

瘤背石磺中 1 个新的酰胺类化合物

王博闻^{1,2}, 陈德力^{2,3}, 马国需^{2,3}, 刘洋洋², 许旭东^{3*}, 刘平怀^{1*}

1. 海南大学化学工程与技术学院, 海南 海口 570228

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 海南 海口 570311

3. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 研究海洋特色资源——瘤背石磺 *Onchidium verruculatum* 的化学成分。方法 采用硅胶、半制备高效液相色谱、薄层色谱 (TLC) 检识等方法进行分离纯化, 通过 NMR、MS 等波谱方法对化合物的结构进行鉴定, 并结合 MTT 法测定化合物对人肝癌细胞 HepG-2、BEL-7042、人肺腺癌细胞 A549 和人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞毒活性。结果 从瘤背石磺的黏液及肌肉组织中分离出 1 个新的酰胺类化合物, *N*-(2-羟基-4-甲氧基-5-甲基苯基) 甲酰胺 (1), 化合物 1 对 A549 和 BEL-7042 细胞具有一定的细胞毒活性, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 11.5、19.4 μg/mL。结论 化合物 1 为 1 个新的酰胺类化合物, 命名为石磺甲酰胺, 且对人肿瘤细胞具有一定的细胞毒活性。

关键词: 软体动物; 瘤背石磺; 酰胺; 细胞毒活性; 石磺甲酰胺

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5666-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.004

A new amide compound from *Onchidium verruculatum*

WANG Bo-wen^{1,2}, CHEN De-li^{2,3}, MA Guo-xu^{2,3}, LIU Yang-yang², XU Xu-dong³, LIU Ping-huai¹

1. School of Chemical Engineering and Technology, Hainan University, Haikou 570228, China

2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To study the chemical composition of the marine characteristic resource, *Onchidium verruculatum* from Hainan Island. **Methods** Compound was separated and purified by silica gel and semi-preparative HPLC, detected by TLC, and identified by NMR and MS data. Compound 1 was evaluated for cytotoxic activity against four kinds of human tumor cell lines HepG-2, BEL-7042, A549, and MCF-7. **Results** A new amide compound, *N*-(2-hydroxy-4-methoxy-5-methylphenyl)formamide (1), was isolated from mucus and muscle tissue of *O. verruculatum*. The results showed that compound 1 has moderate toxic activity against A549 and BEL-7042 cell lines, with IC₅₀ value of 11.5 μg/mL and 19.4 μg/mL. **Conclusion** Compound 1 is a new amide compound named onchumamide with moderate toxic activity on human tumor cells.

Key words: mollusc; *Onchidium verruculatum* Cuvier; amide; cytotoxic activity; onchumamide

21 世纪是海洋世纪, 其中海洋药物开发是各国最为活跃的研究领域之一, 许多沿海国家纷纷投入巨资, 研究开发海洋药物。海洋生物的生活环境与陆生生物相比迥然不同, 高压、高盐度、低营养、

低温但恒温以及有限的光照和缺氧的特殊环境决定了海洋生物的次生代谢产物相对陆生生物的次生代谢产物有其独特的特点^[1]。海洋天然产物的多样性已经远远超出了人们的想象, 主要结构类型除了常

收稿日期: 2019-07-22

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目 (219MS101); 海南省科协青年科技英才创新计划项目 (201517)

作者简介: 王博闻 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学成分与活性。Tel: 13699719479 E-mail: jasminewong@hainu.edu.cn

*通信作者 许旭东 (1968—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: xdxu@implad.ac.cn

刘平怀 (1967—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事南药研究与开发。E-mail: twlph@163.com

见的单萜、二萜、长链多烯酮类化合物、甾体、三萜、生物碱以外还有一些特殊的结构类型^[2]。海洋天然产物结构的新颖、奇特、复杂和多样性赋予了其强烈而特异的生物活性，特别是对癌症和神经、心血管等严重疾病的特殊效应更加令人振奋^[3-4]。在已经发现的具有形形色色生物活性的海洋次生代谢产物中，最引人注目的是抗肿瘤活性化合物，海洋活性物质的抗肿瘤作用机制亦呈多样性，有以影响 DNA、RNA、蛋白质生物合成的，也有以干扰细胞有丝分裂或诱导细胞内信息分子的改变为主的，海洋生物世界已成为具有新作用机制的抗癌药物的最重要来源^[5-7]。

海洋软体动物门是海洋生物中分布最为广泛的一类生物群，已成为体内外抗肿瘤活性物质筛选的重要来源^[8]。石磺属 *Onchidium* sp. 为石磺科 (Onchidiidae) 软体动物门 (Mollusca)，无壳的经济贝类，具有独特的生活习性和进化史，是海洋中独一无二的特色资源。瘤背石磺 *Onchidium verruculatum* Cuvier 俗称土海参，又名海癩子、土鸡、土鲍、涂龟等，主要分布于我国海南、广东、广西、江苏、浙江、福建、香港、上海沿海咸淡水交汇处的潮间带高潮区，具有重要营养价值和药用价值^[9]。在《中国海洋医药词典》中^[10]有“石磺别名土海参，四季捕捞，捕后洗净，除去内脏，取肉鲜用，肉入药，有滋补强壮之功效，主治肝硬化、久病体虚等症”的记载。

近年来，石磺属的化学成分及药理活性受到科研工作者的广泛关注^[9-10]。已有学者从石磺中分离得到不同结构类型的化合物，如具有 2 个 γ -吡喃酮环且不对称的聚丙烯酸酯类化合物^[11-16]，以及具有细胞毒活性的环肽和缩酚酸肽^[17-18]等。为了进一步阐明瘤背石磺中的药效物质基础，课题组对海南岛采集的瘤背石磺进行了化学成分研究，从中分离鉴定了 1 个新的酰胺类化合物，为 *N*-(2-羟基-4-甲氧基-5-甲基苯基) 甲酰胺 [*N*-(2-hydroxy-4-methoxy-5-methylphenyl) formamide, **1**]，命名为石磺甲酰胺。并测定其对 4 种人体肿瘤细胞的体外细胞毒活性。结果显示，该化合物对人肺腺癌 A549 细胞和人肝癌 BEL-7402 细胞系具有一定的细胞毒活性，IC₅₀ 值分别为 11.5 和 19.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

1 仪器与材料

Bruker Avance III 600 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); 高分辨质谱仪 Q-TOF (美国 Waters

公司); 大连依利特高效液相色谱仪 (P230 高压泵制备); DAD230⁺ 二极管阵列检测器 (大连依利特分析仪器有限公司); RE-5299 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 色谱柱为 YMC C₁₈ 填料 (250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm , 日本 YMC 公司); 柱色谱用 200~300 目硅胶、薄层色谱用硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); 常规试剂均为国产分析纯，娃哈哈纯净水。

瘤背石磺于 2016 年 11 月 28 日采自于海南省陵水黎族自治县新村镇南湾猴岛滩涂，经海南大学材料与化工学院王小兵高级实验师鉴定为瘤背石磺 *Onchidium verruculatum* Cuvier 的活体，标本 (20161128OS) 保存于中国医学科学院药用植物研究所海南分所。

2 提取与分离

瘤背石磺活体鲜质量 17.5 kg，丙酮 (25 L $\times$ 2) 冷浸提取 5 d，减压浓缩得深绿色总浸膏 188.3 g。总浸膏分散于 2.0 L 纯净水中，并依次用石油醚、二氯甲烷和醋酸乙酯萃取得不同极性部位的浸膏。取醋酸乙酯层浸膏 15.5 g 经硅胶柱色谱分离，使用二氯甲烷-甲醇溶剂系统进行梯度洗脱 (100:0 $\rightarrow$ 0:100)，所得流分经薄层色谱 (TLC) 检识合并得 Fr. EA~EF 部位。取 Fr. EB (3.2 g) 经硅胶柱色谱，以二氯甲烷-醋酸乙酯 (99:1) 洗脱，所得流分经 TLC 检识合并得 Fr. EB-1~EB-3 部位。Fr. EB-1 (1.1 g) 经反相 C₁₈ 常压柱色谱，以甲醇-水 (20:80 $\rightarrow$ 100:0) 梯度洗脱，得到 EBA~EBD 部位。取 EBA 经半制备高效液相分离纯化，以 YMC 色谱柱分离，甲醇-水 (15:85, 0.1% 甲酸，体积流量 2 mL/min) 等度洗脱，得到化合物 **1** (10.8 mg, t_R = 13.7 min)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 无色油状液体 (甲醇)。HR-ESI-MS m/z : 204.062 5 [$M + Na$]⁺ (计算值 204.063 7, C₉H₁₁NNaO₃)，提示化合物 **1** 的分子式为 C₉H₁₁NO₃。红外光谱 (IR) 显示该结构中含有羟基 (3 250 cm⁻¹)、甲酰基 (1 690 cm⁻¹)、氨基 (3 350 cm⁻¹)、苯基 (1 580 cm⁻¹) 和甲氧基 (2 825 cm⁻¹) 等官能团。

¹H-NMR (表 1) 谱显示 2 个甲基质子信号: δ_H 2.02 (3H, s, 5-CH₃), 3.70 (3H, s, 4-OCH₃); 2 个烯烃质子信号 δ_H 6.48 (1H, s, H-3), 7.62 (1H, s, H-6); 1 个甲酰基质子信号 δ_H 8.16 (1H, d, J = 1.2 Hz, -CHO); 1 个羟基氢信号 δ_H 9.71 (1H, s, 2-OH) 和 1 个氨基氢

表 1 化合物 1 的氢、碳核磁共振波谱数据 (600/150 MHz, DMSO- d_6)

Table 1 NMR data of compound 1 (600/150 MHz, DMSO- d_6)		
碳位	δ_C	δ_H
1	118.5	
2	146.7	
3	99.6	6.48 (s)
4	154.5	
5	115.6	
6	123.9	7.62 (s)
-CHO	160.8	8.16 (d, $J = 1.2$ Hz)
-NH-		9.46 (s)
2'-OH		9.71 (s)
4'-OCH ₃	55.7	3.70 (s)
5'-CH ₃	15.6	2.02 (s)

信号 δ_H 9.46 (1H, s, -NH-). ^{13}C -NMR 谱 (表 1) 显示 9 个碳信号, 包括 1 个甲基碳信号 (δ_C 15.6)、1 个甲氧基碳信号 (δ_C 55.7)、2 个芳香季甲基碳信号 (δ_C 99.6, 123.9)、4 个芳香季碳信号 (δ_C 118.5, 146.7, 154.5, 115.6)、1 个甲酰基碳信号 (δ_C 160.8)。以上数据表明化合物具有苯基甲酰胺结构骨架, 与文献中报道的已知化合物 4-甲氧基甲酰苯胺^[19]、2,5-二甲氧基甲酰苯胺^[20]和 3,4-亚甲二氧基甲酰苯胺^[21]结构相似。

HMBC (图 1) 给出 δ_H 6.48 (H-3), δ_H 7.62 (H-6) 和 δ_C 146.7 (C-2) 相关, 且 C-2 信号低场迁移, 提示 C-2 存在羟基取代; δ_H 3.70 与 δ_C 154.5 (C-4) 相

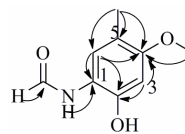


图 1 化合物 1 的结构及其主要 HMBC 相关

Fig. 1 Structure of compound 1 and key HMBC correlations

关, 提示甲氧基与 C-4 连接; δ_H 2.02 和 δ_C 115.6 (C-5), δ_C 123.9 (C-6) 存在远程相关, 提示甲基与 C-5 的连接; 甲酰基质子 δ_H 8.16, 芳香质子 δ_H 7.62 (H-6) 与 δ_C 118.5 (C-1) 存在远程相关, 提示甲酰胺片段与 C-1 连接。

综上所述, 化合物 1 的结构如图 1 所示, 为 1 个新的酰胺类化合物, 命名为石磺甲酰胺。

4 细胞毒活性测定

使用文献方法^[22-23]中 MTT 测定方法, 经过适当修改, 测定化合物 1 对 4 种人肿瘤细胞 HepG-2、A549、MCF-7 和 BEL-7402 的细胞毒活性。用胰蛋白酶将培养皿对数生长的肿瘤细胞系消化, 并按 200 μL /孔 (3×10^4 个/mL) 接种于 96 孔板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 向孔里加入 100 μL 化合物 1 样品, 质量浓度梯度为 100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56 $\mu\text{g/mL}$, 紫杉醇为阳性对照组 (质量浓度为 0.01~12.00 $\mu\text{g/mL}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h, 然后将 20 μL MTT 溶液 (20 mg/mL) 直接加入所有孔中, 培养 4 h, 使用分光光度计测量其在 570 nm 处的吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次, 计算 IC_{50} 值, 见表 2。

表 2 化合物 1 对 4 种人肿瘤细胞的细胞毒活性

Table 2 Cytotoxic activity of compound 1 against four tested human tumor cell lines

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$			
	HepG-2	A549	MCF-7	BEL-7402
1	57.80 ± 3.60	11.50 ± 1.50	42.70 ± 3.30	19.40 ± 2.30
紫杉醇	10.50 ± 0.70	0.03 ± 0.00	0.08 ± 0.02	3.20 ± 0.04

结果表明, 化合物 1 对 A549 细胞具有显著的细胞毒活性, IC_{50} 为 11.5 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 1 对 BEL-7402 细胞有一定的细胞毒活性, IC_{50} 为 19.4 $\mu\text{g/mL}$; 但与阳性对照紫杉醇相比, 在 HepG-2 和 MCF-7 细胞系中表现出弱活性, IC_{50} 分别为 57.8、42.7 $\mu\text{g/mL}$; 化合物 1 的活性基团可能为酰胺基。根据文献报道^[17-18,24-30], 石磺属软体动物中含有较多的蛋白质、多肽及氨基酸类物质, 其中多肽类主

要为环状缩酚酸肽类和直链肽类, 化合物 1 作为一个基本酰胺单元可能参与环肽或直链肽类的形成。基于上述结果, 化合物 1 为潜在的抗肿瘤候选药物, 值得进一步探索。

参考文献

- [1] 史清文, 顾玉诚. 海洋天然药物的研究概况 [J]. 河北医科大学学报, 2006, 27(4): 308-313.
- [2] 郭跃伟. 海洋天然产物和海洋药物研究的历史、现状和

- 未来 [J]. 自然杂志, 2009, 31(1): 27-36.
- [3] Kobayashi S, Kobayashi J, Yazaki R, *et al.* Toward the total synthesis of onchidin, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a mollusc [J]. *Asian J Chem*, 2007, 2(1): 135-144.
- [4] Ebrahim H Y, El Sayed K A. Discovery of novel antiangiogenic marine natural product scaffolds [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(3): 57-76.
- [5] 任虹, 崔承彬. 海洋微生物抗肿瘤活性产物研究进展 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(5): 57-63.
- [6] 张建业, 符立. 几类重要的海洋抗肿瘤药物研究进展 [J]. 药学学报, 2008, 43(5): 435-442.
- [7] Montaser R, Luesch H. Marine natural products: A new wave of drugs? [J]. *Future Med Chem*, 2011, 3(12): 1475-1489.
- [8] Vardaro R R, Marzo V D, Crispino A, *et al.* Cyercenes, novel polypropionate pyrones from the autotomizing Mediterranean *Molluscocyerce cristallina* [J]. *Tetrahedron*, 1991, 47(29): 5569-5576.
- [9] 孙变娜, 沈和定, 吴洪喜, 等. 石磺营养价值、活性物质的研究现状及开发前景 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 14-17.
- [10] 姜凤吾, 张玉顺. 中国海洋药物辞典 [M]. 北京: 海洋出版社, 1994.
- [11] Rodriguez J, Riguera R, Debitus C. The natural polypropionate-derived esters of the mollusk *Onchidium* sp [J]. *J Org Chem*, 1992, 57(17): 4624-4632.
- [12] Carbone M, Gavagnin M, Mattia C A. Structure of onchidione, a bis- γ -pyrone polypropionate from a marine pulmonate mollusk [J]. *Tetrahedron*, 2009, 40(38): 4404-4409.
- [13] Carbone M, Ciavatta M L, Wang J R, *et al.* Extending the record of bis- γ -pyrone polypropionates from marine pulmonate mollusks [J]. *J Nat Prods*, 2013, 76(11): 2065-2073.
- [14] Ireland C M, Biskupiak J E, Hite G J, *et al.* Ilikonapyrone esters, likely defense allomones of the mollusk *Onchidium verruculatum* [J]. *J Org Chem*, 1984, 49(3): 559-561.
- [15] Rodriguez J, Riguera R. New marine cytotoxic bispyrones absolute stereochemistry of onchitrols I and II [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33(8): 1089-1092.
- [16] Chen DL, Zheng W, Feng J, *et al.* A new bis- γ -pyrone polypropionate from a marine pulmonate mollusc *Onchidium struma* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(4): 384-390.
- [17] Rodriguez J, Fernández R, Quiñoá E, *et al.* Onchidin: A cytotoxic depsipeptide with C₂ symmetry from a marine mollusc [J]. *Tetrahedron Lett*, 1994, 35(49): 9239-9242.
- [18] Fernández R, Rodríguez J, Quiñoá E, *et al.* Onchidin B: A new cyclodepsipeptide from the mollusk *Onchidium* sp [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, 118(46): 11635-11643.
- [19] Carter R E. Nuclear magnetic resonance spectra of anilides II. NMR parameters and rotational barriers for some *p*-substituted formanilides [J]. *Acta Chem Scand*, 1968, 22(8): 2643-2652.
- [20] Pettit G, Kalnins M, Liu T, *et al.* Notes-potential cancerocidal agents III formanilides [J]. *J Org Chem*, 2003, 26(7): 2563-2566.
- [21] Müller K, Sellmer A, Prinz H. 10-Aminomethylene-1,8-dihydroxy-9(10*H*)-anthracenones: Inhibitory action against 5-lipoxygenase and the growth of HaCaT cells [J]. *Eur J Med Chem*, 1997, 32(13): 895-990.
- [22] Li P, Fan Y, Chen H, *et al.* Phenylquinolinones with antitumor activity from the Indian Ocean-derived fungus *Aspergillus versicolor* Y31-2 [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2016, 34(5): 1072-1075.
- [23] Zhang H, Xie Z, Lou T, *et al.* Isolation, identification, and cytotoxicity of a new isobenzofuran derivative from marine *Streptomyces* sp. W007 [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2016, 34(2): 386-390.
- [24] 李柏航, 沈和定, 朱敏, 等. 瘤背石磺活性多肽制备工艺优化及其抗氧化性探究 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 168-173.
- [25] 刁亚. 瘤背石磺肌肉活性肽的制备及其功能特性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [26] 朱敏. 瘤背石磺肌肉胶原蛋白提取工艺优化、结构特征及其抗氧化活性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [27] 孙变娜, 沈和定. 浅议瘤背石磺酶解多肽开发前景 [J]. 生物技术世界, 2013(8): 2-3.
- [28] 刁亚, 沈和定, 程知庆, 等. 响应面法优化碱性蛋白酶提取瘤背石磺肌肉蛋白 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(16): 227-231.
- [29] 刁亚, 沈和定, 程知庆, 等. 响应面法优化胃蛋白酶酶解瘤背石磺肌肉蛋白工艺参数 [J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(3): 391-397.
- [30] Khodabandeh S, Maleki D, Abdolzadeh M. P108 isolation of a 320 kDa protein from the eggs of *Onchidium* (sea slug) that exhibits anticancer activity against breast cancer cell line (T47D) [J]. *Breast*, 2011, 20(Suppl 1): S18-S19.