (C-16), 104.57 (C-13), 102.52 (C-18), 83.28 (C-11), 81.47 (C-5), 74.70 (C-3), 69.12 (C-10), 68.81 (C-2), 56.93 (C-4), 55.63 (C-1), 55.44 (C-8), 34.54 (C-6), 25.22 (C-7)。以上数据与文献报道的 Cephalocyclidin A 基本一致^[18], 故可确定化合物 4 为 Cephalocyclidin A, 结构式见图 3。

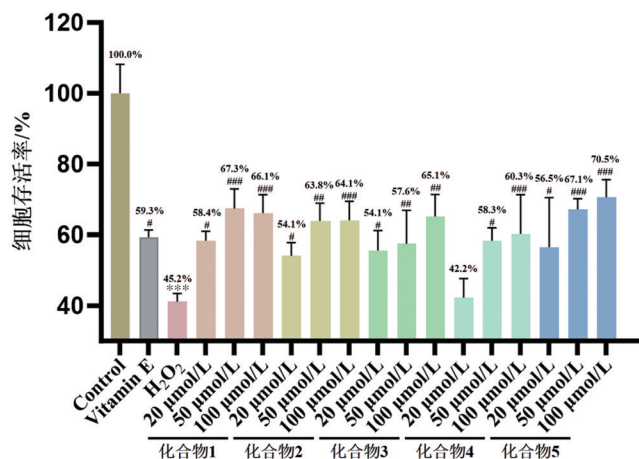
化合物 5 (40 mg) 为棕褐色油状化合物, 通过 HR-ESI-MS $[M+H]^+$ m/z 344.191 2 (计算值 344.191 4), 确定其分子式为 $C_{20}H_{25}NO_4$ 。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 数据: δ_H 7.01 (1H, s, H-15), 6.80 (1H, s, H-7), 6.08 (1H, dd, $J=10.3, 2.1$ Hz, H-2), 5.82 (1H, dd, $J=10.3, 2.2$ Hz, H-1), 3.81 (3H, s, H-19), 3.75 (3H, s, H-20), 3.67 (1H, s, H-7), 3.42 (1H, m, H-3), 3.37 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-8), 3.33 (1H, m, H-12), 3.29 (3H, s, H-21), 3.21 (1H, td, $J=12.8, 2.6$ Hz, H-10), 3.15 (1H, dd, $J=12.2, 4.8$ Hz, H-4), 3.03 (1H, d, $J=12.1$ Hz, H-8), 2.94 (1H, dd, $J=13.4, 3.8$ Hz, H-10), 2.77 (1H, m, H-12), 1.90 (1H, m, H-11), 1.79 (1H, t, $J=11.3$ Hz, H-4), 1.72 (1H, m, H-11)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD) 数据: δ_C 150.15 (C-17), 147.61 (C-16), 135.46 (C-2), 135.15 (C-13), 129.08 (C-14), 126.77 (C-1), 117.20 (C-18), 115.48 (C-15), 77.19 (C-3), 72.24 (C-6), 69.43 (C-5), 60.04 (C-7), 56.81 (C-19), 56.61 (C-20), 56.49 (C-21), 55.71 (C-8), 50.54 (C-10), 35.36 (C-12), 32.47 (C-4), 28.42 (C-11)。以上数据与文献报道的 Wilsonine 基本一致^[19], 故可确定化合物 5 为 Wilsonine, 结构式见图 3。

2.3 生物碱类化合物生物活性检测结果

2.3.1 抗宫颈癌活性 采用 Alamar Blue 法测定 5 个生物碱类化合物对宫颈癌 HeLa 细胞的体外抗肿瘤活性。结果显示, 化合物 1~5 对 HeLa 细胞的 IC_{50} 均 $>100 \mu mol/L$

L, 表明其对宫颈癌细胞没有明显的抑制作用。

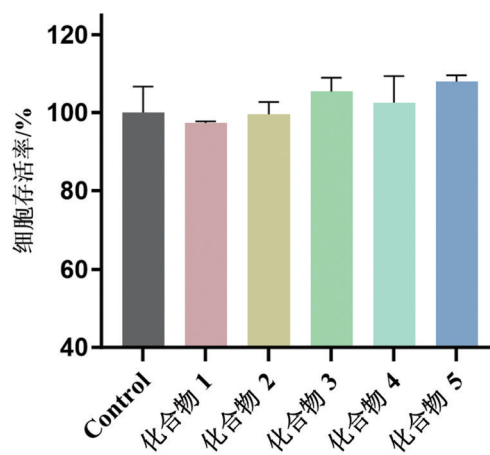
2.3.2 对 H_2O_2 诱导的氧化损伤保护作用 采用 Alamar Blue 法测定 5 个生物碱类化合物对 H_2O_2 (600 $\mu mol/L$) 诱导的 HaCaT 氧化损伤的保护作用。与 H_2O_2 组相比, 在 20 $\mu mol/L$ 浓度条件下, 仅化合物 4 对 H_2O_2 诱导的氧化损伤没有明显保护作用 ($P>0.05$); 在 50 $\mu mol/L$ 和 100 $\mu mol/L$ 浓度条件下, 所有化合物均表现出显著的细胞氧化损伤保护作用 ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。见图 5。



注: Vitamin E 为维生素 E。与对照组 (Control) 相比, *** $P<0.001$; 与过氧化氢组 (H_2O_2) 相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图 5 化合物 1~5 对 H_2O_2 诱导的人角质形成细胞 (HaCaT) 氧化损伤的保护作用

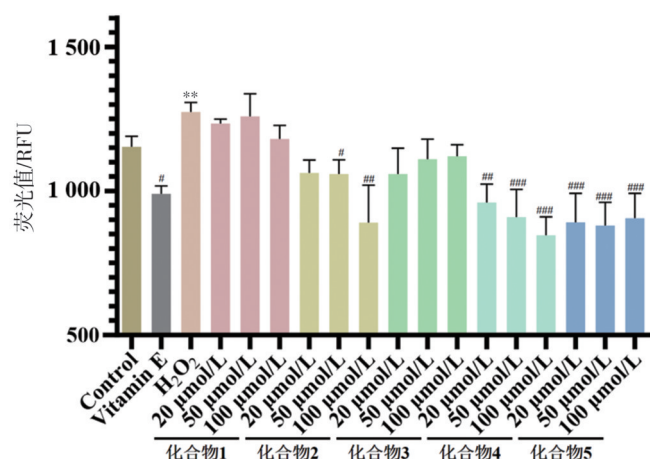
采用 Alamar Blue 法测定了 5 个生物碱类化合物对 HaCaT 增殖的影响。结果显示, 在 100 $\mu mol/L$ 浓度条件下, 所有化合物 (1~5) 处理后的 HaCaT 存活率均 $>95\%$, 表明在此浓度下这些化合物对 HaCaT 无明显毒性, 且各给药组存活率未显著高于对照组 ($P>0.05$), 提示其亦无促进 HaCaT 增殖活性的作用。见图 6。



注: Control 为对照。 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图 6 化合物 1~5 对人角质形成细胞 (HaCaT) 存活率的影响

采用 ROS 检测试剂盒法检测了 5 种生物碱类化合物对 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导的 ROS 水平升高的抑制作用。与对照组相比,化合物 1~5 均在一定程度上能抑制 H_2O_2 刺激引起的 ROS 水平升高,但只有化合物 2 (50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$)、4 (20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) 和 5 (20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) 的差异具有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), 表明这 5 个化合物对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 氧化损伤有保护作用,但是保护效果有所差异。见图 7。



注: Vitamin E 为维生素 E, ROS 为活性氧。与对照组 (Control) 相比, $**P<0.001$; 与过氧化氢组 (H_2O_2) 相比, $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, $\###P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图 7 化合物 1~5 对 H_2O_2 诱导的人角质形成细胞 (HaCaT) 中 ROS 水平升高的影响

3 讨论

本研究对来源于江西修水的三尖杉枝叶进行了天然产物的分离,运用不同柱色谱、制备 HPLC、半制备 HPLC 等技术对其二氯甲烷部位进行分离,共分离鉴定了 5 个生物碱类化合物 (包括 1 个新化合物),分别为 Cephalocyclidin A-N-oxide (1, 新化合物)、(R)-Fortunine (2)、4-Hydroxycephalotaxine (3)、Cephalocyclidin A (4) 和 Wilsonine (5)。虽然高三尖杉酯碱作为临床药物展现出良好的抗癌活性^[2],但是我们分离得到的无侧链的生物碱类化合物 1~5 没有明显的抗癌活性,表明三尖杉酯碱的侧链对其抗癌活性至关重要。然而化合物 1~5 对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 氧化损伤具有显著的保护作用,表明这类化合物在保护细胞氧化损伤方面具有良好的应用前景。本研究不仅拓展了三尖杉生物碱的结构多样性,丰富了天然生物碱资源库,同时为三尖杉属植物活性成分的深入研究和开发利用提供了重要的科学依据。

参考文献:

- [1] 方文培, 包士英, 庄璇. 中国植物志 (第 7 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] KANTARJIAN H M, O'BRIEN S, CORTES J. Homoharringtonine/

omacetaxine mepesuccinate: the long and winding road to food and drug administration approval [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013, 13(5): 530-533.

- [3] WALL M E, EDDY C R, WILLAMAN J J, et al. Steroidal sapogenins: XII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents [J]. J Am Pharm Assoc (Sci Ed), 1954, 43(8): 503-505.
- [4] PAUDLER W W, KERLEY G I, MCKAY J. The alkaloids of *Cephalotaxus drupacea* and *Cephalotaxus fortunei* [J]. J Org Chem, 1963, 28(9): 2194-2197.
- [5] ABRAHAM D J, ROSENSTEIN R D, LYON R L, et al. The structure elucidation of Rhazinilam, a new class of alkaloids from the apocynaceae, by X-ray analysis [J]. Tetrahedron Lett, 1972, 13(10): 909-912.
- [6] 肖舒, 丁杰. 濒危植物三尖杉枝叶的化学成分研究 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2594-2597.
- [7] 生态环境部, 中国科学院. 中国生物多样性红色名录—高等植物卷 (2020) [M]. 北京: 中国科学院生物多样性委员会, 2023: 384.
- [8] QIAO F, HE Y, ZHANG Y, et al. Elucidation of the 1-phenethylisoquinoline pathway from an endemic conifer *Cephalotaxus hainanensis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(1): e2209339120.
- [9] 卢雪雪, 张超裕, 张娟娟, 等. 巴戟天基因组 DNA 提取方法比较研究 [J]. 亚太传统医药, 2025, 21(6): 24-27.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 年版): 四部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 383.
- [11] Gaussian Inc. Gaussian technical support [EB/OL]. (2021-03-11) [2024-05-20]. <https://gaussian.com/techsupport/>.
- [12] BRUHN T, SCHAUMLOFFEL A, HEMBERGER Y, et al. SpecDis: quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra [J]. Chirality, 2013, 25(4): 243-249.
- [13] HU W, ZHANG J, WANG H, et al. Protective effects of isorhamnetin against H_2O_2 -induced oxidative damage in HaCaT cells and comprehensive analysis of key genes [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 2498.
- [14] ZUNIGA J D, GOSTEL M R, MULCAHY D G, et al. Data release: DNA barcodes of plant species collected for the global genome initiative for gardens program, national museum of natural history, smithsonian institution [J]. PhytoKeys, 2017, 88: 119-122.
- [15] LI D Z, GAO L M, LI H T, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [16] ZHANG F, YANG T, YANG K, et al. Cytotoxic alkaloids from the twigs and leaves of *Cephalotaxus sinensis* [J]. Org Biomol Chem, 2022, 21(1): 169-178.
- [17] MA G E N, SUN G Q, EL SOHLY M A, et al. Studies on the alkaloids of *Cephalotaxus*. III. 4-hydroxycephalotaxine, a new alkaloid from *Cephalotaxus fortunei* [J]. J Nat Prod, 1982, 45(5): 585-589.
- [18] KOBAYASHI J I, YOSHINAGA M, YOSHIDA N, et al. Cephalocyclidin A, a novel pentacyclic alkaloid from *Cephalotaxus harringtonia* var. *nana* [J]. J Org Chem, 2002, 67(7): 2283-2286.
- [19] POWELL R G. Structures of homoerythrina alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia* [J]. Phytochemistry, 1972, 11(4): 1467-1472.

编辑: 杨铁舜

收稿日期: 2025-04-22