

雷公藤多苷片抗人急性单核细胞白血病的物质基础研究

方冰倩, 王亚楠, 刘琰, 王吓长, 康迪, 胡立宏

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药功效物质重点实验室, 江苏 南京 210023)



胡立宏

1969年生, 男, 浙江淳安人, 研究员, 国家杰出青年科学基金获得者, 国家百千万人才、中国科学院百人计划入选者。长期从事基于中药量丰成分和老药的药物发现研究, 研发的新型FLT3抑制剂XY0206正在进行临床研究。其领衔的“量丰天然产物应用基础研究”团队入选江苏省高等学校优秀科技创新团队、省双创团队。曾获国家科技进步二等奖、上海市科技进步一等奖、江苏省研究生教育改革成果奖二等奖。

摘要: **目的** 发现雷公藤多苷片抗不同亚型血液肿瘤的敏感细胞株, 及其对敏感细胞株增殖抑制作用的物质基础。 **方法** 利用 CCK-8 法检测雷公藤多苷片及其提取物体外对肿瘤细胞增殖的影响; 构建敏感瘤株的体内异种移植瘤动物模型考察雷公藤多苷片对肿瘤细胞的抑制作用; 采用色谱分离技术对雷公藤多苷片提取物进行系统分离, 综合质谱和核磁共振数据鉴定化合物结构, 并考察单体化合物抗人急性单核细胞白血病 (Acute monocytic leukemia, AMOL) 活性; 进一步通过制备液相定向敲除雷公藤多苷片及其提取物中的雷公藤甲素 (Triptolide, TP), 考察敲除 TP 前后雷公藤多苷片及其提取物的抗 AMOL 活性。 **结果** 细胞实验结果表明雷公藤多苷片有较强的抗 AMOL 活性; 体内异种移植瘤实验结果表明雷公藤多苷片可明显抑制 AMOL 细胞皮下异种移植瘤的生长; 进一步对雷公藤多苷片提取物进行系统分离及其细胞水平上的活性评价, 发现二萜类化合物 TP 抗 AMOL 活性最强; 定向敲除 TP 后的雷公藤多苷片及其提取物对 AMOL 细胞 MV-4-11 的 IC₅₀ 值分别升高 8 及 13 倍。 **结论** 雷公藤多苷片对 AMOL 细胞具有显著的抗白血病效应, 其中 TP 是其发挥药效的物质基础。

关键词: 雷公藤多苷片; 化学成分; 人急性单核细胞白血病; 雷公藤甲素; 抗肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2022)09-0748-13

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0748

引文格式: 方冰倩, 王亚楠, 刘琰, 等. 雷公藤多苷片抗人急性单核细胞白血病的物质基础研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(9): 748-760.

Study on the Material Base of Tripterygium Glycosides Tablet against Human Acute Monocytic Leukemia

FANG Bing-qian, WANG Ya-nan, LIU Yan, WANG Xia-chang, KANG Di, HU Li-hong

(School of Pharmacy, Jiangsu Key Laboratory for Functional Substances of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discovery sensitive cell lines of tripterygium glycosides tablet against different subtypes of hematological tumors, and to find out the material base for the effect on proliferative inhibition against sensitive cell lines. **METHODS** The CCK-8 assay was used to assess the effect of tripterygium glycosides tablet and its extract on cell proliferation *in vitro*; Then, the *in vivo* subcutaneous xenograft models by injecting sensitive cells were constructed to test the inhibitory activity of tripterygium glycosides tablet; Furthermore, the extract of tripterygium glycosides was systemically chemical investigated by chromatographic separation techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance, and anti-human acute monocytic leukemia (AMOL) activity was tested

收稿日期: 2022-07-17

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1707900); 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104270); 江苏省研究生实践创新计划项目(KY-CX22_2035)

第一作者: 方冰倩, 女, 硕士研究生, E-mail: 20200634@njucm.edu.cn

通信作者: 康迪, 女, 讲师, 主要从事肿瘤药理学研究, E-mail: kangdi@njucm.edu.cn;

胡立宏, 男, 教授, 主要从事中药药效物质基础的发现以及成药性优化研究, E-mail: lhhu@njucm.edu.cn

for each compound; In the end, preparative HPLC was used for the specific removal of triptolide (TP) from the extract of tripterygium glycosides. The anti-AMOL activity was measured and analyzed after removing TP from the formulations of *T. wilfordii*. **RESULTS** The results of cell experiments indicated that tripterygium glycosides exhibited potent anti-AMOL activity; Next, *in vivo* tumor xenograft models showed tripterygium glycosides significantly inhibited the growth of subcutaneous tumor xenografts of AMOL cells; Furthermore, chemical constituents of tripterygium glycosides extract were isolated systemically, the activity were evaluated at the cellular level. It was found that TP showed the strongest anti-AMOL activity. Finally, it was found that the IC_{50} values of the tripterygium glycosides tablet and its extract against AMOL cells increased 8 and 13 fold, respectively, after removing TP. **CONCLUSION** Tripterygium glycosides tablet shows significant inhibitory activity against acute monocytic leukemia cells, and its diterpenoid, triptolide, is the most active ingredient.

KEYWORDS: tripterygium glycosides tablet; chemical constituents; human acute monocytic leukemia; triptolide; antineoplasms

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 为卫矛科雷公藤属植物,具有祛风除湿,通络止痛的功效^[1]。基于雷公藤根提取物制成的雷公藤多苷片在中医药临床实践中应用广泛,可用于类风湿性关节炎、强直性脊柱炎^[2-3]、慢性肾炎^[4-6]、系统性红斑狼疮^[7-8]等自身免疫性疾病的治疗。近年来其适应症不断扩大,研究发现雷公藤制剂具有广谱的抗肿瘤活性,可以抑制多种不同来源的肿瘤细胞增殖,在抗肿瘤领域显示了独特的疗效^[9-10]。然而,高剂量的雷公藤诱发多组织器官的毒副作用制约了其在临床中的应用与相关制剂的研发^[11-12]。

雷公藤中的化学成分复杂多样,迄今为止,已经报道的该属化合物单体达 400 多种,主要成分有生物碱类、二萜类、三萜类等^[13-14]。目前有 100 多种单体化合物被证实具有生物活性,以二萜类雷公藤甲素(Triptolide, TP)与三萜类雷公藤红素(Celastrol, Cel)为代表^[14-15]。其中, Cel 是最早被分离出来的活性成分,可通过调控细胞增殖、凋亡等多种途径发挥抗炎与抗肿瘤等多种药理作用^[16-18]。TP 是从雷公藤中提取出的最具代表性的一种环氧二萜内酯类化合物。自 1972 年首次分离以来,TP 在近 60 株不同来源的肿瘤细胞系中表现出良好的抗增殖活性^[9,19]。然而,TP 既是药效成分,又是毒性成分,其对转录复合体(Transcription factor IIH, TFIIH)中人着色性干皮病 B(Xeroderma pigmentosum group B, XPB)的 ATP 酶活性的抑制导致其毒副作用不可避免^[20]。本实验室前期研究发现不同来源的肿瘤细胞系对 TP 敏感性不同。其中,单核细胞来源的急性髓系白血病细胞对 TP 较敏感,TP 作用 48 h 的半数抑制浓度(The half maximal inhibitory concentration, IC_{50})可达到 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下;体内动物实验表明 TP 在 $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的腹腔注射剂量下可以有效抑制异种移植瘤的生长^[19]。目前全球科研机构正在积极开展 TP 前药治疗白血病的临床研究^[21-22]。

雷公藤多苷片是目前使用较广泛的雷公藤制剂,主要应用于类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的治疗,临床上尚未能应用于抗肿瘤,同时针对抗白血病的作鲜有报道^[8,23-24]。本研究通过寻找雷公藤多苷片敏感的血肿瘤细胞株,在敏感瘤株的异种移植瘤模型上进行雷公藤多苷片体内活性验证;进一步对自制雷公藤多苷片提取物中的化合物进行系统分离,然后对其进行细胞水平上的活性评价;最后通过制备液相定向敲除雷公藤多苷片以及自制雷公藤多苷片提取物中的 TP,考察其细胞毒活性的变化。旨在发现雷公藤多苷片的敏感瘤株并验证雷公藤多苷片发挥抗人急性单核细胞白血病(Acute monocytic leukemia, AMOL)作用的物质基础,为扩大雷公藤多苷片的临床适应症和提升质量控制标准提供参考。

1 材料

1.1 药物

雷公藤药材,产地云南(批号:20210125),楚雄千草药王谷农业发展有限公司;TP(批号:ST02050120)和 Cel(批号:ST07880120),上海诗丹德标准技术服务有限公司;柔红霉素盐酸盐(Daunorubicin Hydrochloride, DNR,批号:HY-13062),南京迈博生物科技有限公司;雷公藤多苷片(不同厂家雷公藤多苷片均购自于南京市各大药店);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,货号:C104984),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 细胞株

AMOL 细胞 MV-4-11(货号:CRL-9591),人 B 细胞淋巴瘤细胞 SU-DHL-10(货号:CBP60560),购自 ATCC;AMOL 细胞 SHI-1、人急性原粒细胞白血病细胞 Kasumi-1、人慢性髓原白血病细胞 K562,江苏省中医院赠;人肾皮质近曲小管上皮细胞系 HK2、人正常肝细胞系 L02,中国药科大学赠。

1.3 实验动物

BALB/c 裸鼠,雌雄各半,4~6 周龄,18~22 g,

购于南京集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008。将其饲养于南京中医药大学实验动物中心无病原体的屏障环境中,12 h/12 h 光暗照明,自由饮食饮水,环境温度在 20~26 ℃,湿度在 40%~70%,适应性饲养 1 周后用于实验。实验方案由南京中医药大学动物伦理委员会执行并批准,实验动物伦理批准编号:202111A008。

1.4 试剂与仪器

细胞活力检测试剂盒(CCK-8,货号:A311-02),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;胎牛血清(FBS,货号:10091148)、RPMI1640 培养基(货号:C11875500BT)、青霉素/链霉素(P/S,货号:15140112),购自 Gibco;IMDM 培养基(货号:lw-SH30228.01),购自南京凯基生物科技发展有限公司;巯基还原剂(β -巯基乙醇,货号:M8210),购自北京索莱宝科技有限公司。

电子分析天平(Mettler Toledo,型号:MS105);酶标仪(Tecan,型号:Infinite 200 pro);纯水仪(Merck millipore,型号:Milli-Q Direct8);旋转蒸发仪(Buchi,型号:Buchi R-100);冷却水循环装置(EYELA,型号:CA-1116A);核磁共振波谱仪(Bruker,型号:BrukerAV500);液相色谱仪(Waters,型号:e2695-2998);制备液相色谱仪(Waters,型号:1525);液质联用色谱仪(Agilent,型号:Agilent1290-6120)。

2 方法

2.1 雷公藤的提取分离和结构鉴定

2.1.1 药材提取 为保证实验用样品的一致性,本研究按照制备雷公藤多苷片提取物的制备工艺进行实验用样品制备,简称雷公藤多苷片提取物^[25]:取云南产雷公藤药材 10 kg,粉碎后加 95%乙醇超声提取 3 次(40 ℃、40 min,物料比为 1:7、1:6、1:6),过滤,收集滤液,将滤液浓缩至无醇味,将浓缩液倒入 5 L 分液漏斗中,每次加入 1 L 乙酸乙酯进行萃取,直至乙酸乙酯萃取液接近无色,浓缩并干燥得到浸膏 208 g。

2.1.2 化合物分离和结构鉴定 将浸膏(208 g)进行硅胶柱层析,石油醚:乙酸乙酯(10:1~0:1)梯度洗脱,得到 8 个流分 X1~X8。对活性较好的组分 X4、X6、X7 和 X8 进行系统分离,综合运用质谱和核磁共振波谱数据,并结合文献鉴定了 15 个化合物的结构,分别为雷酚内酯(Triptophenolide,1)、异雷酚新

内酯(Isoneotriptophenolide,2)、雷酚萜醇(Triptonoterpenol,3)、Triptobenzene J(4)、TP(5)、雷公藤晋碱(Wilforphine,6)、雷公藤定碱(Wilfordine,7)、雷公藤次碱(Wilforine,8)、雷公藤春碱(Wilfortrine,9)、雷公藤新碱(Euonine,10)、Peritassine A(11)、Cel(12)、雷公藤酚 A(Wilforol A,13)、雷公藤三萜酸 A(Triptotriterpenic acid A,14)和 23-Nor-6-oxodemethylpristimerol(15),具体分离过程如下。

流分 X4(13.3 g)经 MCI 柱色谱分离,甲醇/水梯度洗脱,得到 3 个亚组分 X4-1~3,亚组分 X4-1(1.2 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和制备液相(45%乙腈/水)得到化合物 1(24 mg)、化合物 2(10 mg)、化合物 3(2 mg)。

流分 X6(4.3 g)经 MCI 柱色谱分离,甲醇/水梯度洗脱,得到 7 个亚组分 X6-1~7,亚组分 X6-2(215 mg)经制备液相(20%乙腈/水)得到化合物 5(5 mg),亚组分 X6-4(726 mg)经硅胶柱色谱分离,石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱,得到化合物 4(5 mg)。

流分 X7(49.0 g)采用硅胶柱分离,经石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱得到 4 个亚组分 X7-1~4。亚组分 X7-1(28.6 g)经 MCI 柱色谱分离,甲醇/水梯度洗脱,得到 4 个亚组分 X7-1-1~4,亚组分 X7-1-3(5.1 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)洗脱,得到亚组分 X7-1-3-1~7,亚组分 X7-1-3-1(479 mg)经制备液相(50%乙腈/水等度洗脱)得到化合物 14(8 mg),亚组分 X7-1-3-2(51 mg)经制备液相(60%乙腈/水)得到化合物 15(8 mg)和化合物 13(2 mg)。亚组分 X7-1-4(217 mg)经硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)洗脱,得到化合物 12(4 mg)。亚组分 X7-2(9.8 g)经 MCI 柱色谱分离,甲醇/水梯度洗脱,得到 2 个亚组分 X7-2-1~2,亚组分 X7-2-2(2.1 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)和中性氧化铝柱色谱(石油醚/乙酸乙酯梯度)洗脱得到亚组分 X7-2-2-1-1(818 mg),再经制备液相(43%乙腈/水)得到化合物 8(3 mg)。

流分 X8(21.0 g)经 MCI 柱色谱分离,甲醇/水梯度洗脱,经高效液相合并得到 3 个组分 X8-1~3,组分 X8-1(7.9 g)经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)洗脱,得到亚组分 X8-1-1~3,亚组分 X8-1-1(1.3 g)经制备液相(38%乙腈/水)得到化合物 9(22 mg)、化合物 10(12 mg);亚组分 X8-1-2(3.8 g)经 MCI 柱色谱和制备液相得到化合物 11

(25 mg)。亚组分 X8-2(3.1 g)经中性氧化铝柱色谱,石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱,得到亚组分 X8-2-1~3,亚组分 X8-2-1(216 mg)经制备液相(43%乙腈/水)得到化合物 6(14 mg);亚组分 X8-2-2(140 mg)经制备液相(40%乙腈/水)得到化合物 7(4 mg)。

2.2 CCK8 法检测肿瘤细胞增殖抑制活性

2.2.1 样品溶液的制备 雷公藤多苷片测试溶液的制备:每个厂家取雷公藤多苷片 20 片,研成粉末,称定质量,称取 1.0 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 乙酸乙酯,40 ℃ 超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)30 min,过滤,滤液蒸干,称定质量,加二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)后振荡 10 s 溶解,配成雷公藤多苷片测试溶液。

单体化合物溶液的制备:称取一定量的化合物,加 DMSO 后振荡 10 s 溶解,配成 25 mg·mL⁻¹ 母液。将母液稀释 1 000 倍使其为 25 μg·mL⁻¹,再依次 5 倍稀释使其分别为 5 μg·mL⁻¹ 和 1 μg·mL⁻¹,振荡 10 s 使其溶解,置于-20 ℃ 冰箱低温保存。

2.2.2 细胞培养 MV-4-11 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中,并添加有 1% P/S 及 0.05 mmol·L⁻¹ β-巯基乙醇;SU-DHL-10、K562、Kasumi-1 及 SHI-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 1640 培养基中;HK2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基中;L02 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基中。

2.2.3 细胞增殖抑制活性测试 取对数期生长的肿瘤细胞计数,根据计数结果从培养皿中取出所需体积的细胞转移到 15 mL 离心管里,1 200 r·min⁻¹ 离心 3 min,用真空泵吸走上清,并以培养基重悬。将不同浓度的药物和细胞按照 1:1 体积比混匀后加入 100 μL 于 96 孔板中。96 孔板置于 37 ℃,5% CO₂ 培养 48 h,并提前 2 h 在每孔加入 10 μL CCK8,利用酶标仪测定其在 450 nm 波长下的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率(%)。细胞增殖抑制率 = 100%-(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})×100%。

2.3 雷公藤多苷片对异种移植瘤裸鼠的抗肿瘤活性

2.3.1 异种移植瘤裸鼠的模型构建 将 BALB/c 裸鼠在实验室适应性喂养 7 d。取对数生长期 MV-4-11 细胞重悬于 IMDM 和 Matrigel(1:1)混合液中,计数后调整细胞浓度为 5.0×10⁷ mL⁻¹,以每只

100 μL 注射于小鼠右侧腋窝皮下,待肿瘤长至 100~300 mm³ 用于试验。

2.3.2 实验动物分组与给药 采用随机区组法把荷瘤小鼠分成 4 组,每组 5 只,分别为:①溶剂对照(0.5%CMC-Na)组;②雷公藤多苷片 10 mg·kg⁻¹ 组;③雷公藤多苷片 20 mg·kg⁻¹ 组;④雷公藤多苷片 30 mg·kg⁻¹ 组。配药方法:将雷公藤多苷片研磨粉碎后,加入 0.5%CMC-Na 混悬,并稀释到所需浓度。试验期间,每天灌胃给药,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,连续给药 15 d,每天记录小鼠肿瘤体积和体质量。

2.4 TP 定向敲除实验

2.4.1 对照样品溶液的制备 精密称取 TP 或 Cel 对照品适量,加甲醇制成 50 μg·L⁻¹ 的溶液,滤过,即得。

2.4.2 色谱条件 Poroshell 120 C₁₈ 色谱柱(3 mm×150 mm,2.7 μm);以水为流动相 A,乙腈为流动相 B,柱温为 30 ℃;流速为 0.2 mL·min⁻¹;检测波长为 218 nm;进样量:20 μL。梯度条件见表 1。TP 的保留时间为 8.5 min。

表 1 TP 定向敲除色谱条件

Table 1 TP directional knock-out chromatographic conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	65	35
40	30	70
41	0	100
45	0	100
46	65	35
50	65	35

2.4.3 TP 的定向敲除 取雷公藤多苷片提取物溶液和雷公藤多苷片溶液,进样液相色谱,接收 TP 的出峰位置溶液,其余流分合并,蒸干,即得 TP 敲除样品。

2.5 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤多苷片提取物对不同来源肿瘤细胞的增殖抑制作用

体外 CCK-8 实验结果表明,雷公藤多苷片提取物可以显著抑制血液肿瘤细胞的增殖。其中,雷公

藤多苷片提取物在单核细胞来源的肿瘤细胞系 SHI-1 及 MV-4-11 中作用 48 h 的 IC_{50} 小于 $3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,抑制活性强于其在非单核细胞白血病细胞株中的作用(表 2)。

表 2 雷公藤多苷片提取物作用于不同肿瘤细胞系 48 h 的 IC_{50} 值($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 IC_{50} values of tripterygium glycosides extract against different tumor cell lines for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系名称	细胞系类型	雷公藤提取物/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
SHI-1	AMOL 细胞	1.69±0.01
MV-4-11	AMOL 细胞	2.10±0.02
Kasumi-1	人急性原粒细胞白血病细胞	4.17±0.07
SU-DHL-10	人 B 细胞淋巴瘤细胞	5.18±0.03
K562	人慢性髓原白血病细胞	5.57±0.03

3.2 雷公藤多苷片体外和体内抗急性单核细胞白血病的活性

进一步考察不同厂家的雷公藤多苷片对肿瘤细胞 MV-4-11 的增殖影响。体外实验结果表明,雷公藤多苷片与雷公藤多苷片提取物的活性相当,可显著抑制血液肿瘤细胞的增殖;其中,厂家 1(浙江得恩德制药股份有限公司)与厂家 2(江苏美通制药有限公司)雷公藤多苷片活性较强,作用 48 h 的 IC_{50} 分别为 $(3.33\pm 0.01)\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和

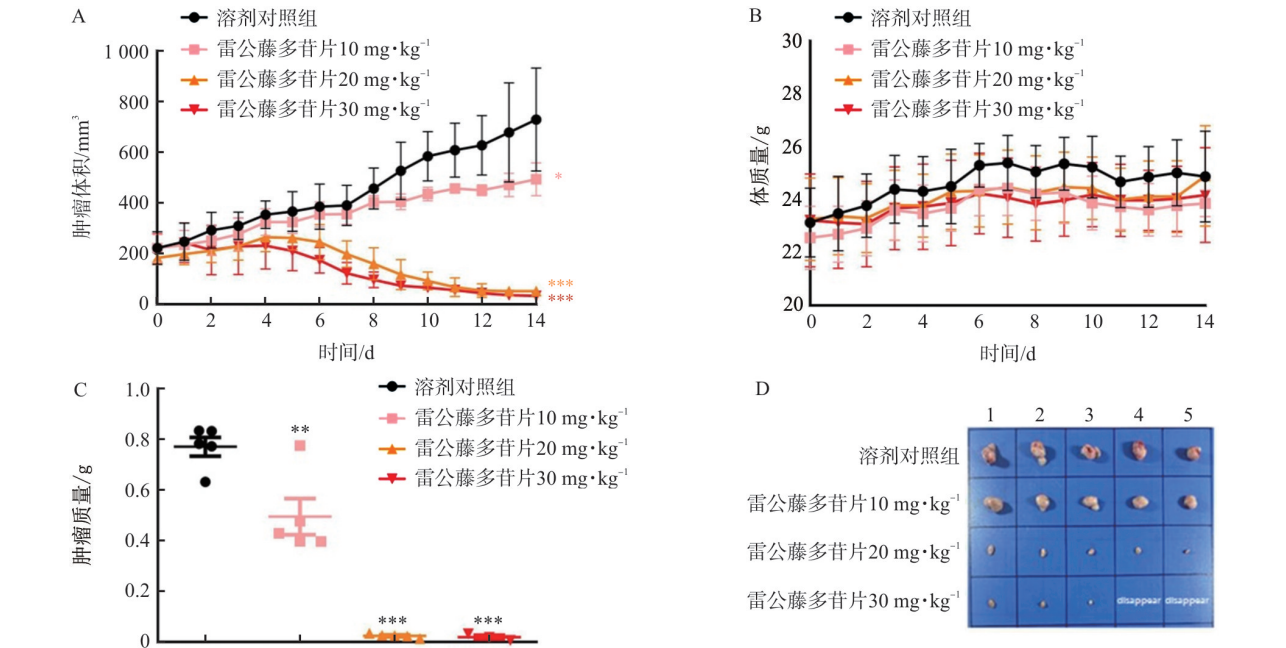
$(3.57\pm 0.10)\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (表 3)。

表 3 不同厂家雷公藤多苷片作用 MV-4-11 细胞 48 h 的 IC_{50} 值($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 IC_{50} values of tripterygium glycosides tablet from different manufacturers against MV-4-11 cells for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

雷公藤多苷片	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
厂家 1	3.33±0.01
厂家 2	3.57±0.10
厂家 3	5.64±0.02
厂家 4	5.70±0.03
厂家 5	5.55±0.37

选取厂家 1 的雷公藤多苷片考察其对体内皮下异种移植瘤的抑制作用。与对照组相比,雷公藤多苷片各剂量组均可使皮下移植瘤的体积显著减小($P<0.05, P<0.001$),小鼠体质量无明显变化。终末给药结束后,对肿瘤进行称质量,雷公藤多苷片各剂量组可使瘤质量显著下降($P<0.01, P<0.001$),抑瘤率分别为 35.79%、96.93%、97.56%(图 3)。其中,雷公藤多苷片中、高剂量组对肿瘤抑制作用的剂量依赖性不高,原因可能与雷公藤多苷片的溶解性较差有关。体内与体外实验结果表明,雷公藤多苷片具有显著的抗 AMOL 作用(图 1)。



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 雷公藤多苷片(浙江得恩德制药股份有限公司)抑制 MV-4-11 细胞皮下异种移植瘤的生长

Fig. 1 Tripterygium glycosides tablet (Deende) inhibits the growth of subcutaneous xenografts of MV-4-11 cells

3.3 雷公藤多苷片提取物中单体化合物的活性跟踪

3.3.1 雷公藤多苷片提取物不同流分的活性筛选

考虑各厂家雷公藤多苷片的制备方法不同,活性成分的含量存在差异,质量标准不统一,本研究将自制的雷公藤多苷片提取物进行系统成分分离,并在细胞水平上对得到的单体化合物进行活性评价。首先我们通过 CCK8 实验对雷公藤多苷片提取物的 8 个流分进行活性筛选,其中 X1 与 X2 两个流分因极性较小,溶解性差,无法得到有效的活性筛选数据。X3~X8 的活性筛选结果表明流分 X6 及 X7 的活性较强,在 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度下抑制率可达到 90.23% 及 89.37%(表 4)。

表 4 雷公藤多苷片提取物的不同流分对 MV-4-11 细胞的增殖抑制率($\bar{x}\pm s$, %, $n=3$)

Table 4 The proliferation inhibition of fraction of tripterygium glycosides extract against MV-4-11 cells for 48 h ($\bar{x}\pm s$, %, $n=3$)

流分	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
X3	99.92 $\pm$ 0.10	92.70 $\pm$ 0.08	1.52 $\pm$ 3.00
X4	94.19 $\pm$ 0.13	94.59 $\pm$ 0.57	11.74 $\pm$ 1.61
X5	96.05 $\pm$ 1.06	91.80 $\pm$ 0.42	1.45 $\pm$ 1.35
X6	93.62 $\pm$ 0.54	92.39 $\pm$ 1.05	90.23 $\pm$ 1.43
X7	95.18 $\pm$ 0.09	92.49 $\pm$ 0.62	89.37 $\pm$ 1.38
X8	91.43 $\pm$ 1.05	90.29 $\pm$ 0.73	29.71 $\pm$ 0.96

3.3.2 化合物结构鉴定 采用色谱分离技术,从活性较强的流分 X4、X6、X7 与 X8 中分离鉴定了 15 个化合物,包括 5 个二萜类(1~5)、6 个倍半萜大环内酯生物碱类(6~11)和 4 个三萜类(12~15),具体如下:

化合物 1:白色固体, $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$, (+)-ESI-MS m/z :313.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (-)-ESI-MS m/z :311.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 1.72 (1H, m, H-1a), 2.52 (1H, m, H-1b), 2.41 (1H, m, H-2a), 2.56 (1H, m, H-2b), 2.73 (1H, m, H-5), 1.96 (1H, m, H-6a), 2.03 (1H, m, H-6b), 2.84 (1H, m, H-7a), 2.94 (1H, m, H-7b), 6.98 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-11), 7.10 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-12), 3.13 (1H, m, H-15), 1.28, 1.29 (各 3H, d, $J=7.0$ Hz, H-16, 17); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 32.6 (C-1), 18.2 (C-2), 162.9 (C-3), 125.2 (C-4), 40.9 (C-5), 19.6 (C-6), 22.7 (C-7), 120.5 (C-8), 143.9 (C-9), 36.2 (C-10), 116.3 (C-11), 123.4 (C-12),

131.0 (C-13), 150.8 (C-14), 27.0 (C-15), 22.5 (C-16), 22.5 (C-17), 174.2 (C-18), 70.5 (C-19), 22.4 (C-20)。以上数据与文献^[26]一致,故确定化合物为雷酚内酯(Triptophnolide)。

化合物 2:黄色固体, $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$, (+)-ESI-MS m/z :343.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (-)-ESI-MS m/z :341.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 6.45 (1H, s, H-11), 3.70 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-14$), 3.27 (1H, m, H-15), 1.21 (6H, d, $J=7.0$ Hz, H-16, H-17), 4.78 (2H, m, H-19), 1.18 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 18.6 (C-1), 31.1 (C-2), 125.2 (C-3), 163.3 (C-4), 44.0 (C-5), 19.5 (C-6), 26.1 (C-7), 129.9 (C-8), 130.8 (C-9), 37.3 (C-10), 111.9 (C-11), 150.8 (C-12), 139.9 (C-13), 149.2 (C-14), 25.5 (C-15), 23.8 (C-15), 23.8 (C-16), 60.7 (C-17), 174.5 (C-18), 70.6 (C-19), 17.3 (C-20), 60.7 (C-21)。以上数据与文献^[27]一致,故确定化合物为异雷酚新内酯(Isoneotriptophenolide)。

化合物 3:无定型粉末, $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$, (+)-ESI-MS m/z :347.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (-)-ESI-MS m/z :345.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 2.07 (1H, m, H-1a), 3.08 (1H, m, H-1b), 2.39 (1H, m, H-2a), 2.76 (1H, dd, $J=10.6, 4.1$ Hz, H-2b), 2.21 (1H, brd, H-5), 1.46 (1H, dd, $J=12.8, 4.8$ Hz, H-6a), 1.85 (1H, m, H-6b), 2.55 (1H, m, H-7a), 3.10 (1H, m, H-7b), 6.38 (1H, s, H-12), 3.67 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-14$), 3.24 (1H, m, H-15), 1.17 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-16, H-17), 1.42 (3H, s, H-18), 4.18 (1H, d, $J=11.4$ Hz, H-19), 1.30 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 35.4 (C-1), 34.7 (C-2), 223.8 (C-3), 50.1 (C-4), 52.7 (C-5), 19.2 (C-6), 26.6 (C-7), 130.5 (C-8), 130.7 (C-9), 37.7 (C-10), 150.4 (C-11), 112.1 (C-12), 139.7 (C-13), 148.8 (C-14), 26.2 (C-15), 23.7 (C-16), 23.8 (C-17), 22.9 (C-18), 66.1 (C-19), 21.1 (C-20)。以上数据与文献^[28]一致,故确定化合物为雷酚萜醇(Triptoterpenol)。

化合物 4:白色固体, $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, (+)-ESI-MS m/z :319.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (-)-ESI-MS m/z :317.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 1.55 (1H, m, H-1a), 2.35 (1H, m, H-1b), 1.91 (1H, m, H-2a), 2.02 (1H, m, H-2b), 3.52 (1H, dd, $J=11.8, 4.3$ Hz, H-3), 1.43 (1H, dd, $J=12.7, 1.9$ Hz, H-5), 2.08 (1H,

m, H-6a), 2. 62 (1H, m, H-7a), 2. 87 (1H, m, H-7b), 6. 84 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-11), 7. 03 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-12), 3. 14 (1H, sqt, H-15), 1. 25 (6H, d, $J=7.0$ Hz, H-16, H-17), 1. 34 (3H, s, H-18), 3. 45 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-19a), 4. 34 (1H, d, $J=11.2$ Hz, H-19b), 1. 18 (3H, s, H-20); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 36. 9 (C-1), 28. 5 (C-2), 80. 6 (C-3), 42. 8 (C-4), 50. 0 (C-5), 18. 3 (C-6), 25. 0 (C-7), 120. 4 (C-8), 147. 7 (C-9), 37. 1 (C-10), 116. 6 (C-11), 123. 5 (C-12), 130. 3 (C-13), 150. 2 (C-14), 26. 9 (C-15), 22. 5 (C-16), 22. 5 (C-17), 22. 7 (C-18), 64. 1 (C-19), 25. 8 (C-20)。以上数据与文献^[29]一致, 故确定化合物为 Triptobenzene J。

化合物 5: 白色固体, $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$, (+)-ESI-MS m/z : 361. 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; (-)-ESI-MS m/z : 359. 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 1. 24 (1H, m, H-1a), 1. 59 (1H, m, H-1b), 1. 99 (1H, t, $J=12.8$ Hz, H-2a), 2. 22 (1H, m, H-2b), 2. 75 (1H, brd, $J=13.2$ Hz, H-5), 2. 35 (1H, m, H-6a), 2. 14 (1H, m, H-6b), 3. 40 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-7), 3. 93 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-11), 3. 54 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-12), 3. 44 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-14), 0. 91 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-16), 1. 03 (1H, d, $J=6.8$ Hz, H-17), 4. 70 (2H, m, H-19), 1. 14 (1H, s, H-20); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 17. 0 (C-1), 29. 7 (C-2), 125. 4 (C-3), 160. 0 (C-4), 40. 4 (C-5), 23. 6 (C-6), 55. 7 (C-7), 54. 5 (C-8), 60. 7 (C-9), 35. 8 (C-10), 60. 1 (C-11), 65. 7 (C-12), 66. 2 (C-13), 73. 4 (C-14), 25. 2 (C-15), 17. 7 (C-16), 16. 8 (C-17), 173. 8 (C-18), 70. 0 (C-19), 13. 6 (C-20)。以上数据与文献^[19]一致, 故确定化合物为 TP。

化合物 6: 无色片晶, $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{NO}_{19}$, (+)-ESI-MS m/z : 858. 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 5. 73 (1H, d, $J=3.7$ Hz, H-1), 5. 39 (1H, dd, $J=3.7, 2.6$ Hz, H-2), 5. 05 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H-3), 6. 98 (1H, brs, H-5), 2. 37 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-6), 5. 56 (1H, m, H-7), 5. 43 (1H, d, $J=6.7$ Hz, H-8), 4. 31 (1H, d, $J=13.4$ Hz, H-11a), 5. 53 (1H, d, $J=13.4$ Hz, H-11b), 1. 58 (1H, s, H-12), 1. 70 (1H, s, H-14), 3. 79 (1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15a), 5. 79 (1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15b), 2. 95 (1H, m, H-16a), 4. 00 (1H, m, H-16b), 2. 24 (1H, m, H-17a), 2. 37 (1H, m, H-17b), 1. 22 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-19),

8. 78 (1H, dd, $J=4.6, 1.8$ Hz, H-2'), 7. 31 (1H, dd, $J=7.9, 4.6$ Hz, H-3'), 8. 36 (1H, dd, $J=7.9, 1.8$ Hz, H-4'), 7. 51 (1H, t, $J=1.8$ Hz, H-2''), 6. 86 (1H, dd, $J=0.7, 1.8$ Hz, H-3''), 8. 29 (1H, dd, $J=0.7, 1.4$ Hz, H-5''), 1. 87 (3H, s, 1-OAc), 2. 31 (3H, s, 5-OAc), 2. 20 (6H, s, 7-OAc, 11-OAc), 2. 00 (3H, s, 8-OAc); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 73. 4 (C-1), 68. 9 (C-2), 75. 8 (C-3), 69. 7 (C-4), 73. 6 (C-5), 51. 2 (C-6), 69. 2 (C-7), 70. 8 (C-8), 52. 1 (C-9), 93. 8 (C-10), 60. 5 (C-11), 22. 8 (C-12), 84. 5 (C-13), 18. 0 (C-14), 70. 3 (C-15), 33. 3 (C-16), 33. 5 (C-17), 38. 4 (C-18), 21. 1 (C-19), 175. 1 (C-20), 166. 8 (C-21), 164. 3 (C-2'), 124. 3 (C-3'), 138. 7 (C-4'), 121. 2 (C-5'), 153. 3 (C-6'), 144. 3 (C-2''), 109. 7 (C-3''), 118. 3 (C-4''), 148. 7 (C-5''), 20. 5, 169. 1 (1-OAc), 21. 1, 169. 9 (5-OAc), 20. 5, 170. 1 (7-OAc), 18. 9, 169. 3 (8-OAc), 21. 6, 170. 7 (11-OAc)。以上数据与文献^[30]一致, 故确定化合物为雷公藤晋碱 (Wilforgine)。

化合物 7: 无色片晶, $\text{C}_{43}\text{H}_{49}\text{NO}_{19}$, (+)-ESI-MS m/z : 884. 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 5. 77 (1H, d, $J=3.2$ Hz, H-1), 5. 48 (1H, t, $J=3.0$ Hz, H-2), 5. 10 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H-3), 6. 87 (1H, brs, H-5), 2. 41 (1H, d, $J=3.8$ Hz, H-6), 5. 56 (1H, dd, $J=4.0, 5.9$ Hz, H-7), 5. 41 (1H, d, $J=5.7$ Hz, H-8), 4. 42 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-11a), 5. 60 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-11b), 1. 74 (1H, s, H-12), 1. 67 (1H, s, H-14), 3. 77 (1H, d, $J=12.1$ Hz, H-15a), 5. 84 (1H, d, $J=12.1$ Hz, H-15b), 2. 88 (1H, m, H-16a), 4. 09 (1H, m, H-16b), 2. 49 (1H, m, H-17), 1. 52 (1H, s, H-19), 8. 72 (1H, dd, $J=4.8, 1.7$ Hz, H-2'), 7. 24 (1H, dd, $J=7.9, 4.9$ Hz, H-3'), 8. 16 (1H, dd, $J=7.9, 1.7$ Hz, H-4'), 8. 09 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-2''), 7. 54 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-3''), 7. 66 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-4''), 7. 54 (1H, t, $J=7.3$ Hz, H-5''), 8. 09 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-6''), 1. 90 (3H, s, 1-OAc), 2. 22 (6H, s, 5-OAc, 11-OAc), 2. 12 (3H, s, 7-OAc), 1. 97 (3H, s, 8-OAc); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 73. 2 (C-1), 69. 3 (C-2), 76. 9 (C-3), 69. 8 (C-4), 73. 6 (C-5), 51. 0 (C-6), 68. 9 (C-7), 70. 8 (C-8), 51. 9 (C-9), 94. 0 (C-10), 60. 6 (C-11), 23. 0 (C-12), 84. 8 (C-13), 17. 9 (C-14), 69. 8 (C-15), 31. 4 (C-16), 38. 4 (C-17),

77.7(C-18), 28.0(C-19), 172.5(C-20), 168.0(C-21), 164.9(C-22), 152.2(C-2'), 120.6(C-3'), 137.8(C-4'), 125.5(C-5'), 164.8(C-6'), 128.7(C-1''), 129.9(C-2''), 128.8(C-3''), 133.9(C-4''), 128.8(C-5''), 129.9(C-6''), 20.5, 169.8(1-OAc), 21.6, 169.8(5-OAc), 21.0, 170.1(7-OAc), 20.45, 169.0(8-OAc), 21.0, 170.1(11-OAc)。以上数据与文献^[30]一致,故确定化合物为雷公藤定碱(Wilfordine)。

化合物8:无色片晶, $C_{43}H_{49}NO_{18}$, (+)-ESI-MS m/z : 868.2 $[M+H]^+$ 。¹H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): 5.78(1H, d, $J=3.8$ Hz, H-1), 5.37(1H, dd, $J=2.6, 3.7$ Hz, H-2), 5.10(1H, d, $J=2.6$ Hz, H-3), 6.93(1H, brs, H-5), 2.39(1H, d, $J=4.0$ Hz, H-6), 5.57(1H, m, H-7), 5.40(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-8), 4.41(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-11a), 5.50(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-11b), 1.70(3H, s, H-12), 1.68(1H, s, H-14), 3.81(1H, d, $J=12.0$ Hz, H-15a), 5.80(1H, d, $J=12$ Hz, H-15b), 2.97(1H, m, H-16a), 3.98(1H, m, H-16b), 2.24(1H, m, H-17a), 2.41(1H, m, H-17b), 1.24(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-19), 8.78(1H, dd, $J=1.8, 4.7$ Hz, H-2'), 7.31(1H, dd, $J=4.7, 7.9$ Hz, H-3'), 8.36(1H, dd, $J=1.8, 7.9$ Hz, H-4'), 8.10(1H, d, $J=7.1$ Hz, H-2''), 7.53(1H, t, $J=7.9$ Hz, H-3''), 7.64(1H, t, $J=7.4$ Hz, H-4''), 7.53(1H, t, $J=7.9$ Hz, H-5''), 8.10(1H, d, $J=7.1$ Hz, H-6''), 1.85(3H, s, 1-OAc), 2.20(9H, s, 5-OAc, 7-OAc, 11-OAc), 1.97(3H, s, 8-OAc); ¹³C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): 73.5(C-1), 69.1(C-2), 76.0(C-3), 69.7(C-4), 73.8(C-5), 51.2(C-6), 69.9(C-7), 71.0(C-8), 52.2(C-9), 93.8(C-10), 60.6(C-11), 22.9(C-12), 84.5(C-13), 20.5(C-14), 70.3(C-15), 33.3(C-16), 33.5(C-17), 38.5(C-18), 23.2(C-19), 175.1(C-20), 165.0(C-21), 161.1(C-22), 153.2(C-2'), 121.1(C-3'), 138.7(C-4'), 124.5(C-5'), 164.1(C-6'), 128.9(C-1''), 129.9(C-2''), 128.8(C-3''), 133.8(C-4''), 128.8(C-5''), 129.9(C-6''), 21.0, 169.0(1-OAc), 21.6, 169.9(5-OAc), 21.1, 170.1(7-OAc), 20.5, 169.3(8-OAc), 21.6, 170.3(11-OAc)。以上数据与文献^[30]一致,故确定化合物为雷公藤次碱(Wilforine)。

化合物9:无色片晶, $C_{41}H_{47}NO_{20}$, (+)-ESI-MS

m/z : 874.2 $[M+H]^+$ 。¹H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): 5.70(1H, d, $J=3.6$ Hz, H-1), 5.35(1H, dd, $J=3.0, 3.5$ Hz, H-2), 5.05(1H, d, $J=2.7$ Hz, H-3), 6.96(1H, s, H-5), 2.39(1H, d, $J=3.9$ Hz, H-6), 5.42(1H, d, $J=6.0$ Hz, H-8), 4.32(1H, d, $J=13.5$ Hz, H-11a), 5.56(1H, d, $J=13.5$ Hz, H-11b), 1.64(1H, s, H-12), 1.66(3H, s, H-14), 3.73(1H, d, $J=12.0$ Hz, H-15a), 5.87(1H, d, $J=12.0$ Hz, H-15b), 2.88(1H, m, H-16a), 4.10(1H, m, H-16b), 2.18(1H, m, H-17a), 2.52(1H, m, H-17b), 1.49(3H, s, H-19), 8.72(1H, dd, $J=1.8, 4.8$ Hz, H-2'), 7.25(1H, dd, $J=4.8, 7.9$ Hz, H-3'), 8.17(1H, dd, $J=1.8, 7.9$ Hz, H-4'), 7.52(1H, t, $J=1.8$ Hz, H-2''), 6.85(1H, dd, $J=0.7, 1.8$ Hz, H-3''), 8.28(1H, dd, $J=0.7, 1.4$ Hz, H-5''), 1.88(3H, s, 1-OAc), 2.28(3H, s, 5-OAc), 2.20(3H, s, 7-OAc), 2.00(3H, s, 8-OAc), 2.21(3H, s, 11-OAc); ¹³C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): 73.1(C-1), 68.8(C-2), 76.8(C-3), 69.8(C-4), 73.6(C-5), 51.2(C-6), 68.9(C-7), 70.7(C-8), 52.1(C-9), 94.1(C-10), 60.5(C-11), 22.7(C-12), 84.8(C-13), 17.9(C-14), 69.8(C-15), 31.4(C-16), 38.4(C-17), 77.8(C-18), 28.2(C-19), 172.5(C-20), 168.0(C-21), 161.1(C-22), 152.3(C-2'), 120.6(C-3'), 137.8(C-4'), 125.6(C-5'), 165.0(C-6'), 144.4(C-2''), 109.7(C-3''), 118.2(C-4''), 148.8(C-5''), 20.5, 169.8(1-OAc), 21.2, 169.6(5-OAc), 20.5, 170.0(7-OAc), 18.8, 169.3(8-OAc), 21.0, 170.6(11-OAc)。以上数据与文献^[30]一致,故确定化合物为雷公藤春碱(Wilfortrine)。

化合物10:无色片晶, $C_{38}H_{47}NO_{18}$, (+)-ESI-MS m/z : 806.2 $[M+H]^+$ 。¹H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): 5.63(1H, d, $J=4.0$ Hz, H-1), 5.24(1H, dd, $J=3.5, 4.0$ Hz, H-2), 4.96(1H, d, $J=3.5$ Hz, H-3), 6.94(1H, s, H-5), 2.34(1H, d, $J=3.8$ Hz, H-6), 5.38(1H, d, $J=5.8$ Hz, H-8), 4.47(1H, d, $J=13.4$ Hz, H-11a), 5.24(1H, d, $J=13.4$ Hz, H-11b), 1.57(1H, s, H-12), 1.67(3H, s, H-14), 3.78(1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15a), 5.77(1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15b), 3.97(2H, m, H-16), 2.36(1H, m, H-17a), 2.95(1H, m, H-17b), 2.50(1H, m, H-18), 1.19(1H, d, $J=6.9$ Hz, H-19), 8.77(1H, dd,

$J=1.7, 4.8$ Hz, H-2'), 7.25 (1H, dd, $J=4.8, 7.9$ Hz, H-3'), 8.17 (1H, dd, $J=1.7, 7.9$ Hz, H-4'), 1.67 (3H, s, 1-OAc), 1.88 (3H, s, 2-OAc), 2.01 (3H, s, 5-OAc), 2.16 (3H, s, 7-OAc), 2.20 (3H, s, 8-OAc), 2.31 (3H, s, 11-OAc); ^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 73.4 (C-1), 68.8 (C-2), 75.4 (C-3), 71.6 (C-4), 73.2 (C-5), 51.0 (C-6), 69.6 (C-7), 70.2 (C-8), 52.9 (C-9), 98.7 (C-10), 60.5 (C-11), 23.1 (C-12), 84.4 (C-13), 21.6 (C-14), 70.3 (C-15), 33.5 (C-16), 33.5 (C-17), 38.1 (C-18), 20.2 (C-19), 175.5 (C-20), 166.2 (C-21), 153.1 (C-2'), 121.7 (C-3'), 138.6 (C-4'), 124.5 (C-5'), 164.8 (C-6'), 20.3, 166.9 (1-OAc), 21.2, 169.2 (2-OAc), 21.2, 169.9 (5-OAc), 21.5, 170.3 (7-OAc), 21.5, 170.3 (8-OAc), 21.9, 170.2 (11-OAc)。以上数据与文献^[31]一致,故确定化合物为雷公藤新碱(Euonine)。

化合物 11: 无色片晶, C₃₈H₄₇NO₁₈, (+)-ESI-MS m/z : 806.2 [M+H]⁺。 ^1H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 5.56 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-1), 5.24 (1H, dd, $J=2.8, 4.0$ Hz, H-2), 4.74 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-3), 7.06 (1H, s, H-5), 2.37 (1H, d, $J=3.8$ Hz, H-6), 5.53 (1H, dd, $J=3.8, 5.8$ Hz, H-7), 5.38 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-8), 4.50 (1H, d, $J=13.5$ Hz, H-11a), 5.14 (1H, d, $J=13.5$ Hz, H-11b), 1.73 (1H, s, H-12), 1.56 (3H, s, H-14), 3.71 (1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15a), 6.06 (1H, d, $J=11.7$ Hz, H-15b), 4.71 (2H, m, H-16), 2.47 (1H, m, H-17), 1.38 (1H, m, H-18), 1.10 (1H, d, $J=6.9$ Hz, H-19), 9.02 (1H, s, H-2'), 7.39 (1H, dd, $J=4.8, 7.9$ Hz, H-5'), 8.73 (1H, dd, $J=1.7, 7.9$ Hz, H-6'), 1.56 (3H, s, 1-OAc), 1.86 (3H, s, 2-OAc), 2.02 (3H, s, 5-OAc), 2.18 (3H, s, 7-OAc), 2.22 (3H, s, 8-OAc), 2.35 (3H, s, 11-OAc); ^{13}C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 73.2 (C-1), 68.8 (C-2), 75.8 (C-3), 70.2 (C-4), 73.5 (C-5), 50.6 (C-6), 69.0 (C-7), 70.9 (C-8), 52.5 (C-9), 94.1 (C-10), 60.1 (C-11), 22.3 (C-12), 84.6 (C-13), 18.5 (C-14), 70.4 (C-15), 33.5 (C-16), 45.9 (C-17), 11.6 (C-18), 10.1 (C-19), 173.5 (C-20), 168.2 (C-21), 150.8 (C-2'), 125.8 (C-3'), 156.6 (C-4'), 121.4 (C-5'), 152.7 (C-6'), 20.3, 168.9 (1-OAc), 21.1, 168.7 (2-OAc), 21.6, 170.8 (5-OAc), 21.2,

170.3 (7-OAc), 20.4, 169.1 (8-OAc), 21.6, 170.1 (11-OAc)。以上数据与文献^[31]一致,故确定化合物为 Peritassine A。

化合物 12: 红色片状晶, C₂₉H₃₈O₄, (+)-ESI-MS m/z : 451.2 [M+H]⁺; (-)-ESI-MS m/z : 449.2 [M-H]⁻。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 6.50 (1H, s, H-1), 7.24 (1H, brd, H-7), 2.24 (3H, s, H-23), 1.49 (3H, s, H-24), 1.33 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-26), 1.15 (3H, s, H-27), 1.21 (3H, s, H-29); ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz): 119.0 (C-1), 178.7 (C-2), 146.5 (C-3), 118.7 (C-4), 127.2 (C-5), 135.0 (C-6), 118.3 (C-7), 170.8 (C-8), 42.8 (C-9), 165.1 (C-10), 33.2 (C-11), 29.4 (C-12), 39.3 (C-13), 44.9 (C-14), 28.4 (C-15), 36.2 (C-16), 30.5 (C-17), 44.3 (C-18), 30.2 (C-19), 39.8 (C-20), 29.2 (C-21), 34.6 (C-22), 8.9 (C-23), 37.5 (C-25), 20.8 (C-26), 18.2 (C-27), 30.6 (C-28), 31.8 (C-29), 181.1 (C-30)。以上数据与文献^[32]一致,故确定化合物为 Cel。

化合物 13: 白色固体, C₂₉H₃₈O₅, (+)-ESI-MS m/z : 467.3 [M+H]⁺; (-)-ESI-MS m/z : 465.3 [M-H]⁻。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 6.87 (1H, s, H-1), 6.19 (1H, s, H-7), 2.57 (3H, s, H-23), 1.56 (3H, s, H-24), 1.37 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-26), 1.16 (3H, s, H-27), 1.20 (3H, s, H-29); ^{13}C NMR (MeOD, 125 MHz): 108.4 (C-1), 141.8 (C-2), 149.1 (C-3), 124.8 (C-4), 121.0 (C-5), 170.2 (C-8), 149.3 (C-10), 33.6 (C-11), 29.3 (C-12), 38.5 (C-13), 44.0 (C-14), 28.0 (C-15), 36.0 (C-16), 30.0 (C-17), 43.6 (C-18), 30.0 (C-19), 39.3 (C-20), 29.3 (C-21), 34.5 (C-22), 13.5 (C-23), 37.4 (C-24), 20.7 (C-25), 18.0 (C-26), 31.3 (C-27), 179.3 (C-28), 32.2 (C-29)。以上数据与文献^[29]一致,故确定化合物为雷公藤酚 A (Wilforol A)。

化合物 14: 白色结晶, C₃₀H₄₈O₄, (+)-ESI-MS m/z : 473.3 [M+H]⁺; (-)-ESI-MS m/z : 471.4 [M-H]⁻。 ^1H NMR (MeOD, 500 MHz): 3.54 (1H, m, H-3), 5.28 (1H, brd, H-12), 1.01 (9H, s, H-21, H-22, H-24), 0.81 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-25), 1.21 (3H, s, H-26), 1.27 (3H, s, H-27)。以上数据与文献^[33]一致,故确定化合物为雷公藤三萜酸 A (Triptotriterpenic acid A)。

化合物 15: 白色结晶, $C_{28}H_{36}O_5$, (+) -ESI-MS m/z : 453. 3 $[M+H]^+$; (-) -ESI-MS m/z : 451. 3 $[M-H]^-$. 1H NMR (MeOD, 500 MHz): 6. 87 (1H, s, H-1), 7. 82 (1H, s, H-4), 6. 30 (3H, s, H-7), 1. 50 (3H, s, H-23), 0. 51 (3H, s, H-24), 1. 28 (6H, s, H-25, H-27), 1. 16 (3H, s, H-26)。以上数据与文献^[34]一致, 故确定化合物为 23-Nor-6-oxodemethylpristimerol。

3.3.3 单体化合物的细胞毒活性评价 细胞活性评价结果表明, TP(5) 和 Cel(12) 的活性较强(表 5,

结构式见图 2), 通过 CCK8 实验测得 IC_{50} 值(图 2), 其中 TP 抗 AMOL 活性最强 [IC_{50} 值为 $(3.35 \pm 0.03) ng \cdot mL^{-1}$], 优于 DNR 阳性对照组 [IC_{50} 值为 $(55.41 \pm 0.28) ng \cdot mL^{-1}$], Cel 的活性比 TP 弱 [IC_{50} 值为 $(1.19 \pm 0.01) \mu g \cdot mL^{-1}$]。相同摩尔剂量下的 TP 比 Cel 活性强约 300 倍, 雷公藤多苷片提取物中的 Cel 的含量(约 5.5%) 是 TP(约 0.5%) 的 10 倍, 由此我们推断 TP 可能是雷公藤抗急性白血病单核细胞的主要药效物质基础。

表 5 化合物 1~15 对 MV-4-11 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Table 5 The proliferation inhibition of compounds 1-15 against MV-4-11 cells for 48 h ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

编号	化合物	25 $\mu g \cdot mL^{-1}$	5 $\mu g \cdot mL^{-1}$	1 $\mu g \cdot mL^{-1}$
1	雷酚内酯(Triptophnolide)	93.41±0.17	24.61±10.19	5.54±4.13
2	异雷酚新内酯(Isonetriptophenolide)	66.54±1.14	-8.94±1.05	-23.48±3.64
3	雷酚萜醇(Triptoterpenol)	91.37±1.30	27.67±15.60	12.01±9.58
4	Triptobenzene J	92.15±3.11	-4.44±6.44	-10.47±4.47
5	雷公藤甲素(Triptolide)	91.84±0.63	91.46±0.30	88.59±1.02
6	雷公藤晋碱(Wilforgine)	-5.69±8.27	-33.66±12.28	-42.56±16.57
7	雷公藤定碱(Wilfordine)	16.21±10.07	9.19±11.47	3.28±13.39
8	雷公藤次碱(Wilforine)	55.09±4.53	17.49±1.24	15.39±0.68
9	雷公藤春碱(Wilfortrine)	12.77±0.97	9.31±5.95	-22.35±5.76
10	雷公藤新碱(Euonine)	7.00±1.00	-3.41±8.39	-6.82±2.16
11	Peritassine A	92.91±0.63	14.66±1.82	0.13±4.12
12	雷公藤红素(Celastrol)	94.17±0.29	77.40±0.41	73.72±0.29
13	雷公藤酚 A(Wilforol A)	92.54±0.23	34.85±0.08	-22.92±1.38
14	雷公藤三萜酸 A(Triptotriterpenic acid A)	89.65±0.35	2.39±0.27	-30.44±0.06
15	23-Nor-6-oxodemethylpristimerol	94.06±0.28	18.08±0.96	-52.65±0.20
16	雷公藤多苷片提取物(Tripterygium glycosides extract)	91.62±0.30	90.24±0.59	23.13±2.83

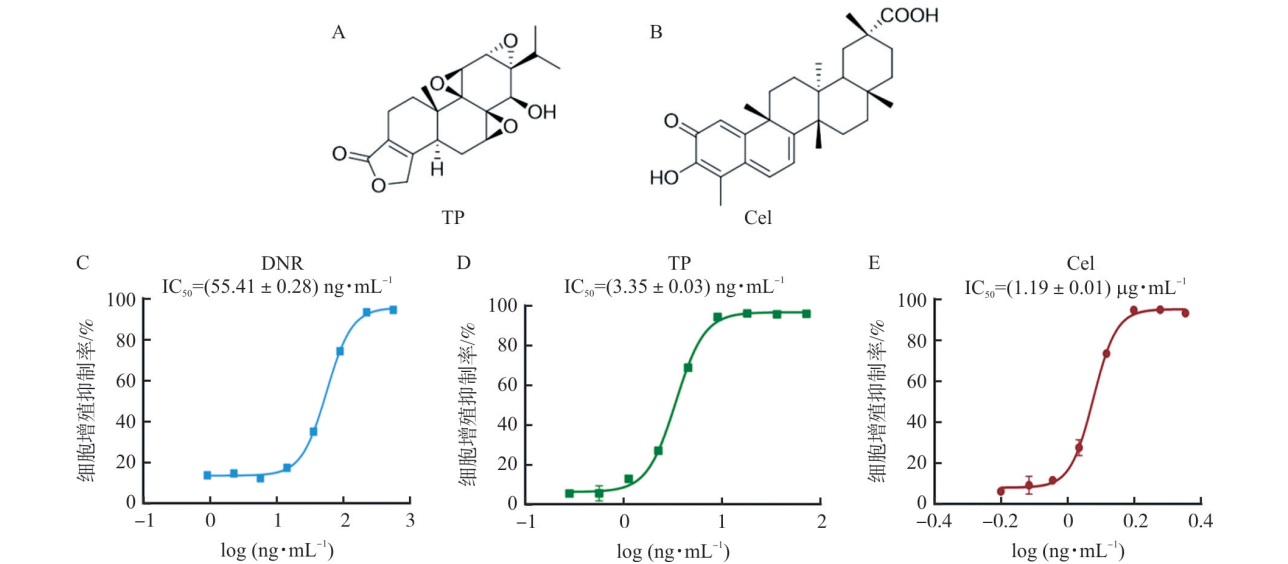


图 2 TP 和 Cel 的化学结构及对 MV-4-11 细胞的增殖抑制作用

Fig. 2 The chemical structures of TP and Cel and their inhibitory effects on the proliferation against MV-4-11 cells

3.4 TP 抑制 AMOL 活性具有选择性

为验证 TP 是否与雷公藤多苷片提取物有着相同的血液肿瘤敏感瘤谱,我们考察了 TP 对不同血液肿瘤细胞系的抑制作用,结果表明与雷公藤多苷片提取物的结果一致,TP 对单核细胞来源的白血病细胞 SHI-1 及 MV-4-11 增殖抑制作用最强,IC₅₀ 小于 3.5 ng·mL⁻¹,优于其在 Kasumi-1、SU-DHL-10 和 K562 等非单核细胞白血病细胞系中的抑制活性(表 6),进一步说明 TP 是雷公藤多苷片抗 AMOL 的主要药效物质基础。本实验的前期工作发现 TP 通过阻滞 MV-4-11 细胞的周期于 G1 期引起细胞凋亡来发挥抗肿瘤活性^[35]。同时,我们考察发现 TP 对人肾皮质近曲小管上皮细胞系 HK2 与人正常肝细胞系 L02 有一定的抑制作用,其活性弱于 AMOL 细胞系(图 3)。

表 6 TP 作用于不同肿瘤细胞系 48 h 的 IC₅₀ 值($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 IC ₅₀ values of TP against different tumor cell lines for 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)		
细胞系名称	细胞系类型	TP/(ng·mL ⁻¹)
SHI-1	AMOL 细胞	1.37±0.11
MV-4-11	AMOL 细胞	3.35±0.03
Kasumi-1	人急性原粒细胞白血病细胞	3.51±0.26
SU-DHL-10	人 B 细胞淋巴瘤细胞	11.41±1.22
K562	人慢性髓原白血病细胞	13.35±1.05

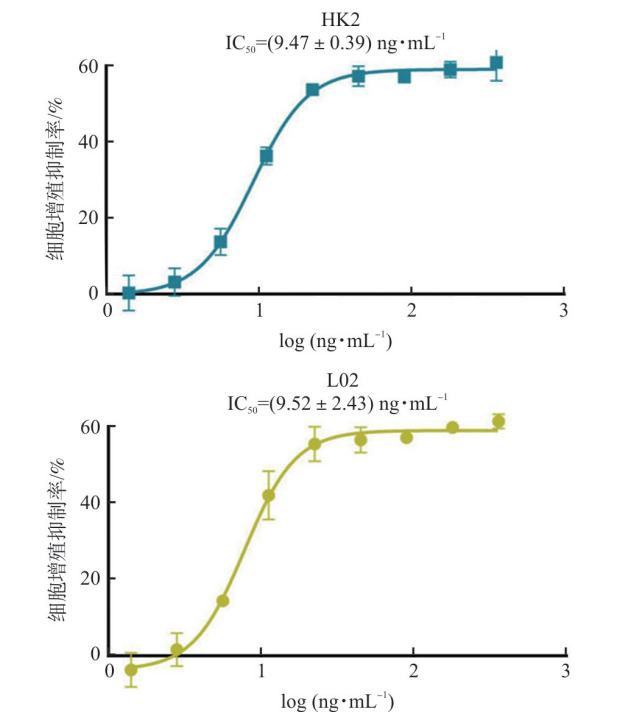


图 3 TP 对 HK2 和 L02 细胞的抑制作用
Fig.3 The inhibitory effects of TP against HK2 and L02 cells

3.5 TP 定向敲除前后雷公藤多苷片及其提取物对 MV-4-11 细胞增殖抑制活性变化

为了进一步验证 TP 是否为雷公藤多苷片的抗白血病的物质基础,本文通过 CCK8 实验测得雷公藤多苷片及雷公藤多苷片提取物定向敲除 TP 前后的 IC₅₀ 值。实验结果表明,雷公藤多苷片及雷公藤多苷片提取物定向敲除 TP 后的 IC₅₀ 值分别升高了 8 及 13 倍(表 7),进一步验证了 TP 是其发挥抗 AMOL 细胞增殖活性的物质基础。

表 7 雷公藤多苷片及其提取物定向敲除 TP 前后作用 MV-4-11 细胞 48 h 的 IC₅₀ 值($\bar{x}\pm s, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}, n=3$)
Table 7 IC₅₀ values of tripterygium glycosides tablet and its extract against MV-4-11 cells for 48 h before or after targeted knock-out of TP ($\bar{x}\pm s, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}, n=3$)

雷公藤制剂	去除 TP 前	去除 TP 后
雷公藤多苷片(美通)	3.57±0.10	28.91±0.02
雷公藤多苷片提取物	2.10±0.02	28.21±0.22

4 讨论

本研究通过考察雷公藤多苷片提取物以及 TP 的敏感瘤株,发现 AMOL 细胞对其敏感;进一步采用体内外实验验证了雷公藤多苷片的抗肿瘤作用;最后通过色谱分离技术定向敲除 TP,结果表明 TP 敲除后的雷公藤多苷片及雷公藤多苷片提取物的 IC₅₀ 值分别升高了 8 倍和 13 倍。上述研究提示 TP 是雷公藤发挥抗 AMOL 的物质基础。然而,敲除 TP 后的雷公藤活性并没有完全消失,推测存在 2 种可能性:①另有尚未分离出的强效微量抗肿瘤活性成分;②含量相对较高的 Cel 发挥一定的抗肿瘤作用。

中药是中华传统医学的主要医治手段,如何从传统中药中获得确证药效的化学成分一直是国际医药界的关注焦点。青蒿素治疗疟疾^[36-37]、砒霜治疗白血病^[38-39]——这些中药上的突破与现代科学严谨的研究方法密切相关。有着“中草药激素”之称的雷公藤在临床治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病中疗效确证,但毒副作用常使临床医生不敢贸然使用^[40-41],这与其物质基础不明确有着一定的关系。雷公藤的化学成分复杂,被认可的有效成分 TP 在不同产地药材以及药材不同部位中的含量变化很大,应用粗药材入药存在中毒风险^[42]。国内上市制剂雷公藤多苷片的质量参差不齐,TP 含量差异较大,质量标准不统一^[43]。所以,在不同疾病类型中明确雷公藤发挥药效的物质基础,并在此基础上研发新药或许可以克服其临床转化等难题。

TP 既是中药雷公藤的活性成分,又是毒性成分,在雷公藤制剂中的含量低微。与 XPB 共价结合对整体转录水平的抑制可能是 TP 发挥广谱抗肿瘤作用与毒性作用的共同分子基础。因此,寻找雷公藤的敏感瘤株及适应症或许可以提高其临床治疗窗口。此外,雷公藤敏感疾病谱的作用靶标有哪些?是否与 XPB 关系密切,这些终将为雷公藤在临床应用上的突破做出重大贡献。

参考文献:

- [1] 梁克军. 雷公藤[J]. 中草药通讯, 1973, 4(4): 55-57.
LIANG KJ. *Tripterygium* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1973, 4(4): 55-57.
- [2] 程悦, 纪伟. 雷公藤及其相关制剂治疗强直性脊柱炎的临床研究进展[J]. 现代医学, 2020, 48(7): 920-924.
CHENG Y, JI W. Clinical research progress of *tripterygium wilfordii* and its related preparations in the treatment of ankylosing spondylitis [J]. Mod Med J, 2020, 48(7): 920-924.
- [3] 冯云柱, 任国强, 牛丽娜. 雷公藤合剂治疗强直性脊柱炎 52 例报告[J]. 中医临床与保健, 1993, 5(1): 15-16.
FENG YZ, REN GQ, NIU LN. Treatment of 52 cases of ankylosing spondylitis with *tripterygium wilfordii* mixture [J]. Clin J Tradit Chin Med, 1993, 5(1): 15-16.
- [4] 程玉茹. 雷公藤多苷治疗慢性肾炎的应用价值分析[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(15): 18-20.
CHENG YR. Analysis of application value of *tripterygium wilfordii* polyglycoside in treating chronic nephritis [J]. Mod Med Heal Res Electron J, 2021, 5(15): 18-20.
- [5] 金惠伯, 余承惠. 中医药治疗慢性肾炎 50 例疗效观察[J]. 中医杂志, 1981, 22(4): 34-36.
JIN HB, YU CH. Clinical observation on 50 cases of chronic nephritis treated with traditional Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 1981, 22(4): 34-36.
- [6] 黎磊石, 刘志红. 雷公藤治疗不同类型肾炎的疗效[J]. 冶金医药情报, 1991, 8(3): 135-136.
LI LS, LIU ZH. Therapeutic effect of *tripterygium wilfordii* on different types of nephritis [J]. Chin Med J Metall Ind, 1991, 8(3): 135-136.
- [7] 陈绪华, 景海霞. 雷公藤影响系统性红斑狼疮免疫调节的实验研究[J]. 湖北医药学院学报, 2021, 40(2): 124-128.
CHEN XH, JING HX. Experimental study on the effects of *Tripterygium wilfordii* on immune regulation of systemic lupus erythematosus [J]. J Hubei Univ Med, 2021, 40(2): 124-128.
- [8] QIN W, LIU C, YANG S. *Tripterygium Wilfordii* Hook F in systemic lupus erythematosus; Report of 103 cases [J]. Chin Med J, 1981, 94(12): 827-834.
- [9] NOEL P, VON HOFF DD, SALUJA AK, et al. Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(5): 327-341.
- [10] 宋祎, 刘琰, 方冰倩, 等. 雷公藤甲素抗肿瘤作用及其配伍减毒机制的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(3): 457-464.
SONG Y, LIU Y, FANG BQ, et al. Research progress in antineoplastic mechanism of triptolide and toxicity attenuation by compatibility [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2021, 37(3): 457-464.
- [11] 任利文, 郑湘锦, 李婉, 等. 雷公藤毒性的历史认识与评价[J]. 医药导报, 2021, 40(5): 637-641.
REN LW, ZHENG XJ, LI W, et al. Historical cognition and evaluation of *Tripterygium wilfordii* toxicity [J]. Her Med, 2021, 40(5): 637-641.
- [12] 陈琪, 周静威, 李世超, 等. 中药配伍减轻雷公藤制剂肝毒性的系统评价[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(4): 13-22.
CHEN Q, ZHOU JW, LI SC, et al. Effects of compatibility of Chinese medicine on reducing hepatotoxicity of *Tripterygium wilfordii* preparations; A systematic review [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2019, 33(4): 13-22.
- [13] LI XX, DU FY, LIU HX, et al. Investigation of the active components in *Tripterygium wilfordii* leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 238-243.
- [14] BRINKER AM, MA J, LIPSKY PE, et al. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [J]. Phytochemistry, 2007, 68(6): 732-766.
- [15] 姚智, 高文远, 高石喜久, 等. 雷公藤中具有抗癌活性的二萜类化合物[J]. 中草药, 2007, 38(11): 1603-1606.
YAO Z, GAO WY, TAKAISHI Y, et al. Diterpenes from *Tripterygium wilfordii* and their anti-cancer activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2007, 38(11): 1603-1606.
- [16] 程薇, 张茵, 翟亚萍, 等. 雷公藤红素对人急性髓系白血病原代细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(12): 1171-1173.
CHENG W, ZHANG Y, ZHAI YP, et al. Effects of tripterine on proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia primary cells [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2011, 25(12): 1171-1173.
- [17] 王红敏. 雷公藤红素抗卵巢癌作用机制及结构修饰研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2019.
WANG HM. Mechanism of anti-ovarian cancer by celastrol and its structural modification [D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2019.
- [18] 钟点, 陈渊, 赵伟. 雷公藤红素抗炎及免疫抑制的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(1): 64-69.
ZHONG D, CHEN Y, ZHAO W. Research progress of anti-inflammatory and immunosuppressive effects of celastrol [J]. Pharm Biotechnol, 2018, 25(1): 64-69.
- [19] KUPCHAN SM, COURT WA, DAILEY RG Jr, et al. Triptolide and triptidolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii* [J]. J Am Chem Soc, 1972, 94(20): 7194-7195.
- [20] TITOV DV, GILMAN B, HE QL, et al. XPB, a subunit of TFI-IH, is a target of the natural product triptolide [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(3): 182-188.
- [21] GIRI B, GUPTA VK, YAFFE B, et al. Pre-clinical evaluation of Minnelide as a therapy for acute myeloid leukemia [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 163.
- [22] 潘祥, 王均伟, 胡立宏. 雷公藤甲素前药的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(5): 684-689.
PAN X, WANG JW, HU LH. Research progress of triptolide prodrugs [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2020, 36(5): 684-689.
- [23] 姚骥如, 孙莹, 罗顺葵, 等. 雷公藤多苷的临床应用进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(3): 179-182.

- YAO JR, SUN Y, LUO SK, et al. Progress of *Tripterygium* glycosides in clinical application[J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2010, 29(3): 179-182.
- [24] 戴惠珍. 治疗免疫性疾病新药雷公藤总甙[J]. 江苏医药, 1982, 8(6): 39.
- DAI HZ. Tripterygium wilfordii glycosides, a new drug for treating immune diseases[J]. Jiangsu Med J, 1982, 8(6): 39.
- [25] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1964: 275.
- Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China[S]. Beijing: People's medical publishing house, 1964: 275.
- [26] 王菲菲, 张聿梅, 何轶, 等. 雷酚内酯的波谱学数据与结构确证[J]. 波谱学杂志, 2017, 34(1): 35-42.
- WANG FF, ZHANG YM, HE Y, et al. Spectral analysis and structural elucidation of triptophnolide[J]. Chin J Magn Reson, 2017, 34(1): 35-42.
- [27] 陈玉, 杨光忠, 赵松, 等. 雷公藤二萜成分研究[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(2): 35-38.
- CHEN Y, YANG GZ, ZHAO S, et al. Diterpenoids from *Tripterygium wilfordii* hook. f[J]. Chem Ind For Prod, 2005, 25(2): 35-38.
- [28] 张彦文, 范云双, 王晓东, 等. 昆明山海棠中具有免疫抑制活性的二萜化合物[J]. 中草药, 2007, 38(4): 493-496.
- ZHANG YW, FAN YS, WANG XD, et al. Diterpenoids possessed immunosuppressive activity from *Tripterygium hypoglaucum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2007, 38(4): 493-496.
- [29] 沈倩. 雷公藤免疫抑制活性成分研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2008.
- SHEN Q. Studies on the immunosuppressive components from *Tripterygium wilfordii*[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2008.
- [30] 苗抗立, 徐雪华, 汪红. 雷公藤生物碱的研究[J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(S1): 9-12.
- MIAO KL, XU XH, WANG H. Studies on alkaloids of *Tripterygium wilfordii* hook. f[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2002, 19(S1): 9-12.
- [31] 井莉, 柯昌强, 李希强, 等. 雷公藤中倍半萜生物碱的分离与结构鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(3): 210-214, 218.
- JING L, KE CQ, LI XQ, et al. Isolation and structural identification of sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii*[J]. Chin J Med Chem, 2008, 18(3): 210-214, 218.
- [32] 吴春敏. 雷公藤化学成分与多组分含量测定研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- WU CM. Studies on chemical constituents and multi-components content determination of *Tripterygium wilfordii*[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2010.
- [33] 张崇璞, 张永刚, 吕燮余, 等. 从雷公藤分离出五环三萜酸[J]. 中国医学科学院学报, 1986, 8(3): 204-206.
- ZHANG CP, ZHANG YG, LU XY, et al. A pentacyclic triterpene acid from[J]. Acta Acad Med Sin, 1986, 8(3): 204-206.
- [34] MOROTA T, YANG CX, OGINO T, et al. D: A-friedo-24-noroleanane triterpenoids from tripterigium wilfordii[J]. Phytochemistry, 1995, 39(5): 1159-1163.
- [35] KANG D, LIU Y, SONG Y, et al. Triptolide shows high sensitivity and low toxicity against acute myeloid leukemia cell lines through inhibiting WSTF-RNAP II complex[J]. Front Oncol, 2022, 12: 811850.
- [36] 袁亚男, 姜廷良, 周兴, 等. 青蒿素的发现和发展[J]. 科学通报, 2017, 62(18): 1914-1927.
- YUAN YN, JIANG TL, ZHOU X, et al. Discovery and development of artemisinin[J]. Chin Sci Bull, 2017, 62(18): 1914-1927.
- [37] 张铁军, 王于方, 刘丹, 等. 天然药物化学史话: 青蒿素: 中药研究的丰碑[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3351-3361.
- ZHANG TJ, WANG YF, LIU D, et al. Historical story on natural medicinal chemistry: Artemisinin—a milestone of traditional Chinese medicine study[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(19): 3351-3361.
- [38] 饶毅, 黎润红, 张大庆. 化毒为药: 三氧化二砷对急性早幼粒白血病治疗作用的发现[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(8): 700-707.
- RAO Y, LI RH, ZHANG DQ. Discovery of therapeutic effect of arsenic trioxide on acute promyelocytic leukemia[J]. Sci Sin Vitae, 2013, 43(8): 700-707.
- [39] 李永明. 砒霜治疗白血病的三次高潮和创新点[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 401-405.
- LI YM. Three waves of arsenic therapy for leukemia and related innovations[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2017, 37(4): 401-405.
- [40] 陈殊, 刘莉, 蒋红霞, 等. 雷公藤药理与毒理机制代谢组学研究进展[J]. 海峡药学, 2022, 34(2): 1-6.
- CHEN S, LIU L, JIANG HX, et al. Advances in pharmacology and toxicological mechanisms of *Tripterygium wilfordii* based on metabolomics[J]. Strait Pharm J, 2022, 34(2): 1-6.
- [41] 李志铭, 舒达夫, 刘沛霖, 等. 雷公藤研究的进展[J]. 新中医, 1981, 13(12): 40-42.
- LI ZM, SHU DF, LIU PL, et al. Research progress of *Tripterygium wilfordii*[J]. New J Tradit Chin Med, 1981, 13(12): 40-42.
- [42] 施昌年. 雷公藤药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 1989, 9(3): 111-113.
- SHI CN. Research progress of pharmacological action of *Tripterygium wilfordii*[J]. Chin J Hosp Pharm, 1989, 9(3): 111-113.
- [43] 王亚丹, 汪祺, 张建宝, 等. 雷公藤制剂的化学成分及质量研究现状[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3368-3373.
- WANG YD, WANG Q, ZHANG JB, et al. Research progress on chemical constituents and quality control of *Tripterygium wilfordii* preparations[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(16): 3368-3373.

(编辑:杨巍敏)