

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

印度紫檀抗癌活性成分之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-041-011-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學化妝品應用與管理系

計畫主持人：廖志中

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告

期中進度報告

印度紫檀抗癌活性成分之研究

The study of Anticancer components from *Pterocarpus indicus* wild

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B -041 -011-

執行期間： 94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

計畫主持人：廖志中

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

(二) 中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

94 年度執行國科會計畫印度紫檀之抗癌活性成分之研究乙題，本實驗室已分離出近二十五個化合物，其中包括六個三萜類化合物 - lupeol、betulinic acid、betulin、betulin-3-caffeoate、friedelin 及 3β -friedelinol；一個醣類化合物-sucrose；6 個固醇類化合物- β -sitosterol、stigmasterol、 β -sitosteryl-3-O- β -D-glucoside、 β -sigmasteryl-3-O- β -D- glucoside、 β -sitosterone 及 stigmasterone；1 個沒食子酸類衍生物- 3,4,5-trihydroxy-benzaldehyde；以及十一個異黃酮類化合物 - maackiain、pterocarpine、homopterocarpin、angolensin、3-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)propan-1-one、medicarpin、secundiflorol I、liquiritigenin、4'-methoxyl-7-hydroxyl-2,3-dihydroisoflavone、PI-S24-4 以及 PI-S33-2。其中 pterocarpine 異黃酮類化合物為文獻所記載之紫檀主要活性成分，而 3-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-(4-methoxy-phenyl)propan-1-one、Afromosin 以及 PI-S33-2 為首次自天然資源中分離出之化合物。此外，除 pterocarpine 與 angolensin 外，其他皆為自此種植物中首次分離獲得的；此外，在經雌激素基因轉殖植物篩選測試，maackiain (1)，medicarpin (7)，liquiritigenin (9) 顯示具有類雌激素之作用。其他相關之活性作用正在進一步測試中。

Abstract:

Based on the screening data of the extracts from Formosan plants and folk medicine by National Research Program, *Pterocarpus indicus* Willd. was found to be active toward cancer disease. The preliminary bioassay indicated that the methanol extract of the bark of *P. indicus* exhibited 52% inhibitory activity against ovarian cancer cells, Hela cells, at the concentration of 50 μ g/mL. In this year, a series of natural-occurring compounds, including 11 isoflavanoid compounds, 6 triterpenoids, and 6 steroids, were isolated and purified from the bark extract of this plant by column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of all isolates were elucidated and characterized by spectral methods. Among them, compound 1 was isolated from the natural sources for the first time. Except for pterocarpine and angolensin, others were isolated from this plant fro the first time. In addition, maackiain (1), medicarpin (7), liquiritigenin (9) showed estrogen-like activity by the pER8-GFP reporter assay. Other bioactivities of these isolates are under investigation.

關鍵詞(keywords)

Pterocarpus indicus, maackiain, medicarpin, liquiritigenin, pER8-GFP Reporter Assay, estrogen-like activity.

(三)報告內容：請包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）…等。若該計畫已有論文發表者，可以 A4 紙影印，作為成果報告內容或附錄，並請註明發表刊物名稱、卷期及出版日期。若有與執行本計畫相關之著作、專利、技術報告、或學生畢業論文等，請在參考文獻內註明之，俾可供進一步查考。

前言

印度紫檀為紫檀屬植物，為高大的落葉喬木，分佈於熱帶。由於心材紅棕色，故又泛稱為紅木，傳統上使用其作為建材。中醫藥學將之應用作為輔助治療、保健用途等，如沉香、檀香、降香、以及花梨紫檀香。其中，藏藥「紫檀香」即以豆科植物青龍木的乾燥心材，經煎膏炮製後，主治清血熱，消氣血不和。用於熱血入分，惡血瘀陰、風血交雜症。外塗消肢節腫脹之功效。用於心熱盛，血熱病，關節腫痛，胸悶，呼吸困難。此青龍木經大陸學者考證推測為印度紫檀(*Pterocarpus indicus* wild.)。

藏藥的歷史淵源源自於漢唐時代的中醫藥學與印度醫學。近年來，常見傳統印度醫學或中醫藥學所使用的藥物作為化學家、生藥學家以及天然物化學家的研究題材。在 2000 年，Grover, J.K. 曾發表一篇關於 45 種印度傳統藥用植物及其活性萃取物之研究綜述，並指出包含紫檀屬植物-囊狀紫檀 (*P. marsupium*) 等 45 種印度植物具有臨床治療糖尿病之活性。進一步的實驗結果顯示此種紫檀亦具有降血脂 (hypoglycemic and anti-hyperglycemic) 活性。¹ 此外，印度學者篩選十種印度草藥後指出囊狀紫檀 (*P. marsupium*) 等草藥對於治療第二型糖尿病亦有明顯療效。² 相關文獻曾報導紫檀屬植物具有抗白內障以及治療瘡傷的活性。³ 安哥拉紫檀 (*P. angolensis*) 之水層及甲醇抽取物經活性測試後發現其對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、化膿性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 以及綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等細菌具有明顯抑制生長的活性。⁴ 因此紫檀屬植物實已應用於這些傳統醫學之中，作為治療人類疾病的藥物；因此，實有必要進一步釐清印度紫檀的活性作用成分。

研究目的

在初步細胞毒殺試驗的篩選數據顯示印度紫檀皮部的甲醇粗萃物在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 對子宮頸癌細胞株 (HeLa cells) 顯現 52.0 % 的抑制活性能力。經水-氯仿分層後，其水層萃取物與氯仿層萃取液在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度時分別顯示 58.6 % 與 53.6 % 之抑制活性。本實驗室因而對此植物之化學成分與其抗癌活性效果進行研究。

同時，雖然有些文獻將紫檀屬藥用植物青龍木定為印度紫檀 *P. indicu*,⁵ 如中藥大辭典中記載中藥材-紫檀香基原為印度紫檀，然而其藥理作用卻僅記載其他紫檀屬植物-檀香紫檀 *P. santalinus*，且亦有文獻指出，大陸學者曾論証紫檀香的來源應為檀香紫檀 *P. santalinus* 的心材，而非印度紫檀。⁶ 因此對此部分的爭議仍須研究釐清。且此兩種植物分類同屬，這兩種植物的心材是否因此含有相同或相似的化學成分，可否同作藥用與芳香療法之來源？何者為優？為了澄清紫檀香的藥用基原，亦需進一步的研究。另外，由於印度紫檀與囊狀紫檀屬於同屬植物，相關萃取物與純化合物之降血脂活性亦將被探討。

文獻探討

文獻檢索指出，印度紫檀皮部含有鞣質化合物 (procyanidin-type tannins)，在高聚

合情形下具有蛋白質合成酶抑制作用 (protease inhibitory) 以及抗病毒活性 (antiviral activities)。此類化合物對 plasmin、plasminogen、thrombin、trypsin、pepsin 以及 papain 之 proteases 抑制活性之 ED₅₀ (g/mL) 分別為 1.0-3.0, 3.0-6.8, <0.1-2.0, 4.1-13, 7->100, 和 20.5-64。⁷

此外，印度紫檀之根、莖、葉分別以石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇以及甲醇，依序萃取，其抽取物皆顯示具有抗菌活性，特別是正丁醇層以及甲醇層。⁸ 新幾內亞學者亦發現此植物之心材甲醇萃取物具有抗 *Tyromyces palustris* 和 *Coriolus versicolor* 等真菌之活性。其乙醚萃取物則具有更佳之活性 (在 0.05% 濃度下可完全抑制 *T. palustris* 的生長)。自此乙醚萃取物進一步分離獲得一白色固體 angolensin。⁹ 日本研究者亦曾在 1972 與 1983 年分別發現印度紫檀莖部之冷水抽出物與甲醇粗萃物皆具有抗癌活性，並進一步指出甲醇粗萃物含有大量酚類衍生物。^{10,11} 然而，這些研究皆缺乏進一步分離純化等資料進行再驗證。

如前所述，我們查閱了舊有之典籍、Chemical Abstract、Beilstein Crossfire 及 Medline 等資料庫，而在國外相關研究方面，則有印度學者及大陸學者投入紫檀屬植物之相關研究。經 MDL Crossfire 資料庫檢索顯示自紫檀屬植物已有 90 個化合物分離獲得；包含有黃酮類化合物 (aurone glycosides)，其中僅 5 個化合物分離獲得自印度紫檀，分別為 7-hydroxy-4'-methoxy-isoflavone、2-(3-hydroxy-2,4-dimethoxy-phenyl)-benzofuran-6-ol、4,2',4'-trihydroxychalcone、¹² angolensin、^{9,12} Pterocarpin；¹³ 此 5 種化合物皆為黃酮類化合物。而有關台灣學者對此屬植物之研究，則尚未在國際期刊中發現。

研究方法

(A) 本計畫採用之研究實驗儀器。

Optical rotations were measured on a JASCO DIP-370 digital polarimeter. CD spectra were measured on a JASCO J-720 spectropolarimeter. The IR spectra were measured on a Hitachi 260-30 spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectra (all in CDCl₃) were recorded with Varian Unity 500 NMR (KMU) spectrometers, using TMS as internal standard. LRFABMS and LREIMS were obtained with a Jeol JMS-SX/SX 102A mass spectrometer or a Quattro GC/MS spectrometer having a direct inlet system. Si gel 60 (Macherey-Nagel, 230-400 mesh) was used for column chromatography; precoated Si gel plates (Macherey-Nagel, SIL G-25 UV254, 0.25 mm) were used for analytical TLC. The spots were detected by spraying with 30% H₂SO₄ aqueous solution and then heating on a hot plate. HPLC was performed on a Hitachi L-2130 apparatus equipped with a Hitachi L-2420 UV-VIS detector. Discovery® HS C-18 (250 x 4 mm i.d.) and semi-preparative HS C-18 (250 x 10 mm i.d.) 5μm columns were used for analytical and preparative purposes, respectively.

(B)植物材料獲取

The stem and bark of *P. indicu* were collected from Kaohsiung City, Taiwan, in August 2004. Voucher specimen (Pterocarpus-01) was deposited in the Graduate Institute of Natural Products, Kaohsiung, Taiwan, Republic of China.

(C)植物成分之研究

將前述所取得材料以甲醇所得之萃取物以正己烷 (n-hexane) 與水振盪分配

之，得正己烷層，並將正己烷層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以氯仿振盪分配之，得氯仿層，並將氯仿層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 振盪分配之，得乙酸乙酯層，並將乙酸乙酯層減壓濃縮抽乾稱重。水層部分再以正丁醇 (n-butanol) 振盪分配之，得正丁醇層，並將正丁醇層減壓濃縮抽乾稱重。由以上之處理，可得到正己烷層、氯仿層、乙酸乙酯層、正丁醇層、水層，並分別進行生物活性試驗，如細胞毒性試驗 (MTT assay) 以及雌激素基因轉殖植物表現試驗(pER8-GFP Reporter Assay)，以活性導引分離法 (Bioactivity guided fractionation method) 進行研究。結果顯示乙酸乙酯層為最有效之分層，進而進行此劃分之細部分離；以 celite 450 為固定相，MeOH、EtOAc、n-Hexane 等溶媒為移動相，進行該分層第一次的劃分 (fractions) 之進行成分分離，並依 TLC 結果進行合併，共獲得 10 個劃分 (PI-EA01~10)。其中，PI-EA-06 經管柱層析法以及 HPLC 進一步分離純化，獲得化合物 **1-4, 6, 22, 23**；PI-EA-05 經管柱層析法以及 HPLC 分離純化，獲得化合物 **5, 7-12**；PI-EA-03 經管柱層析法以及 HPLC 分離純化，獲得化合物 **13-18, 20, 21, 24, 25**。以上純化後之化合物進一步送抗發炎活性(長庚天然所)、細胞毒殺試驗(高醫天然所)以及轉殖雌激素基因植物表現(高醫天然所)篩選。最後，利用上述純化化合物以建立活性畫分(fraction)之 HPLC 指紋圖。

(D) 生物活性篩選部分：

a. 細胞毒性試驗

先將人類肝癌細胞 (Hep G2 和 Hep 3B)，人類乳癌細胞 (MCF-7 和 MDA-MB-231) 以及人類肺癌細胞 (A549) 分別培養於 RPMI 1640 培養液中，其中含 10 % 胎牛血清 (fetal calf serum) 及含 100 units/ml penicillin 和 100 μ g/ml streptomycin，長至培養瓶單層長滿 (Confluent) 時，medium 以二至五滴的 trypsin 於 37°C 中作用 2~3 分鐘，分離出癌細胞，經染色並置於顯微鏡下計數細胞數目，取 5×10^4 cells/ml 置入 24 well 的培養盤 (culture plate) 中，於 95 % O₂、5 % CO₂ 之培養箱中培養 24 小時後，再加入不同濃度之藥物，72 小時後，以 1 % methylene blue 染色 40 分鐘，用清水沖洗 2~3 次，待乾後加入 1.0 % Sacosyl，50 % alcohol，靜置 24 小時，於酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 於波長 592nm 下，測定其光學活性 (Optical density: O.D.)，其 IC₅₀ (50 % Inhibition Concentration) 即代表藥物能抑制 50 % 癌細胞生長之毒殺濃度^{14, 15}。

細胞毒性之評估

Crude extract 之 ED₅₀ \leq 20 μ g/ml，則視為有效。Pure extract 之 ED₅₀ \leq 4 μ g/ml，則視為有效。

以上是依據美國 NCI 之準則。除了自行檢測細胞毒性之外，亦預備將所獲得之天然化合物及其衍生物與其它相關研究機構合作，如國家衛生研究院等進行進一步之癌症機轉之研究。

b. pER8-GFP Reporter Assay.¹⁶

pER8-GFP seedlings were grown on a vertically oriented GM agar plate1 at 24 °C for 5 days in continuous light. The seedlings were transferred into 24-well microtiter plates containing GM liquid medium with/without chemicals in each well. The plate was incubated at 24 °C for 24 h to induce GFP protein. The GFP fluorescence in the

root was observed with stereofluorescent microscopy (Olympus SZX12: Ex 460-490 nm, Em >510 nm), and photographs were taken by digital camera with the same exposure conditions.

結果與討論（含結論與建議）

本實驗室已分離出二十五個化合物 (**Fig 1**)，其中包括六個三萜類化合物-lupeol (**13**)、betulinic acid (**14**)、betulin (**15**)、betulin-3-caffeoate (**16**)、friedelin (**17**) 及 3β -friedelinol (**18**)；一個醣類化合物-sucrose (**19**)；6 個固醇類化合物- β -sitosterol 、 stigmasterol (**20&21**) 、 β -sitosteryl-3-O- β -D-glucoside 、 β -sigmasteryl-3-O- β -D- glucoside (**22&23**)、 β -sitosterone 及 stigmasterone (**24&25**)；1 個沒食子酸類衍生物- 3,4,5-trihydroxy-benzaldehyde (**6**)；以及十一個異黃酮類化合物 - maackiain (**1**)¹⁷ 、 pterocarpine (**2**)¹³ 、 homopterocarpin (**3**)¹⁸ 、 3-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 2-(4-methoxyphenyl)propan-1-one (**4**) 、 angolensin (**5**)⁹ 、 (-)-medicarpin (**7**)¹⁹ 、 secundiflorol I (**8**)²⁰ 、 liquiritigenin (**9**)²¹ 、 4'-methoxyl-7-hydroxyl-2,3- dihydroisoflavone (**10**) 、 Afromosin (**11**)²² 以及 PI-S33-2 (**12**)。其中，pterocarpine 異黃酮類化合物為文獻所記載之紫檀主要活性成分，而 3-hydroxy-1-(2-hydroxy-4- methoxyphenyl)-2-(4-methoxy-phenyl)propan-1-one (**4**) 以及 PI-S33-2 (**12**)為首次自天然資源中分離出之化合物。除 pterocarpine (**2**)與 angolensin (**5**)外，其他化合物皆為首次分離獲得自此種植物。

本計劃尚進一步利用基因轉殖植物進行藥用植物活性成分的開發。經轉殖人類雌激素受體基因之植物-阿拉伯芥測試 (pER8-GFP Reporter Assay) 後，結果指出印度紫檀萃取物之甲醇層具有類雌激素之作用。經分配分層後，氯仿層和乙酸乙酯層等有機層仍保有其活性 (**Fig. 2**)。取乙酸乙酯層進一步純化，獲得一系列類黃酮化合物。重複 pER8-GFP Reporter Assay 實驗後，發現化合物 maackiain (**1**)， medicarpin (**7**)，liquiritigenin (**9**)能使轉殖雌激素基因植物表現螢光，顯示此三種類黃酮化合物具有類雌激素作用。另外，Afromosin (**11**)曾被記載具有抑制老鼠皮膚腫瘤生長之活性，且對肺癌細胞的生長有抑制作用。²² 關於這些化合物的細胞毒殺與抗發炎活性作用則正在進一步測試中

References

1. Grover, J. K.; Yadav, S.; Vats, V. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 81, 81-100
2. Vats, V.; Grover, J. K.; Rathi, S. S. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 79, 95-100
3. Vats, V.; Yadav, S. P.; Biswas, N. R.; Grover, J. K. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 93, 289-294.
4. Steenkamp, V.; Mathivha, E.; Gouws, M. C.; Van Rensburg, C. E. J. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 95, 353-357
5. Wang, S.; Ding, S.; Zhang, X.; Zhang, L. *J. Chin. Med. Mater.* **1997**, 20, 330-332.
6. 李書淵, 中藥材 **1998**, 21, 259-261.
7. Zhang, J.; Takahashi, K.; Kono, Y.; Suzuki, Y.; Takeuchi, S.; Shimizu, T.; Yamaguchi, I.; Chijimatsu, M.; Sakurai, A. *Nippon Noyaku Gakkaishi* **1990**, 15, 585-591.
8. Khan, M. R.; Omoloso, A. D. *Fitoterapia* **2003**, 74, 603-605.
9. Pilotti, C. A.; Kondo, R.; Shimizu, K.; Sakai, K. *Mokuzai Gakkaishi* **1995**, 41, 593-597.

10. Endo, H.; Miyazaki, Y. *Eisei Shikensho Hokoku* **1972**, *90*, 69-71
11. Takeuchi, S. Institute of Physical and Chemical Research, Japan, JP60126225, **1983**.
12. a) Cooke, R. G.; Rae, I. D. *Aus. J. Chem.*, **1964**, *17*, 379-383. b) Gonzales, E. V. *Philippine Journal of Science* **1978**, *105*, 223-233.
13. Bhrara, S. C.; Jain, A. C.; Seshadri, T. R. *Curr. Sci.* **1964**, *33*, 303.
14. Elliott, W. M.; Auersperg, N. *Biotechnic & Histochemistry* **1993**, *68*, 29.
15. McLoud, T. G.; Smith, D. L.; Chang, C. J.; Cassady, J. M. *Experientia* **1987**, *43*, 947.
16. Chang, F. R.; Hayashi, K-I; Chua, N-H; Kamio, S.; Huang, Z-Y, Nozaki, H.; Wu, Y-C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 971-973.
17. Maximo, P.; Lourengo, A. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 359-362.
18. van Aardt, T.; van Rensburg, H.; Ferreira, D. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11773-11786.
19. McMurry, T. B. H.; Martin, E.; Donnelly, D. M. X.; Thompson, J. C. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 3283-3286.
20. Tian, F.; McLaughlin, J. L. *Pharm. Biol.* **2000**, *38*, 229-234.
21. Youssef, D. T. A.; Ramadan, M. A.; Khalifa, A. A. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2579-2583.
22. Konoshimam, T.; Okumaim, I.; Kozuka, U. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1776-1778.

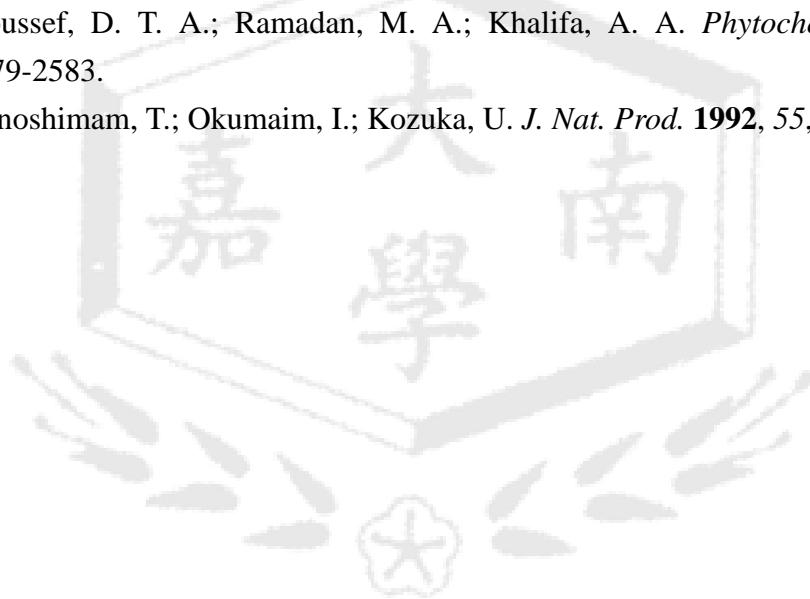


Figure 1. the compounds isolated from the MeOH extract of *Pterocarpus indicus*.

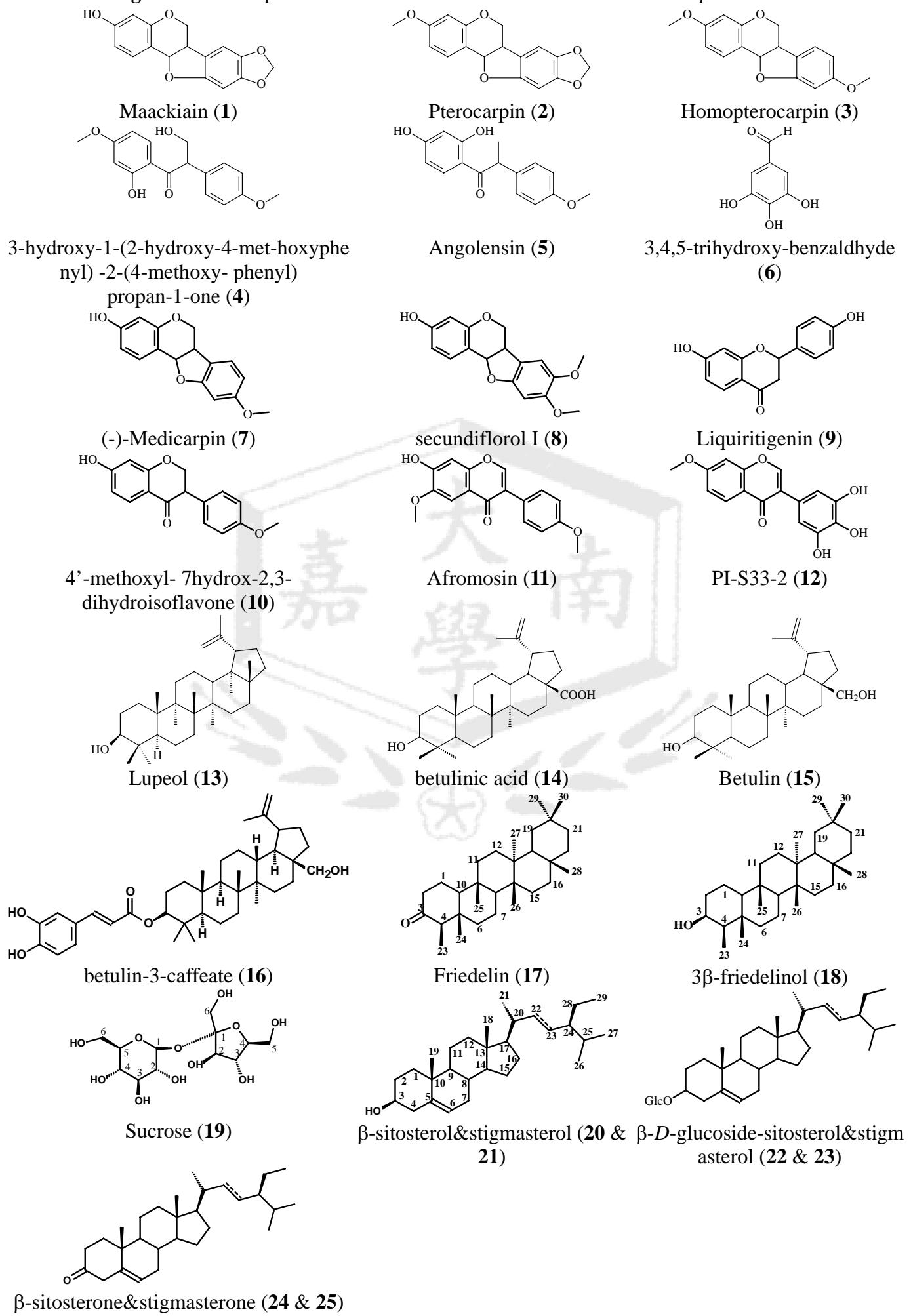
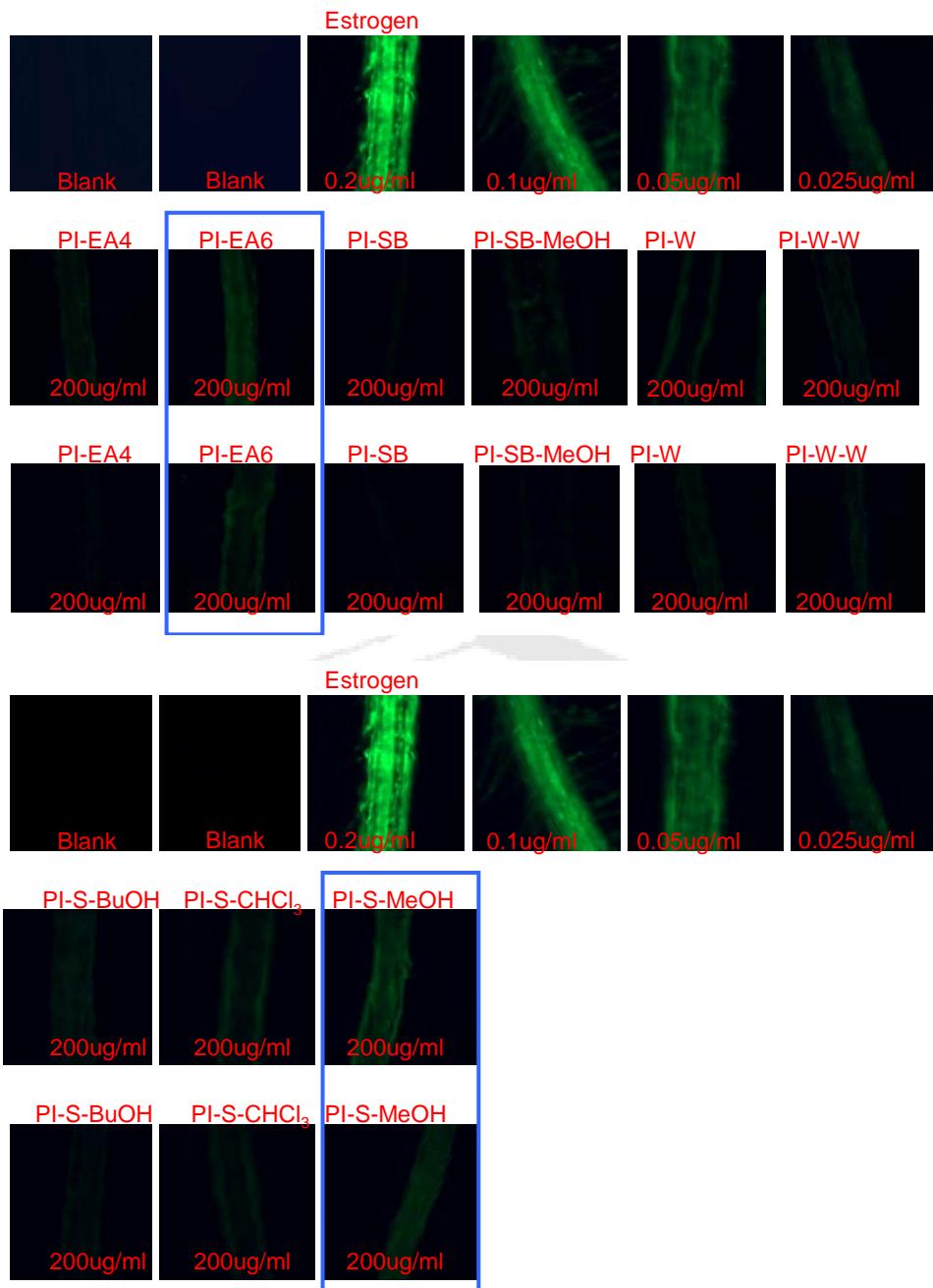


Figure 2. the GFP expression of extracts from *Pterocarpus indicus*.



(六)計畫成果自評部份，請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

本計劃中我們主要進行印度紫檀化學活性成分之單離、純化與結構鑑定工作，並進一步開發此要用植物之活性作用方向。其中，共三大類、二十五個化合物被分離純化獲得，並經光譜方法及化學方法確認其結構，包括三萜類化合物（6個）、固醇類化合物（6個）以及異黃酮類化合物（11個）。在此次研究中，我們除分離獲得純化合物外，並進一步確認開發印度紫檀成分之活性方向中具雌激素活性之化合物，此結果在未來開發印度紫檀之活性成分健康食品補充劑，或進一步開發成藥物，以替代雌激素藥物，作為預防更年期婦女罹患乳癌、子宮頸癌等疾病之輔助性藥物。

此外，本計劃首次利用基因轉殖植物進行活性篩選，做為動物疾病篩選平台，在嚴謹的實驗室控管操作下，此轉殖基因篩選平台將能快速、有效率的達成藥物篩選的工作，並進而降低動物細胞篩選所耗費的人力、物力與時間。

本計畫現階段之研究成果與原計畫預計之目標相符，並進而開發印度紫檀甲醇萃取物在類雌激素作用上之應用，上述結果將於彙整後，預計發表於 *Journal of Agriculture culture and food chemistry* 等相關期刊中。