

毛萼香茶菜中黄酮和二萜化合物的分离制备及其 抗病毒活性

王 俊^{1,2}, 蔡灵巧^{2,3}, 严 冬⁴, 郭 敏⁴, 王 庆⁴, 张 健^{2,3}, 殷志琦^{1*}

(¹中国药科大学中药学院中药制药系, 南京 210009; ²江苏省中医药研究院转化医学实验室, 南京 210028;

³南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028; ⁴昆明生达制药有限公司, 昆明 650033)

摘 要 从毛萼香茶菜中分离制备 2 种黄酮和 2 种二萜化合物, 并研究其体外抗病毒活性。首先采用硅胶、ODS、制备型 HPLC 等多种色谱技术和波谱方法, 从毛萼香茶菜乙醇提取物中分离制备了 4 个化合物, 分别鉴定为 8-羟基蒽黄素(1)、蒽黄素(2)、假细锥甲素(3)、毛萼晶 D(4)。然后对毛萼香茶菜乙醇提取物和 4 个化合物开展了体外抗流感病毒(H1N1, H3N2)和呼吸道合胞病毒(RSV)活性研究。结果显示, 毛萼香茶菜乙醇提取物和 4 个化合物对流感病毒 H1N1 均有一定的抑制作用, 其中化合物 1 和 2 的抑制效果较优, 半数有效浓度(EC₅₀)分别为(14.45 ± 4.90)和(24.54 ± 3.82) μmol/L。但化合物 1 和 2 对 H3N2 和 RSV 的抑制作用则相对较弱。以上结果表明, 毛萼香茶菜乙醇提取物及化合物 1~4 有一定的抗病毒作用, 尤其是对甲型流感病毒 H1N1 具有较好的抑制作用, 黄酮类化合物可能是其抗病毒作用的有效物质之一, 本研究为毛萼香茶菜的临床应用提供了科学依据。

关键词 毛萼香茶菜; 对映-贝壳杉二萜; 黄酮; 抗病毒活性

中图分类号 R931.6 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)05-0580-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180510

引用本文 王俊, 蔡灵巧, 严冬, 等. 毛萼香茶菜中黄酮和二萜化合物的分离制备及其抗病毒活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5): 580–586.

Cite this article as: WANG Jun, CAI Lingqiao, YAN Dong, et al. Antiviral activities of flavonoids and diterpenoids isolated from *Isodon eriocalyx* (Dunn.) Hara[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(5): 580–586.

Antiviral activities of flavonoids and diterpenoids isolated from *Isodon eriocalyx* (Dunn.) Hara

WANG Jun^{1,2}, CAI Lingqiao^{2,3}, YAN Dong⁴, GUO Min⁴, WANG Qing⁴, ZHANG Jian^{2,3}, YIN Zhiqi^{1*}

¹Department of TCMs Pharmaceuticals, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028; ³Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028; ⁴Kunming Lifetech Pharmaceutical Co., Ltd., Kunming 650033, China

Abstract This study aims to isolate two flavonoids and two diterpenoids from *Isodon eriocalyx*(Dunn.) Hara and investigate their antiviral activities *in vitro*. Firstly, four compounds were isolated from the ethanol extract of *I. eriocalyx* by silica gel, ODS and RP-HPLC chromatography, and then identified by spectral data as isothymusin (1), cirsimaritin (2), coetsoidin A (3), and maoecrystal D (4). Next, *in vitro* antiviral activities against influenza (H1N1/H3N2) and respiratory syncytial virus (RSV) was investigated for the ethanol extract of *I. eriocalyx* and four compounds. Results showed that the ethanol extract of *I. eriocalyx* and four compounds exhibited inhibitory effects against influenza H1N1. Especially, compounds 1 and 2 showed better activities with EC₅₀ of (14.45 ± 4.90) and (24.54 ± 3.82) μmol/L. However, they showed weak inhibitory effects against influenza H3N2 and RSV. These results demonstrate that the ethanol extract of *I. eriocalyx* and compounds 1–4 have antiviral activity,

especially against influenza H1N1. The flavonoids may be one kind of the effective antiviral substances. This study provides a scientific basis for the clinical application of *I. eriocalyx*.

Key words *Isodon eriocalyx* (Dunn.) Hara; ent-kauranoid; flavonoid; antiviral activity

毛萼香茶菜 [*Isodon eriocalyx* (Dunn.) Hara] 为唇形科 (Labiatae) 香茶菜属植物, 多年生草本或灌木, 俗名火麻根、虎尾草和大马鞭稍等, 主要分布在我国的云南、贵州南部、四川西部及广西西部, 生长于海拔 750 ~ 2 600 m 的山坡阳处灌丛中。民间常用其叶治香港脚、根止泻痢^[1-2], 现代药理研究表明其主要有抗肿瘤、抗菌、抗炎和抗病毒等作用。

目前以毛萼香茶菜乙醇提取物作为主要成分的毛萼香茶菜清热利咽片已上市销售, 用于缓解风热上扰型急性咽炎引起的咽痛。这种上呼吸道感染引起的咽炎疼痛, 常与流感病毒和呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染相关。因此, 推测毛萼香茶菜乙醇提取物具有抗病毒作用, 但其作用物质基础并不明确。据报道, 毛萼香茶菜中的化合物类型主要包括二萜、三萜、黄酮和其他类, 尤以二萜中的对映-贝壳杉烷型二萜为主。而从单体化合物的含量上来看, 对映-贝壳杉烷型二萜中的毛萼晶 D 和假细锥甲素以及黄酮中的 8-羟基黄酮和萹黄素均有报道分离得到克级以上, 都属于该植物中含量较高的成分^[3-6]。而这些成分是否是毛萼香茶菜抗病毒活性成分仍有待研究。流感病毒中以甲型流感病毒最易发生变异, 危害性大, 故本研究中所选用的病毒株包括较具代表性的甲型流感病毒 H1N1、H3N2 以及 RSV。因此, 本研究拟以毛萼香茶菜为原料, 利用现代柱色谱等分离技术制备该植物中的毛萼晶 D、假细锥甲素、8-羟基黄酮和萹黄素, 并考察其体外抗流感病毒和抗 RSV 的活性, 以期发现毛萼香茶菜抗病毒活性的药效成分, 为其临床用药提供科学依据。

1 材 料

1.1 药品和试剂

毛萼香茶菜乙醇提取物 (昆明生达制药有限公司, 批号 20170213); 奥司他韦羧酸盐 (MedChem Express 公司, 批号 HY-17016), 临用前以生理盐水配制成 1 mg/mL 的母液, 以孔径 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌, 分装冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用; MTT (合肥 Bio Sharp 公司); DMEM 和胎牛血清 (美国 Gibco

公司)。

1.2 仪 器

Bruker Avance-300 及 Bruker Avance-500 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Waters Alliance 半制备液相色谱仪配备 Waters-Pack ODS 半制备型色谱柱 (250 mm \times 20 mm, 5 μm); iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 (上海长方光学仪器有限公司)。

1.3 病毒和细胞

流感病毒株 A/FM1/1/47 (H1N1)、A/Beijing/32/92 (H3N2), 呼吸道合胞病毒 (RSV) Long 株、狗肾传代细胞 (MDCK 细胞株)、人宫颈癌细胞 (HeLa 细胞株) 均由中国药科大学微生物学与免疫学实验室提供; 流感病毒株 H1N1、H3N2 经鸡胚 (SPF 级) 传代培养, 收集尿囊液, 经血凝试验测定病毒滴度为 1:512 后, 分装于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 呼吸道合胞病毒 (RSV) Long 株接种于 HeLa 细胞中传代培养, 分装于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 方 法

2.1 化合物的分离制备

毛萼香茶菜乙醇提取物加水混悬, 依次经等体积的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇分别萃取, 得到对应的萃取部位。取乙酸乙酯萃取部位 (0.8 kg) 经硅胶柱色谱, 以氯仿-丙酮 (1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 0:1) 梯度洗脱, TLC 薄层检识, 得到亚馏分 (Fr. 1 ~ Fr. 7)。Fr. 1 (128 g) 经硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 (15:1, 10:1, 7:1, 0:1) 梯度洗脱, TLC 薄层检识, 得到馏分 (Fr. 1-1 ~ Fr. 1-4)。Fr. 1-2 (30 g) 经凝胶柱色谱、反相 ODS 柱色谱及半制备型高效液相色谱 (甲醇-水, 63:37) 分离得到化合物 **3** (1.8 g)、**4** (1.4 g)。Fr. 2 (94.1 g) 经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮 (5:1, 0:1) 梯度洗脱, TLC 薄层检识, 得到馏分 (Fr. 2-1 ~ Fr. 2-3)。Fr. 2-3 (43 g) 经反相 ODS 柱色谱及半制备型高效液相色谱 (甲醇-水, 68:32) 分离得到化合物 **1** (1.1 g)、**2** (1.5 g)。

2.2 结构鉴定

通过核磁共振波谱仪分析得到化合物 **1** ~ **4**

的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 图谱。

2.3 化合物对 MDCK 细胞和 HeLa 细胞的毒性作用

将毛萼香茶菜乙醇提取物用 DMSO 配制成 100 mg/mL 母液, 4 个单体化合物用 DMSO 分别配制成 100 mmol/L 母液, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。乙醇提取物用无血清 DMEM 培养基依次稀释成 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.15, 0.08 $\mu\text{g/mL}$, 化合物依次稀释成 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 。MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基按每毫升 5×10^4 个细胞的浓度接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜形成细胞单层。弃去上清液, 用 PBS 将细胞清洗 2 次, 加入配好的不同浓度的药物, 每孔 100 μL , 同时设置不加药物的正常细胞组、加含 1% DMSO 的培养液的溶剂对照组, 每组设置 4 个复孔。置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 连续 3 d 逐日观察药液对细胞有无毒性作用。培养 72 h 后, 用 MTT 法测定细胞活力, 确定乙醇提取物和化合物最大无毒浓度。实验重复 3 次, 计算乙醇提取物和化合物对 MDCK 细胞的半数毒性浓度 (CC_{50})。

将 MDCK 细胞替换为 HeLa 细胞, 以相同方法测定对 H1N1 病毒有较好抑制效果的化合物对 HeLa 细胞的毒性作用。

2.4 病毒毒力测定

将 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的流感病毒尿囊液和 RSV 病毒以倍比梯度稀释成 11 个浓度, 分别感染在 96 孔板中长成单层的 MDCK 细胞和 HeLa 细胞, 每个浓度设置 4 个复孔, 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h, 观察细胞病变, 细胞病变程度评价方法: 1% ~ 25% 为“+”, 26% ~ 50% 为“2+”, 51% ~ 75% 为“3+”, 76% ~ 100% 为“4+”, 以恰好 2 孔

以上的细胞病变程度达到“2+”时对应的病毒浓度来计算病毒半数细胞感染量 (TCID_{50})。

2.5 化合物对流感病毒和 RSV 病毒的体外抑制作用

根据细胞毒性实验结果, 将毛萼香茶菜乙醇提取物和 4 个化合物在无细胞毒浓度范围内稀释成相应浓度梯度, 分别以下列方法测定其体外抗病毒活性。

MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基按每毫升 5×10^4 个细胞的浓度接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL , 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养过夜形成细胞单层。弃去上清液, 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 TCID_{50} 流感病毒 H1N1 或 H3N2 感染细胞, 每孔 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后, 弃去病毒液。分别加入含不同浓度药物的细胞维持液 (含 1% 血清的 DMEM 培养基), 每孔 100 μL , 同时设正常细胞对照组、病毒对照组及阳性对照药奥司他韦羧酸盐 (10 $\mu\text{mol/L}$) 组, 每组设置 4 个复孔。置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h, 每日观察细胞病变。并用 MTT 法测定细胞活力, 实验共重复 3 次, 计算样品对病毒的抑制率、半数有效浓度 (EC_{50}) 和选择指数 (SI)。

将 MDCK 细胞替换为 HeLa 细胞, 以相同方法测定对 H1N1 病毒有较好抑制效果的单体化合物对 RSV 病毒的体外抑制作用。

病毒抑制率 (%) = (加药组吸收度 - 病毒对照组吸收度) / (正常细胞对照组吸收度 - 病毒对照组吸收度) $\times 100$; 选择指数 $\text{SI} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$ 。

2.6 数据分析

实验数据用 Microsoft Excel 2010 软件进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad Prism 软件作图呈现。

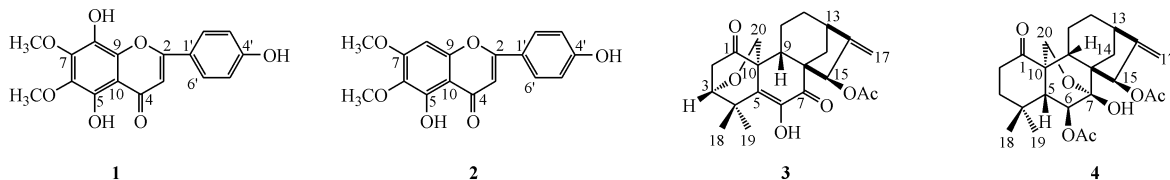


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-4

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1 橘色针晶 (氯仿-甲醇), 浓硫酸-香

草醛反应显黄色。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 12.46 (1H, s, 5-OH), 10.34 (1H, s, 4'-OH), 9.28 (1H, s, 8-OH), 8.03 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$, H-2', 6'), 6.95 (2H, d, $J = 8.5\text{ Hz}$, H-3', 5'), 6.83 (1H, s, H-

3), 3.95 (3H, s, 7-OCH₃), 3.84 (3H, s, 6-OCH₃)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 182.7 (C-4), 164.1 (C-2), 161.3 (C-4'), 148.0 (C-7), 144.6 (C-5), 141.3 (C-9), 136.1 (C-6), 130.5 (C-8), 128.7 (C-2'), 128.7 (C-6'), 121.2 (C-1'), 115.9 (C-3'), 115.9 (C-5'), 106.3 (C-10), 102.4 (C-3), 61.1 (7-OCH₃), 60.4 (6-OCH₃)。以上波谱数据与文献[3]对照基本一致,故确定化合物**1**为8-羟基蓟黄素(isothymusin)。

化合物**2** 黄色片晶(甲醇),浓硫酸-香草醛反应显黄色。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 300 MHz) δ : 12.93 (1H, s, 5-OH), 10.37 (1H, s, 4'-OH), 7.96 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.91 (1H, s, H-8), 6.83 (1H, s, H-3), 3.93 (3H, s, 7-OCH₃), 3.74 (3H, s, 6-OCH₃)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ : 182.1 (C-4), 164.0 (C-2), 161.2 (C-4'), 158.5 (C-7), 152.5 (C-5), 152.0 (C-9), 131.8 (C-6), 128.4 (C-2'), 128.4 (C-6'), 121.0 (C-1'), 115.9 (C-3'), 115.9 (C-5'), 105.0 (C-10), 102.6 (C-3), 91.5 (C-8), 59.9 (6-OCH₃), 56.3 (7-OCH₃)。以上波谱数据与文献[3]对照基本一致,故确定化合物**2**为蓟黄素(cirsimaritin)。

化合物**3** 白色针晶(甲醇),浓硫酸-香草醛反应显墨绿色。¹H NMR(C₅D₅N, 500 MHz) δ : 10.80 (1H, s, 6-OH), 6.84 (1H, t, J = 2.6 Hz, H-15 α), 5.26 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-17a), 5.05 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-17b), 4.79 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-20a), 4.39 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-20b), 3.87 (1H, t, J = 2.7 Hz, H-3 β), 3.73 (1H, br. d, J = 7.6 Hz, H-9 β), 3.04 (1H, dd, J = 19.2, 3.4 Hz, H-2 α), 2.90 (1H, dd, J = 19.3, 2.1 Hz, H-2 β), 2.69 (1H, br. s, H-13 α), 2.22 (1H, m, H-11 β), 1.98 (3H, s, 15-OAc), 1.81 (3H, s, Me-18), 1.32 (3H, s, Me-19)。¹³C NMR(C₅D₅N, 125 MHz) δ : 206.0 (C-1), 194.2 (C-7), 170.3 (OAc), 152.3 (C-16), 145.9 (C-6), 132.8 (C-5), 108.2 (C-17), 77.6 (C-3), 76.1 (C-15), 67.1 (C-20), 54.1 (C-8), 53.6 (C-10), 41.7 (C-2), 41.3 (C-13), 40.6 (C-4), 37.8 (C-14), 31.8 (C-12), 27.7 (C-9), 23.3 (C-18), 21.6 (C-19), 20.5 (OAc), 19.4 (C-11)。以上波谱数据与文献[7]对

照基本一致,故确定化合物**3**为假细锥甲素(coet-soidin A)。

化合物**4** 白色片晶(甲醇),浓硫酸-香草醛反应显紫红色。¹H NMR(C₅D₅N, 500 MHz) δ : 8.46 (1H, s, OH-7 β), 6.17 (1H, s, H-15 α), 5.69 (1H, d, J = 9.2 Hz, H-6 α), 5.18 (1H, br. s, H-17a), 5.15 (1H, br. s, H-17b), 4.63 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-20a), 4.17 (1H, d, J = 10.1 Hz, H-20b), 2.34 (3H, s, 15-OAc), 2.14 (3H, s, 6-OAc), 0.96 (3H, s, Me-18), 0.92 (3H, s, Me-19)。¹³C NMR(C₅D₅N, 125 MHz) δ : 212.4 (C-1), 170.9 (15-OAc), 170.7 (6-OAc), 158.7 (C-16), 109.7 (C-17), 96.3 (C-7), 75.3 (C-15), 74.0 (C-6), 64.9 (C-20), 54.3 (C-5), 52.2 (C-8), 49.1 (C-10), 42.8 (C-9), 38.5 (C-3), 36.0 (C-13), 35.7 (C-2), 32.7 (C-4), 32.3 (C-12), 29.5 (C-18), 27.1 (C-14), 23.0 (C-19), 22.0 (15-OAc), 21.2 (6-OAc), 17.9 (C-11)。以上波谱数据与文献[8]对照基本一致,故确定化合物**4**为毛萼晶D(maoecrystal D)。

3.2 化合物对MDCK细胞的毒性作用

在0~10 μ g/mL范围内,毛萼香茶菜乙醇提取物对MDCK细胞正常生长没有影响,表明在此浓度范围内乙醇提取物无明显毒性作用。4个单体化合物在较低浓度时(<100 μ mol/L)对MDCK细胞的正常生长均没有明显影响,细胞形态在镜下未见明显改变。而随着浓度的增大,化合物**1**和**3**两组的细胞活力呈现浓度依赖性降低,化合物**2**和**4**两组的细胞活力未受明显影响。4个化合物对MDCK细胞没有明显细胞毒性的浓度范围分别为:化合物**1**(0~100 μ mol/L)、化合物**2**(0~800 μ mol/L)、化合物**3**(0~400 μ mol/L)、化合物**4**(0~800 μ mol/L),4个化合物对MDCK细胞的CC₅₀分别为363.1 \pm 9.2、>800、562.3 \pm 8.7和>800 μ mol/L。

3.3 化合物对HeLa细胞的毒性作用

化合物**1**和**2**对HeLa细胞的毒性作用比对MDCK细胞的毒性作用要明显,在0~100 μ mol/L时,其细胞活力随着化合物浓度增大均呈现浓度依赖性降低。经计算可得其CC₅₀分别为(51.8 \pm 4.93)和(24.5 \pm 3.75) μ mol/L。

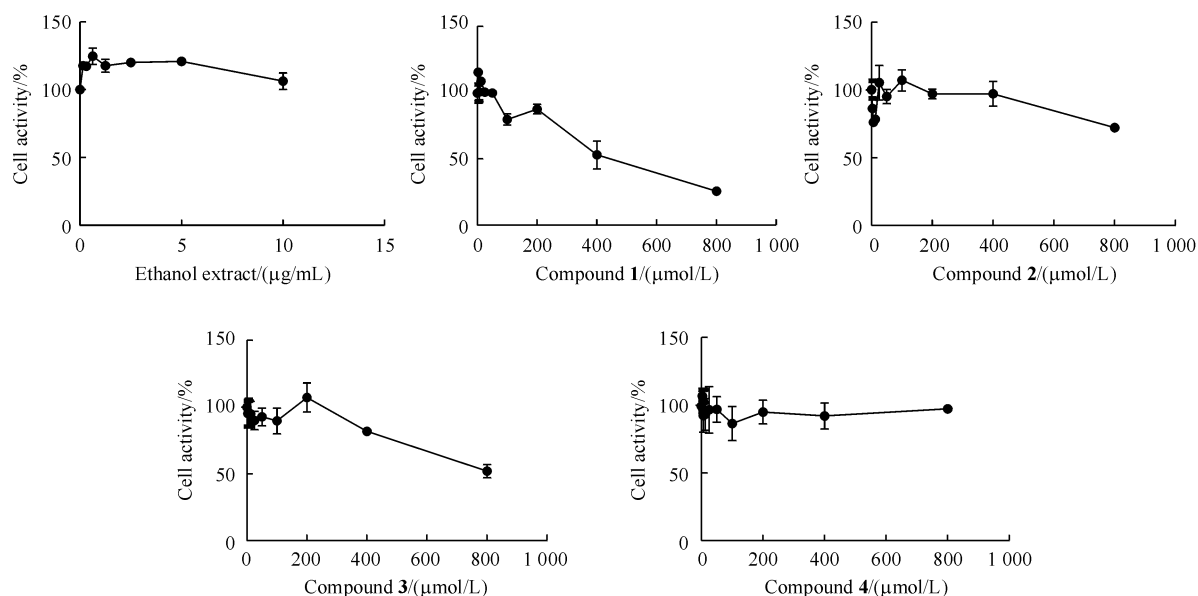


Figure 2 Cytotoxicity of ethanol extract of *Isodon eriocalyx* and compounds 1-4 isolated from *Isodon eriocalyx* on MDCK cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

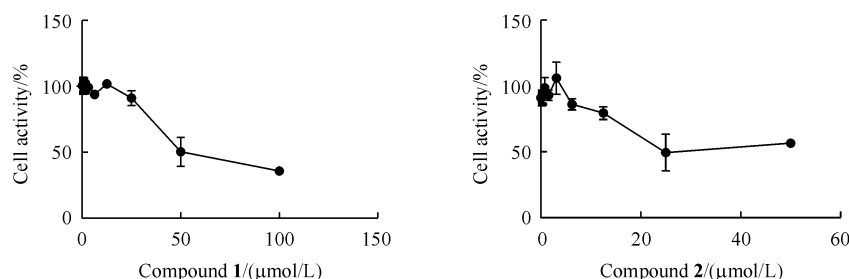


Figure 3 Cytotoxicity of compounds 1-2 isolated from *Isodon eriocalyx* on HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 病毒毒力测定

通过观察细胞病变程度发现,流感病毒 H1N1 的 $TCID_{50}$ 为 $1 \times 10^{-4}/100 \mu\text{L}$, 流感病毒 H3N2 的 $TCID_{50}$ 为 $1 \times 10^{-3}/100 \mu\text{L}$, RSV 的 $TCID_{50}$ 为 $1 \times 10^{-3}/100 \mu\text{L}$ 。

3.5 化合物对流感病毒 H1N1 的体外抑制作用

流感病毒 H1N1 感染 MDCK 细胞后,导致细胞发生病变,细胞活力明显降低。在安全浓度范围内考察化合物对流感病毒 H1N1 感染 MDCK 细胞的抑制作用,结果显示,随着毛萼香茶菜乙醇提取物浓度递增,其病毒抑制率逐渐上升,在 $5 \mu\text{g/mL}$ 时抑制率已达 60%,表明毛萼香茶菜乙醇提取物对 H1N1 病毒有较好的抑制作用。而化合物 1 和 2 在较低浓度时 ($<30 \mu\text{mol/L}$) 对 H1N1 病毒就表现出较好的抑制作用,化合物 3 和 4 在较高浓度时 ($>200 \mu\text{mol/L}$) 才表现出明显的抑制作用。4 个化

合物对流感病毒 H1N1 的 EC_{50} 分别为 (14.45 ± 4.90)、(24.54 ± 3.82)、(257.0 ± 10.7) 和 (177.8 ± 7.6) $\mu\text{mol/L}$;选择指数 SI 分别为 25.13、32.60、2.19、4.50;阳性药奥司他韦羧酸盐在实验浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$) 下对 H1N1 病毒的抑制率为 (56.74 ± 7.48)%。

3.6 化合物对流感病毒 H3N2 的体外抑制作用

对流感病毒 H1N1 抑制活性较好的化合物 1 和 2,继续考察它们在安全浓度下对流感病毒 H3N2 感染 MDCK 细胞的抑制作用。结果表明,化合物 1 和 2 在实验浓度范围内对 H3N2 病毒的抑制作用不如对 H1N1 病毒的抑制作用,随着实验浓度的增大,其抑制率并没有显著提高。阳性药奥司他韦羧酸盐在实验浓度 ($10 \mu\text{mol/L}$) 下对 H3N2 的抑制率可达 (65.66 ± 4.59)%。

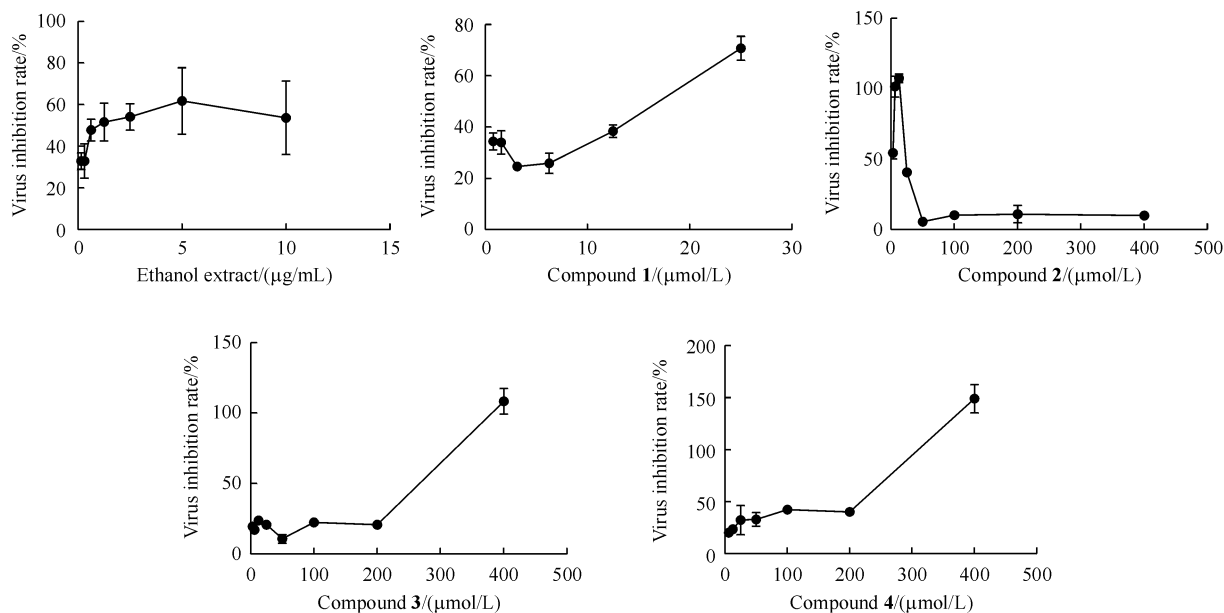


Figure 4 *In vitro* inhibitory effects of ethanol extract of *Isodon eriocalyx* and compounds 1-4 isolated from *Isodon eriocalyx* against influenza H1N1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

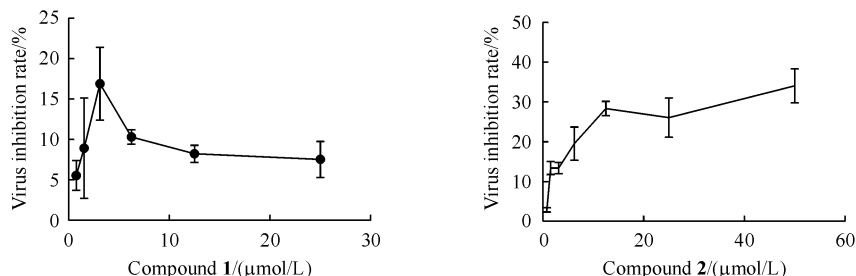


Figure 5 *In vitro* inhibitory effects of compounds 1-2 isolated from *Isodon eriocalyx* against influenza H3N2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 化合物对 RSV 病毒的体外抑制作用

对流感病毒 H1N1 抑制活性较好的化合物 1 和 2,继续考察它们在安全浓度下对 RSV 感染 HeLa 细胞的抑制作用。结果表明,化合物 1 和 2 在实验

浓度范围内对 RSV 的抑制作用也不如对 H1N1 病毒的抑制作用明显,其抑制率基本维持在 40% 以下。阳性药奥司他韦羧酸盐在实验浓度(10 $\mu\text{mol/L}$)下对 RSV 的抑制率为(43.67 \pm 2.44) %。

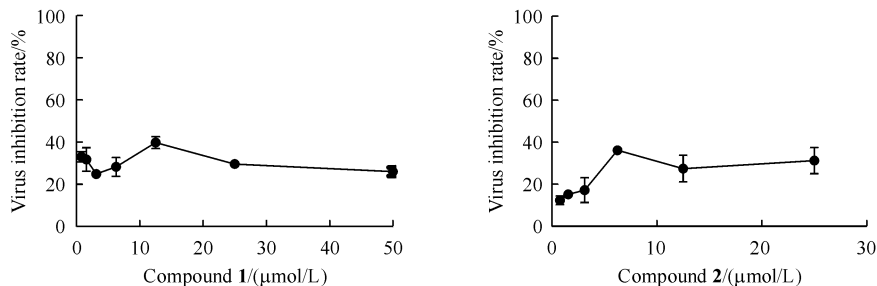


Figure 6 *In vitro* inhibitory effects of compounds 1-2 isolated from *Isodon eriocalyx* against RSV ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨 论

本研究通过色谱分离技术从毛萼香茶菜乙醇

提取物中分离制备了 4 个含量较高的化合物,分别鉴定为 2 个黄酮类成分:8-羟基萘黄素(1)和萘黄素(2),以及 2 个对映-贝壳杉烷二萜类成分:假细

锥甲素(3)和毛萆晶 D(4),并考察了其体外抗病毒活性。结果表明,毛萆香茶菜乙醇提取物及化合物 1~4 对流感病毒 H1N1 均具有一定的抑制作用,两个黄酮类成分的抑制活性更显著,但其对流感病毒 H3N2 和 RSV 的抑制作用则相对较弱。

有研究报道鸡血藤水提物对流感病毒 H1N1 的 EC_{50} 为 $74.5 \mu\text{g/mL}$ ^[9],本研究中毛萆香茶菜乙醇提取物在 $5 \mu\text{g/mL}$ 时对流感病毒 H1N1 的抑制作用已达 60%。但该乙醇提取物样品较低的溶解度导致无法精确计算其 EC_{50} 。以上初步活性测试结果显示,毛萆香茶菜乙醇提取物可能具有较优的抗病毒作用,值得深入探究。

抗病毒是黄酮类成分显著药理活性之一。已有报道木犀草素对流感病毒 H1N1 的 EC_{50} 为 $11.282 \mu\text{g/mL}$ ^[10],黄芩苷对流感病毒 H1N1、H3N2 的 EC_{50} 分别为 43.3 和 $104.9 \mu\text{g/mL}$ ^[11]。而本研究中的 8-羟基黄酮素(1)和黄芩素(2)对流感病毒 H1N1 的 EC_{50} 经单位换算后分别为 4.77 和 $7.71 \mu\text{g/mL}$,显示了优于木犀草素和黄芩苷的抗病毒活性,也与前人报道的黄芩素抗病毒活性结果一致^[12]。此外,在较低浓度下黄芩素(2)就显示了较好的抑制 H1N1 病毒活性,浓度递增后其抑制作用反而降低,而这两个黄酮对 H3N2 和 RSV 的抑制作用均不如对 H1N1 的抑制作用,推测这可能与化合物结构以及抗病毒作用机制有关。

研究发现 D 环上含有 α,β -不饱和酮结构的对映-贝壳杉烷二萜具有显著的抗肿瘤和抗菌等活性^[13],但其是否具有有良好的抗病毒活性并未见报道。本研究获得的 2 个对映-贝壳杉烷二萜没有显示出类似于 8-羟基黄酮素(1)和黄芩素(2)的明显抗病毒活性,可能与该结构的取代基有关。由于药材产地的不同,本文研究暂未获得 D 环上含 α,β -不饱和酮结构的二萜,毛萆香茶菜中二萜类成分的抗病毒活性仍需继续深入研究。

综上,本研究初步证实毛萆香茶菜乙醇提取物、8-羟基黄酮素(1)、黄芩素(2)对流感病毒 H1N1 具有显著的抑制作用,但该类成分还需要更

广谱的抗病毒活性评价和进一步的机制研究。同时也有必要对不同产地毛萆香茶菜、不同结构类型的对映-贝壳杉烷二萜开展抗病毒活性筛选,以期明确该植物的抗病毒活性及其药效物质基础,为毛萆香茶菜临床治疗呼吸道感染提供科学的依据。

参考文献

- [1] Editorial Board of the Flora of China. *Flora of China* (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1977, 66(2): 439.
- [2] Yunnan Institute of Materia Medica. *Illustrated Handbook for Medicinal Materials from Nature in Yunnan* (云南天然药物图鉴) [M]. Yunnan Science and Technology Press, 2007, 4: 104.
- [3] Wang J, Lin ZW, Sun HD. Flavonoids from *Isodon eriocalyx* [J]. *Nat Prod Sci*, 1998, 4(1): 38–41.
- [4] Li XN, Pu JX, Du X, et al. Structure and cytotoxicity of diterpenoids from *Isodon eriocalyx* [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(11): 1803–1809.
- [5] Tao C, Li QJ, Ye LH, et al. Diterpenoids from *Isodon eriocalyx* in Guizhou [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 26–30.
- [6] Ye LH, Yang XS, Ma L, et al. Non-diterpenoid constituents from *Isodon eriocalyx* in Guizhou Province [J]. *China Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(8): 571–573.
- [7] Wang J, Lin ZW, Zhao QS, et al. Diterpenoids from *Isodon eriocalyx* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(2): 307–309.
- [8] Wang J, Lin ZW, Shingu T, et al. Four new compounds from *Isodon eriocalyx* [J]. *Nat Prod Sci*, 1997, 4(3): 143–147.
- [9] Pang J, Guo JP, Jin M, et al. Anti-influenza virus effects of aqueous extract from *Spatholobus suberectus* [J]. *Chin J Health Lab Tec* (中国卫生检验杂志), 2015, 25(4): 488–490.
- [10] Deng DY, Gu LG, Liu XT, et al. Intervention effect of luteolin on A549 infected by H1N1 *in vitro* [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2017, 23(3): 11–14.
- [11] Ding Y, Dou J, Teng Z, et al. Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3269–3278.
- [12] The Xinjiang Institute of Materia Medica. The application of cirsimaritin in the preparation antiviral drugs: CN, 106491583A [P]. 2017-03-15 [2018-04-12].
- [13] Liu M, Wang WG, Sun HD, et al. Diterpenoids from *Isodon* species: an update [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34(9): 1090–1140.