

· 实验研究 ·

α -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

雷铭道¹, 郑丽丽¹, 张玲¹, 陈晓艳^{2*}

1. 江西省妇幼保健院 药剂科, 江西 南昌 330004

2. 江西省妇幼保健院 产科, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 合成并表征 α -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物, 并对其抗肿瘤活性进行研究。方法 采用苯硫酚作为起始原料, 以不同长度的二醇作为连接臂, 将 α -常春藤皂苷的 28 位羧基和呋咱氮氧化物连接在一起得到 α -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物; 并采用 MTT 法对目标化合物进行体外抗乳腺癌活性研究。结果 合成了 4 个 α -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物, 其结构均通过 ¹H-NMR 和 MS 确证。生物活性结果测试表明其抗肿瘤活性均优于阳性对照药 α -常春藤皂苷。结论 α -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物抗肿瘤活性明显, 具有很好的开发价值。

关键词: 常春藤皂苷; 一氧化氮供体; 乳腺癌; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)01-0001-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.01.001

Synthesis of nitric oxide-donating derivatives of α -hederin and their antitumor activities

LEI Ming-dao¹, ZHENG Li-li¹, ZHANG Ling¹, CHEN Xiao-yan²

1. Department of Pharmacy, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330004, China

2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To synthesize and characterize nitric oxide-donating derivatives of α -hederin, and evaluate their anti-cancer effect *in vivo*. **Methods** Thiophenol was used as the starting materials. Glycol with different chain lengths was the linker, and the 28-carboxyl group was connected with furoxans to synthesize nitric oxide-donating derivatives of α -hederin. The anti-breast cancer activities were determined by MTT assays. **Results** The four nitric oxide-donating derivatives of α -hederin were synthesized and the structures had been confirmed by ¹H-NMR and MS spectra. The biological results showed that they displayed the better biological effect than α -hederin. **Conclusion** The nitric oxide-donating derivatives of α -hederin have good antitumor activities, which has the further development value.

Key words: α -hederin; nitric oxide-donating; breast cancer; antitumor activities

五环三萜类皂苷是天然皂苷中一类重要的化合物, 存在于多种植物中。大量的研究表明该类化合物具有广泛的生物活性如抗肿瘤、抗病毒、抗炎以及机体免疫调节等作用。从植物白头翁中提取的化合物 α -常春藤皂苷是 1 个典型的五环三萜类皂苷^[1-3], 结构中含有鼠李糖和阿拉伯糖, α -常春藤皂苷的化学结构见图 1。在前期研究中发现 α -常春藤皂苷具有很

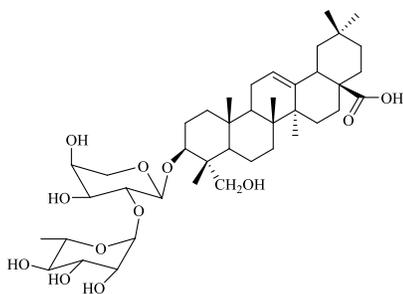
好的抗肿瘤作用, 尤其对乳腺癌具有很好的抑制作用, 但是化合物也存在着缺点, 尤其是强的溶血性使得动物给药剂量无法提高, 肿瘤抑制率不能达到 60% 以上, 这些缺点限制了 α -常春藤皂苷作为候选药物的进一步开发。最近的研究发现高浓度的一氧化氮 (NO) 具有很好的抗肿瘤作用。因此本研究计划在 α -常春藤皂苷上接上 NO 供体, 当药物到达肿

收稿日期: 2018-10-30

基金项目: 江西省卫计委中医药课题资助项目 (2015A245)

作者简介: 雷铭道 (1978—), 男, 江西鄱阳人, 主管药师, 主要从事中药学的研究。E-mail: mingdao_lei@hotmail.com

*通信作者 陈晓艳 (1981—), 女, 江西弋阳人。Tel: (0791)86224432 E-mail: chenxiaoyanmail81@163.com

图 1 α -常春藤皂苷的化学结构Fig. 1 Chemical structure of α -hederin

瘤部位后释放出 NO 和 α -常春藤皂苷, 以实现 α -常春藤皂苷和 NO 协同抗肿瘤作用, 提高 α -常春藤皂苷的肿瘤抑制率^[4-6]。在各种 NO 供体中, 咪唑氮氧化物能够释放大量的氧化氮, 是一个非常优良的供体。本研究以不同链长的二醇作为连接臂, 将 α -常春藤皂苷的 28 位羧基和咪唑氮氧化物连接在一起, 同时考察了这些衍生物在 5 种乳腺癌细胞上的抗肿瘤活性。

1 仪器和试剂

1.1 实验仪器

BuchiB-540 熔点测定仪; D2010W 型电动搅拌器(上海越众仪器设备有限公司); 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州市华仪器制造有限公司); Micro Pure 超纯水仪(Thermo Fisher Scientific)。Thermo fisher LCQ fleet 质谱仪(Thermo fisher 公司)。

1.2 试剂和细胞

苯硫酚(浙江寿尔福化工贸易有限公司), 氯乙酸(上海金锦乐化工有限公司), 四溴化碳(上海和逸化工有限公司), 三苯基磷(常州市华东化工研究所), 其余所用试剂均为市售分析纯或化学纯产品。 α -常春藤皂苷(江西本草天工科技有限责任公司, 质量分数大于 96.5%)。

乳腺癌细胞 MCF7、T47D、ZR75-1、MB231 和 MB453 细胞均购自中国科学院上海细胞库。

2 方法和结果

2.1 衍生物的合成

2.1.1 苯硫基乙酸(1)的合成 在 5% 氢氧化钠溶液(0.8 mol) 中加入苯硫酚(20.4 mL, 0.2 mol), 搅拌下加入氯乙酸(20.8 g, 0.22 mol), 将混合物在 90 °C 加热 2 h, 反应结束后用盐酸调节 pH 值到 2.0, 冰水条件下冷却, 有大量固体析出, 滤过, 用纯水洗涤滤饼, 得到白色产物 25 g, 收率 69.6%。

2.1.2 化合物 2 的合成 将化合物 1(12.5 g, 0.075

mol) 溶解在冰醋酸溶液(100 mL) 中, 在冰水浴条件下缓慢加入 30% 双氧水(18 mL, 0.15 mol), 室温反应 2.5 h, 得到化合物 2。

2.1.3 化合物 3 的合成 在冰水浴条件下继续向反应液中缓慢加入 65% 硝酸溶液(46 mL, 0.67 mol), 90 °C 反应 0.5 h, 反应结束后冷却至室温, 0 °C 冷却过夜, 有大量晶体析出, 滤过, 并用纯水洗涤滤饼, 室温干燥后得到 4.5 g 白色化合物, 收率 31.2%。

2.1.4 化合物 4a~4d 的合成 将化合物 3(2.0 g, 5.5 mmol) 溶解在四氢呋喃(20 mL) 中, 搅拌条件下加入不同的二醇类化合物(21.0 mmol), 然后滴加 25% 氢氧化钠溶液(1.1 mL, 6.6 mmol), 滴加完毕后室温搅拌反应 2 h, TLC 监测反应进度, 原料完全反应后停止反应, 向反应液中加入纯水, 用醋酸乙酯萃取, 有机相用水和饱和氯化钠水溶液洗涤, 干燥, 浓缩后得到粗品, 硅胶柱色谱分离后得到白色固体, 收率 81%~91.7%。

2.1.5 化合物 5a~5d 的合成 冰水浴下, 向化合物 4a~4d(5 mmol) 的二氯甲烷溶液加入四溴化碳(1.8 g, 5.5 mmol), 在搅拌、氮气保护条件下慢慢滴加三苯基磷(1.44 g, 5.5 mmol) 的二氯甲烷溶液, 室温反应 12 h, 反应结束后用二氯甲烷和水稀释反应液, 有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 滤过, 浓缩, 得到化合物 5a~5d 的粗品, 石油醚-醋酸乙酯(3:2) 洗脱, 硅胶柱色谱分离得到纯品 5a~5d, 收率 78.3%~87.6%。

2.1.6 目标化合物 6a~6d 的合成 在 α -常春藤皂苷(7.50 g, 10 mmol) 的 DMF 溶液中加入无水碳酸钾(4.14 g, 30 mmol) 和化合物 5a~5d(15 mmol), 室温下反应 12 h, 减压蒸去 DMF, 二氯甲烷-醋酸乙酯(1:2) 洗脱, 硅胶柱色谱分离得到目标化合物 6a~6d, 收率 57.1%~65.1%。

化合物 6a: 收率 57.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ : 8.06(d, $J=7.7$ Hz, 2H, SO₂Ph), 7.86(t, $J=7.4$ Hz, 1H, SO₂Ph), 7.73(t, $J=7.9$ Hz, 2H, SO₂Ph), 5.23(t, $J=3.2$ Hz, 1H, H-12), 5.21(d, $J=1.2$ Hz, 1H, H-11), 4.57~4.54(m, 1H, CH₂CH₂CH₂), 4.51~4.47(m, 1H, CH₂CH₂CH₂), 4.44(d, $J=7.7$ Hz, 1H, H-11), 4.26~4.19(m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.26~2.23(m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1.23(d, $J=6.2$ Hz, 3H, H-6II), 1.12(s, 3H, CH₃), 1.01(s, 3H, CH₃), 0.94(s, 3H, CH₃), 0.91(s, 3H, CH₃), 0.81(s, 3H, CH₃),

0.63 (s, 3H, CH₃)。HR-ESI-MS *m/z*: 1 033.240 3 [M+H]⁺。

化合物 **6b**: 收率 65.1%。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.04~8.03 (m, 2H, SO₂Ph), 7.84~7.82 (m, 1H, SO₂Ph), 7.70~7.68 (m, 2H, SO₂Ph), 5.24 (t, *J*=3.4 Hz, 1H, H-12), 5.16 (d, *J*=1.3 Hz, 1H, H-11), 4.47 (t, *J*=6.4 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 4.41 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, H-11), 4.14~4.05 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.97~1.93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.86~1.77 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.20 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-6II), 1.13 (s, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 0.91 (s, 3H, CH₃), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.87 (s, 3H, CH₃), 0.81 (s, 3H, CH₃)。HR-ESI-MS *m/z*: 1 047.261 3 [M+H]⁺。

化合物 **6c**: 收率 62.3%。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.09~8.04 (m, 2H, SO₂Ph), 7.87~7.85 (m, 1H, SO₂Ph), 7.76~7.71 (m, 2H, SO₂Ph), 5.24 (s, 1H, H-12), 5.19 (s, 1H, H-11), 5.16~5.14 (m, 1H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 4.49 (m, 1H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 4.45 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, H-11), 4.40 (m, 1H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 2.26~2.19 (m,

1H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 2.13~2.09 (m, 1H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 1.33 (d, *J*=2.5 Hz, 3H, CH(CH₃)CH₂CH₂), 1.25 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-6II), 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.03 (s, 3H, CH₃), 0.94 (s, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.83 (s, 3H, CH₃)。HR-ESI-MS *m/z*: 1 047.261 6 [M+H]⁺。

化合物 **6d**: 收率 59.4%。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 8.08 (d, *J*=7.4 Hz, 2H, SO₂Ph), 7.86 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, SO₂Ph), 7.72 (t, *J*=8.1 Hz, 2H, SO₂Ph), 5.97~5.90 (m, 2H, CH₂CH=CHCH₂), 5.27 (t, *J*=3.2 Hz, 1H, H-12), 5.19 (s, 1H, H-11), 5.11 (d, *J*=5.8 Hz, 2H, CH₂CH=CHCH₂), 4.76 (dd, *J*=6.6、13.7 Hz, 1H, CH₂CH=CHCH₂), 4.68 (dd, *J*=6.1、13.4 Hz, 1H, CH₂CH=CHCH₂), 4.45 (d, *J*=7.7 Hz, 1H, H-11), 1.24 (d, *J*=6.2 Hz, 3H, H-6II), 1.17 (s, 3H, CH₃), 1.04 (s, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 0.93 (s, 3H, CH₃), 0.92 (s, 3H, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃)。HR-ESI-MS *m/z*: 1 045.252 8 [M+H]⁺。

α-常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成路线见图2。

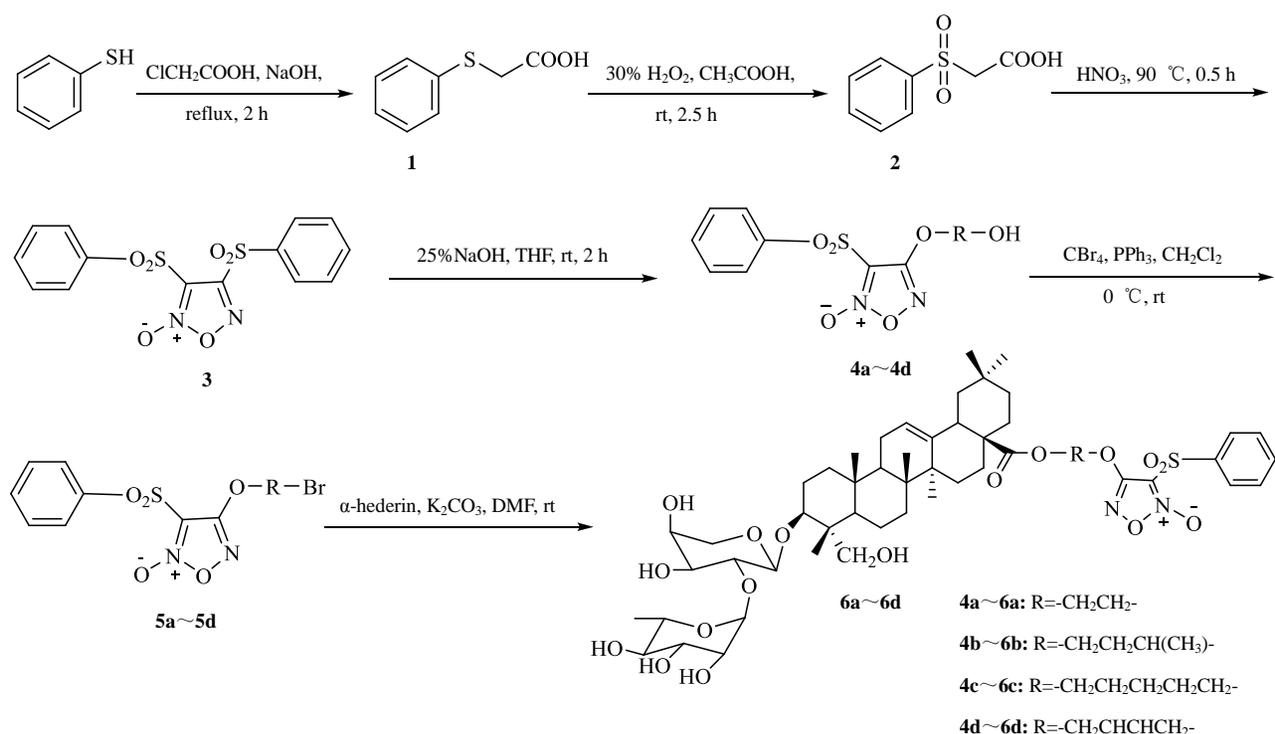


图2 α-常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of nitric oxide-donating derivatives of α-hederin

2.2 体外抗乳腺癌细胞的活性研究

将冻存的乳腺癌细胞 MCF7、T47D、ZR75-1、MB231 和 MB453 从液氮中取出, 迅速置 37 °C 水浴中, 冻存液必须在 1 min 之内融化。冻存管用 75% 酒精消毒后打开, 将细胞悬液吸到离心管中。加入 10 倍体积的培养液, 轻微吹打使细胞分散后低速 (1 000 r/min) 离心 5 min, 弃去上清液, 加适当培养液吹打细胞使其成单个分散的均匀细胞液, 将细胞转移至培养瓶中, 37 °C 培养箱 (5%CO₂, 相对湿度 90%) 中培养。待细胞长满培养瓶, 将细胞转移至离心管中, 低速 (1 000 r/min) 离心 5 min, 使细胞沉淀。

将上述 5 种细胞分别稀释至 5×10^4 个/mL 细胞密度, 吹匀后于 24 孔板中每孔加入细胞悬液 2 mL, 置培养箱中孵育。加入不同浓度的化合物 **6a**~**6d**, 采用 MTT 法测定化合物的抗肿瘤活性, 以 α -常春藤皂苷作为阳性对照, 使用酶标仪在 490 nm 波长测定每孔的吸光度 (A) 值, 所有的化合物每个浓度均平行测试 3 次, 计算被测药物对肿瘤细胞的抑制率, 采用非线性回归模型绘制 S 型剂量效应曲线, 用 OriginPro 软件计算出半数抑制浓度 (IC₅₀) 值, 见表 1。

从表 1 中可以看出, 4 个衍生物的抗肿瘤活性都比 α -常春藤皂苷好, 其中化合物 **6a** 抑制肿瘤的活性最强。

表 1 α -hederin 及其衍生物的体外活性实验结果

Table 1 *In vitro* activity test results of α -hederin and its derivative

| 化合物 | IC ₅₀ /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | | | | |
|-----------------|---|---------|-----------|----------|----------|
| | MCF7 细胞 | T47D 细胞 | ZR75-1 细胞 | MB231 细胞 | MB453 细胞 |
| 6a | 3.2±0.4 | 2.9±0.4 | 1.8±0.1 | 1.3±0.2 | 2.3±0.3 |
| 6b | 3.8±0.5 | 3.1±0.3 | 2.3±0.5 | 2.1±0.3 | 3.1±0.5 |
| 6c | 4.5±0.7 | 2.6±0.2 | 1.6±0.2 | 3.8±0.5 | 2.9±0.2 |
| 6d | 4.2±0.3 | 4.3±0.2 | 3.6±0.3 | 3.2±0.3 | 4.1±0.4 |
| α -常春藤皂苷 | 5.4±0.4 | 6.1±0.4 | 5.2±0.2 | 4.6±0.4 | 4.2±0.1 |

3 讨论

前期大量实验发现 α -常春藤皂苷有很好的抗肿瘤活性, 28 位羧基是发挥抗肿瘤活性最重要的官能团, 同时也是 α -常春藤皂苷溶血性的来源, 因此为降低 α -常春藤皂苷的副作用和提高活性, 本实验利用不同长度的二醇作为连接臂, 通过酯键 (容易在体内断裂) 在 α -常春藤皂苷的 28 位羧基上接上呋喃氮氧化物, 释放高浓度的 NO 来发挥两者的协同抗肿瘤作用。

α -常春藤皂苷结构中糖上的羟基活性比 28 位羧基都要低, 因此在呋喃氮氧化物和 α -常春藤皂苷对接的过程中, 副产物是比较少的, 目标产物 **6a**~**6d** 的分离纯化是比较容易进行的, 产率也是比较高。

MCF7、T47D、ZR75-1 是孕激素受体阳性的细胞, MB231 和 MB453 是孕激素受体阴性的乳腺癌细胞, 但是这 4 个衍生物在这两种类型细胞上的活性没有显著差异。在下一步的研究中将对这 4 个化合物在荷瘤鼠体内的活性和毒性进行考察。

参考文献

[1] Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, *et al.* Triterpene saponins

and ligands from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(9): 1279-1283.

- [2] Park H J, Kwon S H, Lee J H, *et al.* Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the antitumor activity of hederagenin monodesmosides [J]. *Planta Med*, 2001, 67(2): 118-121.
- [3] Yan M C, Liu Y, Chen H, *et al.* Synthesis and antitumor activity of two *N*-acetyl-glucosamine-bearing triterpenoid saponins: lotoidoside D and E [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(1): 98-101.
- [4] Chen J, Wang T, Xu S, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel nitric oxide-donating protoberberine derivatives as antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 132(2): 173-183.
- [5] Fionda C, Abruzzese M P, Santoni A, *et al.* Immunoregulatory and effector activities of nitric oxide and reactive nitrogen species in cancer [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(24): 2618-2636.
- [6] Wang C, Xia G, Liu X, *et al.* Synthesis and antitumor activity of ATB-429 derivatives containing a nitric oxide-releasing moiety [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(9): 2355-2359.