

文章编号:2095-0411(2016)06-0023-05

## 人参二醇的微生物转化及抗 HSC-T6 细胞活性研究

朱梦月,雷 静,周 垚,戴秋阳,朱腊梅,陈广通  
(南通大学 药学院,江苏 南通 226001)

**摘要:**研究了 20(R)-人参二醇衍生物转化及其抗 HSC-T6 细胞活性。利用微生物刺囊毛霉 *Mucorspinosus* AS 3.3450 对 20(R)-人参二醇进行转化,采用硅胶柱色谱、制备型高效液相色谱技术分离、纯化产物,并通过波谱数据分析确认了产物结构。采用噻唑蓝 (MTT)法测试产物抗 HSC-T6 肝星状细胞活性。共分离鉴定出了 5 个化合物:3-羰基-20(R)-人参二醇(1),3-羰基-7 $\beta$ , 24 $\alpha$ -二羟基-20(R)-人参二醇(2),3-羰基-7 $\beta$ , 24 $\beta$ -二羟基-20(R)-人参二醇(3),3-羰基-15 $\alpha$ , 24 $\alpha$ -二羟基-20(R)-人参二醇(4),3-羰基-15 $\alpha$ , 24 $\beta$ -二羟基-20(R)-人参二醇(5)。MTT 结果显示,化合物 1~3 抑制 HSC-T6 细胞增值的作用强于 20(R)-人参二醇。

**关键词:**人参二醇;微生物转化;HSC-T6 细胞;抗肝纤维化

中图分类号:R 284.1

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2016.06.005

## Microbial Transformation of 20(R)-Panaxadiol and Their Activity Against HSC-T6 Cells

ZHU Mengyue, LEI Jing, ZHOU Yao, DAI Qiuyang, ZHU Lamei, CHEN Guangtong  
(School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China)

**Abstract:** To investigate the derivatives of 20(R)-panaxadiol and their activities against HSC-T6 cells, 20(R)-panaxadiol was treated by *Mucorspinosus* AS 3.3450. All products were isolated by silica gel chromatography and purified by preparative HPLC. On the basis of spectral data, structures were elucidated. The activity against HSC-T6 cells was measured by MTT method. Five biotransformation products were obtained and identified as 3-oxo-20(R)-panaxadiol (1), 3-oxo-7 $\beta$ , 24 $\alpha$ -dihydroyl-20(R)-panaxadiol (2), 3-oxo-7 $\beta$ , 24 $\beta$ -dihydroyl-20(R)-panaxadiol (3), 3-oxo-15 $\alpha$ , 24 $\alpha$ -dihydroyl-20(R)-panaxadiol (4), 3-oxo-15 $\alpha$ , 24 $\beta$ -dihydroyl-20(R)-panaxadiol (5). MTT assay revealed that compounds 1—3 showed higher inhibitory activity against HSC-T6 cells than 20(R)-panaxadiol.

**Key words:** 20(R)-panaxadiol; microbial transformation; HSC-T6; anti-liver fibrotic

三七 *Panaxnotoginseng* (Burk.) F. H. Chen 是我国特有的一种名贵中药材,具有广泛药理作用及临床用途<sup>[1-2]</sup>。近年来,针对三七中主要活性成分人参皂苷的研究发现,总皂苷具有显著的抗肝纤维化作用,主要表现在可促进肝细胞再生,抑制炎症反应,抑制 HSCs 的活化并促进其凋亡,增强胶原酶和

基质金属蛋白酶的活性,抑制胶原合成,促进胶原降解,调节免疫反应等<sup>[3-4]</sup>。20(R)-人参二醇(PD)是人参皂苷的酸水解产物,是人参皂苷的重要苷元之一<sup>[5]</sup>。药理学研究表明,20(R)-人参二醇具有很强的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>,同时能增强 5-氟尿嘧啶的抗肿瘤疗效<sup>[7-8]</sup>。但是关于该类型化合物的抗肝纤维化活

收稿日期:2016-05-28。

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201610304075Y);南通市科技项目(MS12015044)。

作者简介:朱梦月(1994—),女,江苏连云港人,本科生。通讯联系人:陈广通(1981—),E-mail:guangtong\_chen@ntu.edu.cn

性文献报道较少。为更好地研究该类型化合物的抗肝纤维化作用及其构效关系,对 20(R)-人参二醇进行了系统的生物转化研究并制备出一定的转化产物用于活性评价,为达玛烷型三萜类化合物的开发利用提供可靠的实验依据。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂与仪器

20(R)-人参二醇(上海同田生物技术有限公司),HPLC 检测纯度均大于 98%;土豆(市售);硅胶薄层板 GF<sub>254</sub>(青岛邦凯分离材料有限公司);硅胶 G(200~300 目)购自青岛裕民源硅胶试剂厂;二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯为分析纯,高效液相色谱用乙腈为色谱纯;MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(碧云天生物技术研究)、RPM I 1640 培养基(Gibco BRL);Rnase A、胎牛血清、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶(上海生物工程有限公司)。

Bruker AM-500 核磁共振波谱仪;高分辨质谱仪 HRMS (Finnigan LCQ<sup>DECA</sup>);超净工作台(上海精密仪器仪表有限公司);恒温培养摇床(天津欧诺仪器股份有限公司);EYELA OSB-2100 旋转蒸发器;HPLC 仪 (SPD-20A 检测器,LC-20AT 泵),YMC-Pack OSD-A 反相色谱柱(12.0mm × 250mm,5μm)(日本岛津);CO<sub>2</sub> 培养箱 (Jouan IGO150);酶标仪 (Bio-TEK ELx800);荧光倒置显微镜(Olympus IX51)。

### 1.2 主要实验方法

#### 1.2.1 微生物转化菌株筛选

从固体斜面培养基中将菌丝接种到 250mL 的三角锥形瓶中(内含有 100mL PDA 培养基)。将锥形瓶置于摇床上在 26℃、160r/min 的条件下培养 1d(具体的培养时间视菌体的生长情况而定,直至瓶底长满菌体),取出锥形瓶,每个瓶内加入 0.2mL (2mg)的底物(PD,无水乙醇溶解),继续于摇床上培养一周。培养完成后,过滤发酵液,滤液以等体积的乙酸乙酯萃取 3~4 次,合并滤液,浓缩减压蒸干,用甲醇溶解,经 0.45μm 微孔滤膜过滤,以 HPLC 分析检测。每组实验各设置两个空白对照,其中一个接入菌种但是不加任何底物,只加入等体积的无水乙醇,另一个是不接微生物仅加入底物,空白对照和实验组平行培养,平行处理。

#### 1.2.2 制备型微生物转化

将菌丝从固体斜面培养基接种至 2 个 250mL 的三角锥形瓶中(内含有 100mL PDA 培养基),置于 26℃、160r/min 摇床上培养 1d。用无菌的移液管分别往 20 个 1 000mL 的三角锥形瓶中(内装有 400mL 培养液)加入 1mL 菌液,继续培养 1~2d,向瓶内加入 1mL(25mg)底物(PD,无水乙醇溶解),继续培养 7d。培养完成后,过滤发酵液,菌体残渣用甲醇超声溶解,与滤液合并,滤液以等体积的乙酸乙酯萃取 3~4 次,合并萃取液,浓缩减压蒸干,得残渣。

#### 1.2.3 转化产物分离纯化

用甲醇溶解转化产物残渣,以 200~300 目硅胶拌样装柱,经 C-18 硅胶柱色谱甲醇-水梯度洗脱,得到流份 I~III。流份 I 经制备型高效液相色谱,V(乙腈):V(水)=35:65 洗脱得到化合物 1(43.8mg),化合物 2(14.1mg);流份 II 经制备型高效液相色谱,V(乙腈):V(水)=30:70 洗脱得到化合物 3(24.3mg),化合物 4(12.6mg);流份 III 经制备型高效液相色谱,V(乙腈):V(水)=25:75 洗脱得到化合物 5(17.5mg)。结构式见图 1。

#### 1.2.4 活性测试

采用 MTT 法测定各受试化合物对 HSC-T6 细胞株的半数抑制率 IC<sub>50</sub>;取对数生长期的 HSC-T6 细胞,用含 1%DMEM 培养液调整细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL,接种于 96 孔培养板,药物处理组和细胞对照组加入每孔 100μL 细胞悬液,每组设 3 个复孔,空白对照组只加入全培养基,每孔 100μL,设 3 个复孔。将 96 孔培养板置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h 后,加入不同浓度的受试样品,使终浓度为 0.1~100μmol/L,继续培养 72h。按 MTT 法于酶标仪,测定 450nm 的吸光度(A),计算抑制率[抑制率=(1-A<sub>实验组</sub>/A<sub>对照组</sub>) × 100%]。实验重复 3 次。应用 SPSS 11.5 软件作回归方程,计算各受试样品对 HSC-T6 细胞作用 72h 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结构鉴定

化合物 1,无色粉末(甲醇),熔点 288~289℃,HRMS 显示其准分子离子峰 [M+Na]<sup>+</sup> 为 *m/z* 481.366 0,由此推测分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>。其<sup>13</sup>CNMR 和无畸变极化转移增益(DEPT)与底物相比较,发现

在  $\delta$  217.6 处多出一个羰基碳信号,提示该化合物为 20 (R)-人参二醇的羟基氧化产物。经与文献数据比

对,确定化合物 **1** 为 3-羰基-20 (R)-人参二醇,其  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR 数据如表 1 和表 2 所示。

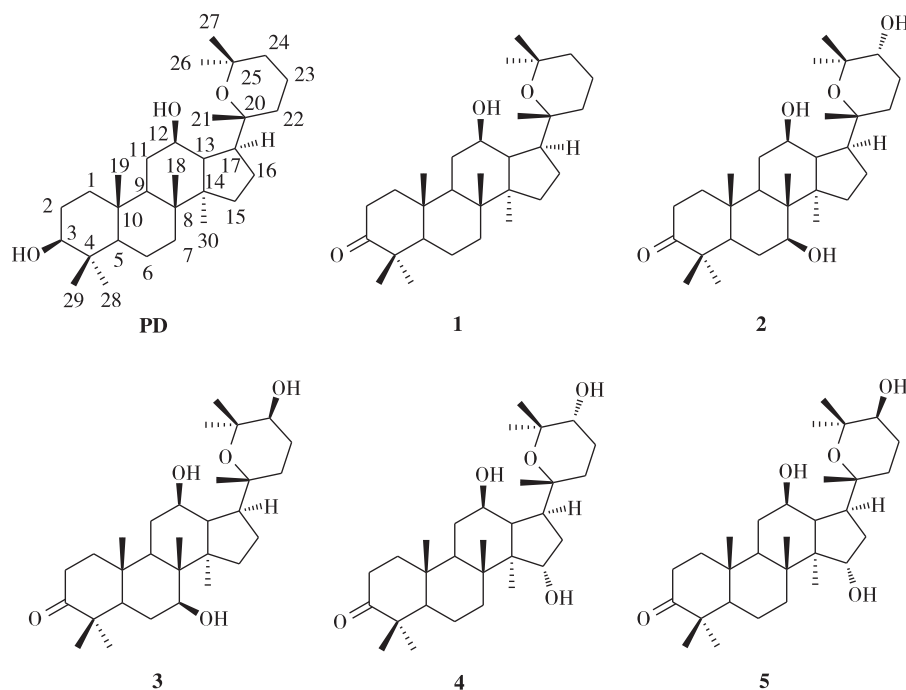


图 1 20(R)-人参二醇及其代谢产物 1~5 的结构式

Fig.1 Structures of 20(R)-panaxadiol and compounds 1-5

化合物 **2**,无色粉末(甲醇),熔点  $312\sim 313^\circ\text{C}$ , HRMS 显示其准分子离子峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  为  $m/z$  513.3558,由此推测分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ 。 $^{13}\text{C}$  NMR 和 DEPT 谱中可观察到一个  $\delta$  217.2 的羰基碳信号,同时在  $\delta$  74.3 和  $\delta$  69.6 处新出现 2 个连氧碳信号,提示该化合物是 20 (R)-人参二醇的羟基化以及氧化衍生物。氢核检测的异核多键相关 (HMBC) 谱中,羰基碳信号  $\delta$  217.2 与  $\delta$  1.09 (H-28), 1.05 (H-29), 1.48 (H-5) 有相关,提示 C-3 位是羰基; $\delta$  3.87 (H-7) 与  $\delta$  29.4 (C-6), 9.5 (C-18) 相关,说明其中一个羟基连在 C-7 位上; $\delta$  3.54 (H-24) 与  $\delta$  27.3 (C-26), 27.4 (C-27), 76.9 (C-25) 关联,提示另一个羟基位于 C-24 位上。此外,ROESY 谱中 H-7 ( $\delta$  3.87) 与 H-30 ( $\delta$  0.97) 相关联,因此 7-OH 为  $\beta$ -OH; H-24 ( $\delta$  3.54) 与 H-27 ( $\delta$  1.27) 相关,指示 24-OH 为  $\alpha$ -OH。综合上述分析确定化合物 **2** 为 3-羰基-7 $\beta$ , 24 $\alpha$ -二羟基-20 (R)-人参二醇,其  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 数据如表 1 和表 2 所示。

化合物 **3**,无色粉末(甲醇),熔点  $334\sim 336^\circ\text{C}$ , HRMS 显示其准分子离子峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  为  $m/z$  513.3554,由此推测分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ 。与底物比较,该化合物  $^{13}\text{C}$  NMR 和 DEPT 谱可观察到一个

羰基碳信号  $\delta$  217.3 及  $\delta$  74.3 和  $\delta$  74.6 处新出现的 2 个连氧碳信号,所以该化合物是 20 (R)-人参二醇的羟基化以及氧化衍生物,与化合物 **2** 类似。HMBC 谱中,羰基碳信号  $\delta$  217.3 与  $\delta$  1.09 (H-28), 1.05 (H-29), 1.49 (H-5) 相互关联,说明 C-3 位是羰基; $\delta$  3.87 (H-7) 与  $\delta$  29.4 (C-6), 9.5 (C-18) 关联,提示其中一个羟基连在 C-7 位上; $\delta$  3.45 (H-24) 与  $\delta$  29.6 (C-26), 21.2 (C-27), 77.2 (C-25) 关联,所以另一个羟基位于 C-24 位上。此外,ROESY 谱中 H-7 ( $\delta$  3.87) 与 H-30 ( $\delta$  0.97) 相关联,因此 7-OH 为  $\beta$ -OH; H-24 ( $\delta$  3.45) 与 H-26 ( $\delta$  1.29) 相关,指示 24-OH 为  $\beta$ -OH。综上所述,确定化合物 **3** 为 3-羰基-7 $\beta$ , 24 $\beta$ -二羟基-20 (R)-人参二醇,其  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR 数据如表 1 和表 2 所示。

化合物 **4**,无色粉末(甲醇),熔点  $285\sim 287^\circ\text{C}$ , HRMS 显示其准分子离子峰  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  为  $m/z$  513.3560,由此推测分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ 。与底物的碳谱数据比较,在  $\delta$  217.8 处多了一个羰基碳信号, $\delta$  72.9 和  $\delta$  69.5 处分别多了两个连氧碳信号,以上信息表明化合物 **4** 是 20 (R)-人参二醇的羟基化以及氧化衍生物。HMBC 谱中,羰基碳信号  $\delta$  217.8 与  $\delta$  1.10 (H-28), 1.06 (H-29), 1.42 (H-

5)相互关联,因此 C-3 位是羰基;新的连氧碳信号  $\delta$  72.9 与  $\delta$  1.00 (H-30)相关联, $\delta$  69.5 与 1.28 (H-26)和 1.33 (H-27)相关,所以 C-15 和 C-24 位均连有羟基;ROESY 谱中  $\delta$  4.16 (H-15)与  $\delta$  1.13 (H-18)相关,因此 15-OH 为  $\alpha$ -OH, $\delta$  3.52 (H-24)与  $\delta$  1.33 (H-27)相关,因而 24-OH 为  $\alpha$ -OH。综上,确定化合物 4 为 3-羰基-15 $\alpha$ , 24 $\alpha$ -二羟基-20 (R)-人参二醇,其<sup>1</sup>H NMR,<sup>13</sup>C NMR数据如表 1 和表 2 所示。

化合物 5,无色粉末(甲醇),熔点 311~314℃,HRMS 显示其准分子离子峰  $[M+Na]^+$  为  $m/z$  513.355 3,由此推测分子式为 C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub>。从<sup>13</sup>C NMR 以及 DEPT 谱图中可以看出,与 20 (R)-人参二醇相比  $\delta$  217.7 处多出一个羰基碳信号, $\delta$  72.9

和  $\delta$  74.6 处新出现 2 个连氧碳信号,所以该化合物是 20 (R)-人参二醇的羟基化以及氧化衍生物。HMBC 谱中,羰基碳信号  $\delta$  217.7 与  $\delta$  1.08 (H-28), 1.04 (H-29), 1.39 (H-5)相互关联,因此 C-3 位是羰基; $\delta$  72.9 与  $\delta$  0.97 (H-30)关联指示其中一个羟基连在 C-15 位上; $\delta$  3.43 (H-24)与  $\delta$  29.5 (C-26), 21.1 (C-27), 77.2 (C-25)关联,所以另一个羟基位于 C-24 位上。另外,ROESY 谱中 H-15 ( $\delta$  4.14)与 H-18 ( $\delta$  1.10)相关联,因此 15-OH 为  $\alpha$ -OH;H-24 ( $\delta$  3.43)与 H-26 ( $\delta$  1.29)相关,指示 24-OH 为  $\beta$ -OH。综上,确定化合物 5 为 3-羰基-15 $\alpha$ , 24 $\beta$ -二羟基-20 (R)-人参二醇,其<sup>1</sup>H NMR,<sup>13</sup>C NMR 数据如表 1 和表 2 所示。

表 1 化合物 1~5 氢谱数据(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)Table 1 <sup>1</sup>H NMR spectroscopic data of metabolites 1–5 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No.	1	2	3	4	5
1	1.92, 1.46 m	1.94, 1.44 m	1.96, 1.44 m	1.98, 1.49 m	1.96, 1.45 m
2	2.47 m	2.47 m	2.48 m	2.47 m	2.45 m
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	1.41 m	1.48 m	1.49 m	1.42 m	1.39 m
6	1.60 m	1.64 m	1.64 m	1.52 m	1.49, 1.60 m
7	1.62 m	3.82 m	3.82 m	1.63 m	1.59 m
8	—	—	—	—	—
9	1.49 m	1.63 m	1.63 m	1.52 m	1.50 m
10	—	—	—	—	—
11	1.89 m	1.88 m	1.39, 1.90 m	1.29, 1.91 m	1.89 m
12	3.51 m	3.49 m	3.53 m	3.66 m	3.62 m
13	1.44 m	1.43 m	1.44 m	1.71 m	1.68 m
14	—	—	—	—	—
15	1.72, 1.32 m	1.72, 1.32 m	1.72, 1.33 m	4.16 m	4.14 m
16	1.23 m	1.24 m	1.24, 1.86 m	1.65 m	1.64 m
17	1.98 m	1.99 m	1.89 m	2.10 m	1.96 m
18	1.01 s	1.01 s	1.02 s	1.13 s	1.10 s
19	0.98 s	0.97 s	0.96 s	1.00 s	1.00 s
20	—	—	—	—	—
21	1.21 s	1.22 s	1.21 s	1.25 s	1.21 s
22	1.40 m	1.43 m	1.74 m	1.45, 1.68 m	1.46, 1.69 m
23	1.38 m	1.31 m	1.76 m	1.77, 2.12 m	1.76 m
24	1.35 m	3.54 m	3.45 m	3.52 m	3.43 m
25	—	—	—	—	—
26	1.28 s	1.33 s	1.29 s	1.28 s	1.29 s
27	1.24 s	1.27 s	1.27 s	1.33 s	1.27 s
28	1.22 s	1.09 s	1.09 s	1.10 s	1.08 s
29	1.01 s	1.05 s	1.05 s	1.06 s	1.04 s
30	0.96 s	0.97 s	0.97 s	1.00 s	0.97 s

表 2 化合物 1~5 碳谱数据(125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Table 2 <sup>13</sup>C NMR spectroscopic data of metabolites 1–5 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

No.	1	2	3	4	5	No.	1	2	3	4	5
1	39.7	39.3	39.3	39.8	39.8	16	25.1	25.5	25.8	35.0	25.1
2	34.0	33.9	33.9	34.1	34.1	17	54.6	53.3	53.3	52.0	52.0
3	217.6	217.2	217.3	217.8	217.7	18	15.9	9.5	9.5	15.4	15.4
4	47.2	45.2	45.2	47.3	47.3	19	16.9	15.9	15.9	16.1	16.1
5	55.2	52.7	52.7	55.0	55.0	20	76.6	75.7	76.7	76.0	76.1
6	19.6	29.4	29.4	19.6	19.6	21	20.9	19.8	19.2	20.0	19.3
7	34.1	74.3	74.3	34.9	34.9	22	35.7	28.7	36.4	28.6	36.3
8	39.6	47.0	47.0	40.2	40.2	23	16.2	23.2	25.2	23.1	25.1
9	49.2	50.0	50.0	49.2	49.3	24	36.4	69.6	74.6	69.5	74.6
10	36.7	36.6	36.6	36.8	36.8	25	73.0	76.9	77.2	76.5	77.2
11	30.9	30.7	30.7	30.8	30.8	26	32.9	27.3	29.6	27.1	29.5
12	69.7	69.4	69.4	69.4	69.4	27	26.7	27.4	21.2	27.3	21.1
13	49.1	48.7	48.7	47.5	47.4	28	27.1	26.8	26.8	26.7	26.6
14	51.1	50.9	50.9	51.9	51.9	29	19.4	21.0	21.0	21.0	21.0
15	31.1	34.4	34.4	72.9	72.9	30	15.3	16.8	16.8	10.0	10.0

2.2 抑制 HSC-T6 细胞增殖作用

用 MTT 法测试底物和转化产物抑制 HSC-T6 肝星状细胞增殖的作用,测试结果见表 3,化合物 1~3 的抑制作用明显强于底物 20(R)-人参二醇。

表 3 HSC-T6 细胞抑制实验结果	
Table 3 Inhibition against HSC-T6 cells	
化合物	c(IC <sub>50</sub> )/(μmol/L)
秋水仙碱	0.15
PD	11.3
1	3.4
2	5.2
3	2.3
4	13.2
5	24.6

3 结 论

利用微生物转化的方法能简便的获得系列人参二醇衍生物。刺囊毛霉 *Mucor spinosus* AS 3.3450 对 20(R)-人参二醇的结构修饰主要是羟基化反应,包括 7β-OH,15α-OH,24α-OH,24β-OH 及 3 位氧化反应。体外抗肝纤维化活性实验结果表明,转化产物对 HSC-T6 细胞的增殖均有一定的抑制作用,其中化合物 1~3 较 20(R)-人参二醇更强。

参考文献:

[1]于秀娟,张景洪.三七的药理作用分析及真伪鉴别[J].中

国实用医药,2013,8(19): 249-251.

[2]马丽焱,肖培根.三七总皂苷对脑细胞内游离钙浓度的影响[J]. 中国药学杂志,1998,33(8): 467-469.

[3] GENG J W, PENG W, HUANG Y G, et al. Ginsenoside-Rg<sub>1</sub> form *Panaxnotoginseng* prevents hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats [J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 634: 162-169.

[4] PENG X D, DAI L L, HUANG C Q,et al. Relationship between anti-fibrotic effect of *Panaxnotoginseng*saponins and serum cytokines in rat hepatic fibrosis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 388: 31-34.

[5]WEI Y, MA C M, HATTORI M. Anti-HIV protease triterpenoids from the acid hydrolysate of *Panax ginseng* [J]. PhytochemistryLetters, 2009, 2 (2): 63-66.

[6] JIN Y H, CHOI J, SHIN S,et al. Panaxadiol selectively inhibits cyclin A-associated Cdk2 activity by elevating p21(WAF1/CIP1) protein levels in mammalian cells[J]. Carcinogenesis, 2003, 24 (11): 1767-1772.

[7] LI H, YE M, GUO H Z, et al.Biotransformation of 20 (S)-protopanaxadiol by *Mucor spinosus* [J]. Phytochemistry, 2009, 70: 1416-1420.

[8] LI X L, WANG C Z, MEHENDALE S R, et al.Panaxadiol, a purified ginseng component, enhances the anti-cancer effects of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64: 1097-1104.

(责任编辑:殷丽莉)