

中成药, 2019, 41(3): 576-579.

[11] 王治阳, 叶同生, 唐素勤. 石草鞋化学成分的研究 (II) [J]. 中成药, 2019, 41(11): 2668-2671.

[12] 胡明娟, 唐 榆, 冯盏盏, 等. 甘松化学成分的研究[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1597-1601.

[13] 张 莲, 杨崇康, 罗启鹏, 等. 乌头地上部分非二萜生物碱类成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(3): 588-593.

[14] Maier U H, Rodl W, Deusneumann B, *et al.* Biosynthesis of erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(3): 373-382.

[15] 丁林芬, 王海垠, 王德升, 等. 毛梗豨莶化学成分的研究

[J]. 中成药, 2019, 41(4): 840-843.

[16] Qin N B, Sasaki T R, Li W, *et al.* Identification of flavonolignans from *Silybum marianum* seeds as allosteric protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33(1): 1283-1291.

[17] 王洪玲, 王 陆, 钟国跃, 等. 小大黄化学成分的研究 [J]. 中成药, 2020, 42(6): 1504-1507.

[18] Green L C, Wagner D A, Glogowski J, *et al.* Analysis of nitrate nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids[J]. *Anal Biochem*, 1982, 126(1): 131-138.

茶藨子木层孔菌化学成分及其抗肿瘤活性

鲍梦雨, 曹宸贞, 李媛媛, 刘玉红*, 马 艳*
(山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355)

摘要：目的 研究茶藨子木层孔菌 *Phellinus ribis* 的化学成分及其抗肿瘤活性。**方法** 茶藨子木层孔菌甲醇提取物采用硅胶、Sephadex LH-20、半制备型 HPLC 进行分离纯化，根据理化性质及波谱数据鉴定所得化合物的结构。采用 MTT 法评价其抗肿瘤活性。**结果** 从中分离得到 4 个化合物，分别鉴定为 inoscavin C (**1**)、phellifuropyranone A (**2**)、phelligridin D (**3**)、inoscavin A (**4**)，均能够在一定程度上抑制 HepG2 细胞的增殖，对 HepG2 细胞的抑制作用在 5~160 μmol/L 浓度范围内，呈剂量依赖性增长。**结论** 所有化合物均为首次从该真菌中分离得到，并均具有抗肿瘤活性。
关键词：茶藨子木层孔菌；化学成分；分离鉴定；抗肿瘤活性
中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2021)09-2384-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.019

Chemical constituents from *Phellinus ribis* and their antitumor activities

BAO Meng-yu, CAO Chen-zhen, LI Yuan-yuan, LIU Yu-hong*, MA Yan*
(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: AIM To study the chemical constituents from *Phellinus ribis* and their antitumor activities. **METHODS** The methanol extract from *P. ribis* was isolated and purified by silica, Sephadex LH-20, and semi-preparative HPLC, then the structures of obtained compounds were identified by physicochemical properties and spectral data. Their antitumor activities were evaluated by MTT method. **RESULTS** Four compounds were isolated and identified as inoscavin C (**1**), phellifuropyranone A (**2**), phelligridin D (**3**), inoscavin A (**4**), which had a certain inhibitory effect on the proliferation of HepG2 cells. The inhibitory effect of them on HepG2 cells increased in a dose-dependent manner within the concentration range of 5–160 μmol/L. **CONCLUSION** All the compounds are isolated from this fungus for the first time and have certain antitumor activities.

收稿日期: 2020-10-21
基金项目: 国家自然科学基金 (81402833, 81973218); 山东省自然科学基金 (ZR2019MH082); 泰山产业领军人才工程专项经费资助 (202103)
作者简介: 鲍梦雨 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为天然药物化学成分与生物活性。E-mail: 2358892122@qq.com
* 通信作者: 刘玉红 (1975—), 女, 教授, 博士生导师, 从事天然药物化学成分与生物活性研究。Tel (0531) 89628173, E-mail: yhliu@sdutcm.edu.cn
马 艳 (1977—), 女, 博士, 副教授, 从事中药质量控制研究。Tel (0531) 89628081

KEY WORDS: *Phellinus ribis*; chemical constituents; isolation and identification; antitumor activities

针层孔菌属为担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、锈革孔菌科^[1]，现有研究表明，该属真菌含有多糖、甾体类、萜类、黄酮类等活性成分，具有抗肿瘤、增强免疫、抗氧化等生物活性，呈现很好的市场开发前景^[2]。

茶藨子木层孔菌 *Phellinus ribis*，为针层孔菌属药用真菌，寄生于山楂、梨树的活体根茎上^[3]，主要分布于中国、日本、韩国。目前，国内外已经从茶藨子木层孔菌中分离得到多糖类、色素类、神经酰胺类、苯骈呋喃类成分^[4-6]，并且发现它们有抗肿瘤、增强免疫、神经保护等活性^[7-9]。为了进一步开发利用茶藨子木层孔菌资源，本实验对其甲醇提取物进行分离纯化，从中得到 4 个化合物，均为苯乙烯基吡喃酮衍生物。其中，化合物 **1~4** 均为首次从本真菌中分离得到，对肝癌 HepG2 的增殖均显示抑制作用，以 **1** 最显著。

1 材料

JMS-700 高分辨质谱仪（日本捷欧路公司）；Inova-600 型核磁共振仪（美国 Varian 公司）；半制备液相色谱仪（日本分光 Jasco 公司）；柱色谱硅胶（63~210 μm，日本关东化学株式会社）；薄层色谱硅胶 GF₂₅₄（德国 Merck 公司）；Sephadex LH-20（美国 GE Healthcare 公司）；Cosmosil 5C₁₈-MS-II 半制备色谱柱（10 mm×250 mm，5 μm，日本 Nacalai 公司）。所用试剂均为分析纯或色谱纯。

茶藨子木层孔菌采集于济南历城山区，由山东中医药大学药学教研室徐凌川教授鉴定为正品。

2 提取与分离

取 1.8 kg 茶藨子木层孔菌的干燥粗粉，用甲醇室温浸提 30 d，提取液减压浓缩得浸膏 20 g，浸膏用硅胶柱色谱进行初步分离，用二氯甲烷、二氯甲烷-乙酸乙酯（9：1、1：1）、乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇（9：1、7：3、1：1）依次洗脱，合并后得到 7 个流分 Fr. 1~7。

Fr. 4 经 Sephadex LH-20（甲醇）得 9 个部分（Fr. 4.1~Fr. 4.9），Fr. 4.5 经制备 HPLC 甲醇-水（1：1）分离纯化，得组分 Fr. 4.5.6，再经制备薄层氯仿-甲醇（7：3），得化合物 **4**（1.5 mg）。流分 Fr. 3 用 Sephadex LH-20（甲醇）分离，合并得到 8 个组分 Fr. 3.1~Fr. 3.8，Fr. 3.5 用硅胶柱色谱氯仿-甲醇（20：1）处理，再经 HPLC 柱甲醇-水（65：35）制备，得化合物 **1**（5 mg）；Fr. 3.7 经

HPLC 制备纯化，用丙酮-水（32：68，1% TFA）洗脱，得组分 Fr. 3.7.4（4.4 mg），溶于 500 μL 甲醇，静置 72 h，上清为化合物 **2**（1.2 mg），沉淀为化合物 **3**（1.8 mg）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：黄色粉末（甲醇），分子式 C₂₃H₁₆O₈。HRFAB-MS *m/z*：421.089 8 [M + H]⁺。¹H-NMR（600 MHz，丙酮-*d*₆）δ：7.36（1H，d，*J*=2.2 Hz，H-6'），7.35（1H，d，*J*=16.1 Hz，H-7），7.26（1H，dd，*J*=8.3，2.1 Hz，H-10'），7.19（1H，d，*J*=1.9 Hz，H-9），7.06（1H，dd，*J*=8.3，1.9 Hz，H-13），6.93（1H，d，*J*=8.3 Hz，H-9'），6.90（1H，s，H-4），6.88（1H，d，*J*=8.3 Hz，H-12），6.83（1H，d，*J*=15.9 Hz，H-6），2.67（3H，s，1'-CH₃）；¹³C-NMR（150 MHz，丙酮-*d*₆）δ：158.3（C-1），109.2（C-2），161.1（C-3），95.7（C-4），159.2（C-5），117.5（C-6），135.5（C-7），128.9（C-8），114.6（C-9），146.4（C-10），147.9（C-11），116.5（C-12），121.6（C-13），32.2（C-1'），196.9（C-2'），119.4（C-3'），154.8（C-4'），121.3（C-5'），115.3（C-6'），145.9（C-7'），148.4（C-8'），116.3（C-9'），120.9（C-10'）。以上数据与文献 [10] 基本一致，故鉴定为 inoscavin C。

化合物 **2**：深黄色无定型粉末，分子式 C₂₁H₁₄O₇。HRFAB-MS *m/z*：401.064 6 [M + Na]⁺。¹H-NMR（600 MHz，CD₃OD）δ：7.30（1H，d，*J*=15.9 Hz，H-2'），7.20（1H，d，*J*=2.1 Hz，H-2''），7.16（1H，dd，*J*=8.2，2.1 Hz，H-6''），7.04（1H，d，*J*=2.1 Hz，H-4'），6.96（1H，s，H-3），6.94（1H，dd，*J*=8.5，2.1 Hz，H-8'），6.83（1H，d，*J*=8.2 Hz，H-5''），6.83（1H，s，H-7），6.77（1H，d，*J*=8.2 Hz，H-7'），6.70（1H，d，*J*=15.8 Hz，H-1'）；¹³C-NMR（150 MHz，CD₃OD）δ：158.3（C-2），100.3（C-3），161.3（C-4），158.6（C-6），96.5（C-7），117.4（C-1'），135.5（C-2'），129.3（C-3'），114.7（C-4'），146.8（C-5'），148.3（C-6'），116.6（C-7'），121.6（C-8'），122.4（C-1''），112.7（C-2''），146.9（C-3''），148.0（C-4''），116.8（C-5''），117.9（C-6''），112.3（C-3a），162.7（C-7a）。以上数据与文献 [11] 基本一致，故鉴定为

phellifuropyranone A。

化合物 **3**: 黄色粉末, 分子式 $C_{20}H_{12}O_8$ 。HRFAB-MS m/z : 381.060 3 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.41 (1H, s, H-7), 7.60 (1H, s, H-10), 7.42 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-2'), 7.08 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-4'), 6.99 (1H, dd, $J=8.5, 1.9$ Hz, H-8'), 6.79 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-7'), 6.70 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-1'), 6.52 (1H, s, H-4); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 162.0 (C-1), 160.5 (C-3), 99.9 (C-4), 161.2 (C-6), 115.4 (C-7), 148.2 (C-8), 155.2 (C-9), 111.8 (C-10), 116.3 (C-1'), 138.1 (C-2'), 128.8 (C-3'), 114.9 (C-4'), 146.9 (C-5'), 149.1 (C-6'), 116.6 (C-7'), 122.3 (C-8'), 162.7 (C-4a), 112.6 (C-6a), 129.1 (C-10a), 100.6 (C-10b)。以上数据与文献 [12] 基本一致, 故鉴定为 phelligrudin D。

化合物 **4**: 橙黄色粉末, 分子式 $C_{25}H_{18}O_9$ 。HRFAB-MS m/z : 463.103 8 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.43 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7), 7.08 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H-9), 6.99 (1H, dd, $J=8.8, 1.9$ Hz, H-13), 6.79 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-12), 6.74 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-6), 6.74 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-10'), 6.70 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7'), 6.58

(1H, dd, $J=8.3, 2.1$ Hz, H-11'), 6.49 (1H, s, H-4), 5.65 (1H, s, H-5'), 5.57 (1H, s, H-2'), 1.97 (3H, s, 1'-CH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD) δ : 160.6 (C-1), 99.5 (C-2), 176.8 (C-3), 95.5 (C-4), 167.0 (C-5), 117.3 (C-6), 139.9 (C-7), 128.5 (C-8), 115.1 (C-9), 146.9 (C-10), 149.4 (C-11), 116.6 (C-12), 122.6 (C-13), 192.9 (C-1'), 105.1 (C-2'), 203.1 (C-3'), 94.5 (C-4'), 95.9 (C-5'), 123.2 (C-6'), 115.5 (C-7'), 146.3 (C-8'), 147.8 (C-9'), 115.9 (C-10'), 120.2 (C-11'), 16.6 (C-1' CH₃)。以上数据与文献 [13] 基本一致, 故鉴定为 inoscavin A。

4 抗肿瘤活性筛选

参照文献 [14] 方法, 测定化合物 **1~4** 在不同浓度下对肝癌 HepG2 细胞的抑制率。实验组每孔加入 20 μL 样品溶液, 终浓度分别为 5、10、20、40、80、160 $\mu mol/L$, 同时设空白对照组、阳性对照组 (5-Fu, 终浓度为 80 $\mu mol/L$), 每组重复 6 次, 结果见图 1。由此可知, 化合物 **1~4** 对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制活性在 5~160 $\mu mol/L$ 浓度范围内呈现出较好的剂量依赖性; 在浓度为 160 $\mu mol/L$ 时, 各化合物对 HepG2 细胞的抑制率分别为 71.8%、63.1%、45.2%、56.5%, 即 **1** 抑制作用较强。

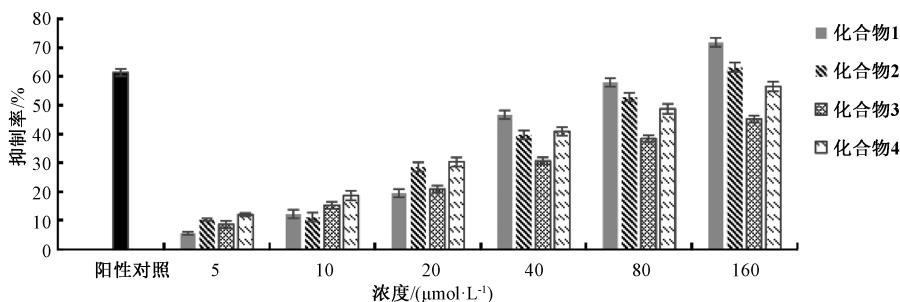


图 1 各化合物对 HepG2 细胞的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of various compounds on HepG2 cells

5 讨论

茶藨子木层孔菌在中国、韩国作为传统药物被用于抗肿瘤^[15], 疗效确切, 以往对其抗肿瘤活性的研究主要集中在水溶性大分子多糖类成分^[16], 关于其小分子成分及抗肿瘤活性筛选的报道较少。本实验在前期研究的基础上, 从茶藨子木层孔菌中分离鉴定出了 4 个苯乙烯基吡喃酮类化合物, 均为首次从该真菌中分离得到。

据文献报道, 化合物 **1、4** 具有清除自由基和抑制 Hela229 细胞增殖的潜力^[17]; 化合物 **2、3** 对小鼠黑色素瘤和人肺癌细胞株的增殖有抑制作用, 两者 GI_{50} 值分别为 5.6~31.3、7.1~22.6 $\mu mol/L$ ^[11]。另外, 化合物 **4** 有强效脂氧合酶抑制活性^[18], 化合物 **3** 还具有抗炎、抗氧化作用^[19], 证明茶藨子木层孔菌具有较好的药物开发前景。

本研究显示, 化合物 **1~4** 均具有明显的抑制

肝癌 HepG2 细胞增殖的活性，并在 5~160 μmol/L 浓度范围内呈现出较好的剂量依赖性。其中，化合物 **1** 较化合物 **2** 对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用强，可能是前者、结构多 1 个醛基；化合物 **4** 对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用较化合物 **2** 弱，其结构多 1 个五元环，可能破坏了呋喃并吡喃酮环的平面性，后期可进一步考察其构效关系。本实验丰富了茶藨子木层孔菌活性成分的研究，并为苯乙烯基吡喃酮类成分抗肿瘤的作用机制研究提供了参考，也为后期该真菌药理活性研究提供了依据。

参考文献：

[1] 张小青,戴玉成.中国真菌志（第二十九卷）[M].北京：科学出版社,2005:169.

[2] 牟玥静,方 磊,李 佳,等.药用真菌针层孔菌属生物活性研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(4):82-85.

[3] 徐凌川,张 华,卢 燕,等.九洲虫草等山东野生药用真菌分布新记录[J].中国野生植物资源,2002,21(6):32-33.

[4] Liu Y, Liu C, Jiang H, *et al.* Isolation, structural characterization and neurotrophic activity of a polysaccharide from *Phellinus ribis* [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 127: 145-151.

[5] Kubo M, Liu Y, Ishida M, *et al.* A new spiroindene pigment from the medicinal fungus *Phellinus ribis*[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2014, 62(1): 122-124.

[6] Dong M Y, Zhang Y, Jiang H Q, *et al.* Benzofuran derivatives with nerve growth factor-potentiating activity from *Phellinus ribis* [J]. *Nat Prod Res*, 2020(6): 1-8.

[7] 刘玉红,马 艳,蔡梅超.茶藨子木层孔菌多糖的体内抗肿瘤作用研究[J].山东中医杂志,2015,34(2):124-125.

[8] Yuan C, Huang X, Cheng L, *et al.* Evaluation of antioxidant and immune activity of *Phellinus ribis* glucan in mice[J]. *Food Chem*, 2009, 115(2): 581-584.

[9] Liu Y, Kubo M, Fukuyama Y. Nerve growth factor-potentiating

benzofuran derivatives from the medicinal fungus *Phellinus ribis* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 75(12): 2152-2157.

[10] Lee I K, Yun B S. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(9): 2376-2379.

[11] Kojima K, Ohno T, Inoue M, *et al.* Phellifuropyranone A: a new furopyranone compound isolated from fruit bodies of wild *Phellinus linteus* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2008, 56(2): 173-175.

[12] Nagatsu A, Itoh S, Tanaka R, *et al.* Identification of novel substituted fused aromatic compounds, meshimakobnol A and B, from natural *Phellinus linteus* fruit body [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45(30): 5931-5933.

[13] Kim J P, Yun B S, Shim Y K, *et al.* Inoscavin A, a new free radical scavenger from the mushroom *Inonotus xeranticus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40(36): 6643-6644.

[14] 刘玉红.茶藨子木层孔菌多糖硫酸酯的制备与体外抗肿瘤活性[J].中国医院药学杂志,2014,34(7):509-512.

[15] Lee I K, Lee J H, Yun B S. Polychlorinated compounds with PPAR-gamma agonistic effect from the medicinal fungus *Phellinus ribis* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(16): 4566-4568.

[16] 刘玉红,张文玉,刘玉国.茶藨子木层孔菌多糖硫酸酯的体内抗肿瘤作用与机制[J].中国医院药学杂志,2015,35(11):985-989.

[17] Zheng W, Zhao Y, Zheng X, *et al.* Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(1): 157-167.

[18] Lee S W, Song J G, Hwang B S, *et al.* Lipxygenase inhibitory activity of Korean Indigenous mushroom extracts and isolation of an active compound from *Phellinus baumii* [J]. *Mycobiology*, 2014, 42(2): 185-188.

[19] Kim J E, Takanche J S, Yun B S, *et al.* Anti-inflammatory character of phelligradin D modulates periodontal regeneration in lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament cells [J]. *J Periodontal Res*, 2018, 53(5): 816-824.