

甘草次酸 - 苦参碱复合物的合成及其抗肿瘤活性研究

张 娜¹, 崔晓燕^{1,2}, 赵秀梅¹, 李冬冬¹, 代霖霖¹, 陶遵威^{1*}

1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

2. 天津医科大学 研究生院, 天津 300070

摘 要: **目的** 设计合成甘草次酸 - 苦参碱复合物, 并对其体外抗肿瘤活性进行研究。**方法** 以槐果碱、18 α -甘草次酸和 18 β -甘草次酸为原料, 经过加成、氧化、酯化缩合等反应合成目标化合物甘草次酸 - 苦参碱复合物, 并采用 MTT 法对其进行体外抗肿瘤活性研究。**结果** 设计并合成了目标产物甘草次酸 - 苦参碱复合物, 利用 MS 和 ¹H-NMR 确证了结构; 体外活性实验中, 甘草次酸 - 苦参碱复合物的抗肿瘤活性明显高于甘草次酸及苦参碱, 并优于对照药美法仑。**结论** 甘草次酸 - 苦参碱复合物具有良好的抗肿瘤活性, 尤其对肝癌细胞生长产生较好的抑制作用, 值得进一步进行研究。

关键词: 甘草次酸 - 苦参碱复合物; 甘草次酸; 苦参碱; 合成; 美法仑; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2014)11 - 1199 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.026

Synthesis of glycyrrhetic acid-matrine complexes and their antitumor activities

ZHANG-Na¹, CUI Xiao-yan^{1,2}, ZHAO Xiu-mei¹, LI Dong-dong¹, DAI Lin-lin¹, TAO Zun-wei¹

1. Tianjin Institute of Medical Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

2. School of Graduate, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To design and synthesize glycyrrhetic acid-matrine complexes, and to evaluate their antitumor activities *in vitro*. **Methods** Sophocarpine, 18 α -glycyrrhetic acid and 18 β -glycyrrhetic acid were used as starting materials to synthesize the target compounds glycyrrhetic acid-matrine complexes by addition, oxidation, and esterification reactions. The antitumor activities *in vitro* were evaluated by MTT method. **Results** The target compounds glycyrrhetic acid-matrine complexes were synthesized and characterized by MS and ¹H-NMR. The *in vitro* antitumor activity experiments showed that the antitumor activity of glycyrrhetic acid-matrine complexes were higher than those of glycyrrhetic acid and matrine *in vitro*, and were better than control drug melphalan. **Conclusion** The target compounds glycyrrhetic acid-matrine complexes have good antitumor activities especially against hepatoma cells, which could be a valuable candidate for further development.

Key words: glycyrrhetic acid-matrine complexes; glycyrrhetic acid; matrine; synthesis; melphalan; antitumor activity

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 是世界上第 5 大常见肿瘤, 在肿瘤致死原因中仅次于肺癌和胃癌, 且全球发病率逐年增长^[1]。中药以其资源丰富、副作用少等优点应用于临床, 在肝癌的治疗中发挥着不可替代的作用^[2]。肝细胞膜上存在大量甘草次酸的特异性结合位点, 因此甘草次酸具有较强的肝分布特征和肝细胞靶向性^[3-7], 其存在两个光学异构体, 研究证明 18 α -甘草次酸的肝靶向性更强^[8]。苦参碱具有一定的抗肿瘤作用, 对正常细胞不产生破坏作用, 特别突出的是具有肝脏保护作用,

使得其在肝癌的治疗方面日益受到关注^[9-10]。但甘草次酸和苦参碱抗肿瘤活性不强且生物利用度低, 限制了它们的广泛利用。因此对其进行结构修饰, 获得低毒性、药理活性较强的药物, 具有十分重要的意义。

课题组在以往研究的基础上, 利用拼合原理将具有肝靶向潜力的甘草次酸和保肝护肝作用的苦参碱连接, 设计合成了甘草次酸 - 苦参碱复合物, 利用 MS 和 ¹H-NMR 确证了结构, 并对其体外抗肿瘤活性进行了研究。

收稿日期: 2014-07-30

基金项目: 天津市卫生局科技基金资助项目 (2012KZ058)

作者简介: 张 娜 (1982—), 女, 天津人, 助理研究员, 硕士, 主要从事新药研究工作。Tel: 13502039035 E-mail: mailofzhangna@sina.com

*通信作者 陶遵威, 男, 研究员, 主要从事化学药物的合成工作。Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@126.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

JJ—500 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); AB135—S 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); DF—101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); RY—1 型显微熔点仪(天津市分析仪器厂); SHZ—D (III) 型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); KQ500DE 型数控超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司); AC—P400 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); VGZAB—HS 型质谱仪; Vanio—EL 型元素分析仪(德国贺利氏公司); BB16/BB5060 仪器 CO₂ 培养箱(上海力创科学仪器有限公司); Infinite M200 酶联免疫检测仪(Tecan 公司)。

1.2 试剂

槐果碱(质量分数≥95%)、苦参碱(质量分数≥98%)均购自盐池县都顺生物化工有限公司; 美法仑(质量分数≥95%, 苏州市立德化学有限公司); 18 α -甘草次酸(质量分数≥98%, 大连美仑生物技术有限公司); 18 β -甘草次酸(质量分数≥95%, 上海康拓化工有限公司); 乙二醇、乙二醇胺使用前均用钠丝重蒸; 二氯甲烷(CH₂Cl₂)使用前均用 CaH₂ 重蒸; 吡啶使用前用 KOH 重蒸; 二甲基亚砜(DMSO)等其余试剂均为国产分析纯。

MTT(Scientific Research Spescial 公司); RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司); 新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 人乳腺癌 MCF-7 细胞株、人肝癌 SMMC-7721 细胞株均购自 ATCC。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 13-(2-羟基)乙氧基苦参碱(1)的制备 向干燥的 100 mL 三口烧瓶中加入干燥乙二醇 30 mL, N₂ 保护下投入钠丝 0.10 g, 升温至 50 °C, 搅拌反应。待钠丝完全消失, 停止加热, 冷却至室温。取槐果碱(2.46 g, 0.01 mol)溶于 10 mL 乙二醇中, 缓慢滴入上述反应瓶中, 逐渐升温至 60 °C, TLC 跟踪反应进程, 23 h 后, 原料反应完全。向反应液中加入 10 mL 水终止反应, 用氯仿萃取(15 mL×3), 合并萃取液, 无水 Na₂SO₄ 干燥过夜, 减压浓缩得黄色油状物粗品。经柱色谱分离, 醋酸乙酯-乙醇(80:1)洗脱得淡黄色固体 2.12 g, 收率为 68.8%, R_f 值为 0.38。分子式为 C₁₇H₂₈N₂O₃, 元素分析(%): C(66.18), H(9.16), O(15.58), N(9.08); ESI-MS

m/z : 309.33 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 4.32 (1H, dd, J =12.9、4.4 Hz, He-17), 3.94 (1H, td, J =10.0、5.6 Hz, H-11), 3.80 (1H, dd, J =5.5、2.0 Hz, Ha-17), 3.68~3.65 (2H, m, H-19), 3.57~3.48 (2H, m, H-18), 3.05 (1H, m, H-13), 2.79 (2H, dd, J =16.4、13.4 Hz, He-2、10), 2.59~2.41 (3H, m, Ha-2、10, He-14), 2.26~2.19 (1H, m, H-6), 2.07 (1H, s, OH), 1.98~1.37 (14H, m, Ha-14、CH、CH₂)。与文献报道^[11]数据基本一致。

2.1.2 3-羰基-18 α -甘草次酸(2)的制备 向 100 mL 三口烧瓶中, 加入 18 α -甘草次酸(0.60 g, 1.27 mmol), 溶于 50 mL 四氢呋喃中, 冰浴条件下缓慢滴加琼斯(Jones)试剂 5 mL, 滴加结束时溶液由无色透明变为棕绿色, 继续搅拌 1.5 h, TLC 跟踪反应进程, 原料反应完全, 向反应体系中加入水 60 mL, 有白色沉淀生成, 抽滤, 滤饼用大量水多次洗涤至水洗液 pH 值为 6~7, 减压真空干燥得白色固体 0.56 g, 收率为 95.0%, R_f 值为 0.58。mp 293~295 °C。分子式为 C₃₀H₄₄O₄, 元素分析(%): C(76.76), H(9.64), O(13.61)。ESI-MS m/z : 467.5 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.74 (1H, s, H-12), 3.00~2.93 (1H, m, H-9), 2.69~2.59 (2H, m, H-18、He-2), 2.40~2.33 (2H, m, Ha-2、He-21), 2.23~2.19 (2H, m, Ha-21、He-1), 2.05~1.81 (5H, m, He-6、7、19, Ha-1, H-5), 1.69~1.52 (4H, m, Ha-19, He-15、16、22), 1.49~1.41 (4H, m, Ha-6、7、15、22), 1.38 (3H, s, 29-H), 1.32 (1H, d, J =6.3 Hz, Ha-16), 1.28 (3H, s, 25-H), 1.23 (3H, s, 27-H), 1.18 (3H, s, 23-H), 1.11 (3H, s, 26-H), 1.07 (3H, s, 24-H), 0.85 (3H, s, 28-H)。

2.1.3 3-羰基-18 β -甘草次酸(3)的制备 按照制备化合物 2 的方法制备化合物 3, 收率为 95.0%, R_f 值为 0.58。mp 307~308 °C。分子式为 C₃₀H₄₄O₄, 元素分析(%): C(76.76), H(9.64), O(13.61)。ESI-MS m/z : 467.5 [M-H]⁻。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.74 (1H, s, H-12), 3.00~2.92 (1H, m, H-9), 2.68~2.59 (2H, m, H-18、He-2), 2.40~2.32 (2H, m, Ha-2、He-21), 2.23~2.20 (2H, m, Ha-21, He-1), 2.05~1.81 (5H, m, He-6、7、19, Ha-1, H-5), 1.69~1.51 (4H, m, Ha-19, He-15、16、22), 1.49~1.41 (4H, m, Ha-6、7、15、22), 1.38 (3H, s, H-29), 1.32 (1H, d, J =6.3 Hz,

Ha-16), 1.28 (3H, s, H-25), 1.23 (3H, s, H-27), 1.18 (3H, s, H-23), 1.11 (3H, s, H-26), 1.07 (3H, s, 24-H), 0.85 (3H, s, 28-H)。与文献报道^[12]数据基本一致。

2.1.4 13-[2-(3-羰基-18 α -甘草次酰胺基)乙氧基]苦参碱(4)的制备 向100 mL三口烧瓶中,加入化合物2 (0.48 g, 1.0 mmol),溶于50 mL CH₂Cl₂中,冰浴条件下缓慢滴加草酰氯1 mL,滴加完毕后升至室温搅拌0.5 h,继续将温度升至50 °C回流反应2 h,反应完毕后浓缩得油状物,直接进行下一步反应。

于100 mL三口烧瓶中将上述油状物溶于30 mL CH₂Cl₂中,另取化合物1 (0.92 g, 3.0 mmol)和3 mL吡啶溶于20 mL CH₂Cl₂中,然后于冰浴条件下缓慢滴加到上述油状物的CH₂Cl₂液中,滴加时间约为1 h,滴加完毕后升至室温继续搅拌16 h,TLC跟踪反应进程,原料反应完全,减压浓缩得黄色油状物粗品。经柱色谱分离,石油醚-醋酸乙酯(4:3)洗脱得淡黄色固体0.20 g,收率为30.8%,Rf值为0.24。分子式为C₄₇H₇₀N₂O₆,元素分析(%):C(74.35),H(9.31),O(12.67),N(3.68)。ESI-MS m/z : 759.9 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.69 (1H, s, H-32), 4.35 (1H, d, J =11.0 Hz, He-17), 4.22 (2H, t, J =4.4 Hz, H-19), 3.99 (1H, m, Ha-17), 3.85 (1H, m, H-11), 3.67 (2H, t, J =9.6 Hz, H-18), 3.08 (1H, m, H-13), 2.99~2.91 (1H, m, He-14), 2.82 (2H, m, He-2、10), 2.70~2.42 (4H, m, H-6, He-22, H-29、38), 2.40~2.33 (1H, m, Ha-22), 2.30~2.13 (4H, m, Ha-2、10、14, He-21), 2.12~1.80 (11H, m, H-5、7、8、25、39、41, He-9、12、21), 1.65~1.36 (13H,

m, H-3、4、49, Ha-8、9、12, He-26、27、42), 1.38~1.19 (13H, m, J =16.0、12.0 Hz, Ha-26、27、42, H-35、36、45、47), 1.16 (6H, s, H-43、44), 1.09 (6H, d, J =15.0 Hz, H-46、48)。

2.1.5 13-[2-(3-羰基-18 β -甘草次酰胺基)乙氧基]苦参碱(5)的制备 按照制备化合物4的方法制备化合物5,收率32.1%,Rf值为0.24。分子式为C₄₇H₇₀N₂O₆,元素分析(%):C(74.35),H(9.31),O(12.67),N(3.68)。ESI-MS m/z : 759.9 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.69 (1H, s, H-32), 4.35 (1H, d, J =11.0 Hz, He-17), 4.22 (2H, t, J =4.4 Hz, H-19), 3.99 (1H, m, Ha-17), 3.85 (1H, m, H-11), 3.66 (2H, t, J =9.6 Hz, H-18), 3.06 (1H, m, H-13), 2.98~2.92 (1H, m, He-14), 2.82 (2H, m, He-2、10), 2.69~2.40 (4H, m, H-6、29、38, He-22), 2.39~2.32 (1H, m, Ha-22), 2.31~2.13 (4H, m, Ha-2、10、14, He-21), 2.13~1.76 (11H, m, Ha-2、10、14, He-21, H-5、7、25、39、41, He-8、9、12, Ha-21), 1.63~1.38 (13H, m, H-3、4、49, Ha-8、9、12, He-26、27、42), 1.38~1.20 (13H, m, Ha-26、27、42, H-35、36、45、47), 1.16 (6H, s, H-43、44), 1.07 (6H, d, J =15.0 Hz, H-46、48)。

目标化合物的合成路线图见图1。

2.2 体外活性试验

用MTT法测试目标化合物对人体肝癌SMMC-7721细胞和乳腺癌MCF-7细胞的体外抗肿瘤活性,以18 α -甘草次酸、18 β -甘草次酸、苦参碱和美法仑进行对照。取处于指数生长期状态良好的细胞,制成 5×10^3 /mL细胞的悬液。将细胞悬液接

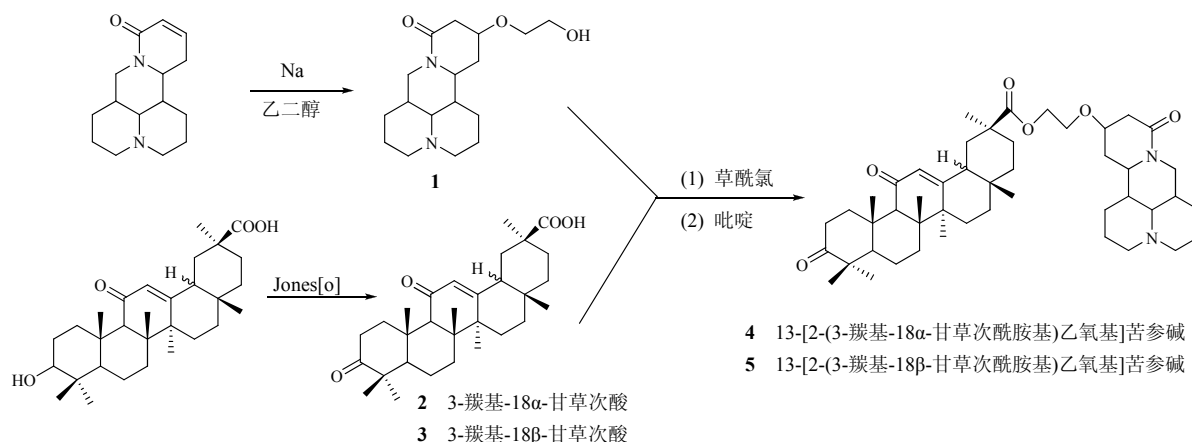


图1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of target compounds

种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL , 分样品组、对照组 (不加样品) 和空白组 (只有培养基), 每组设定 4 个复孔。置于恒温 CO_2 培养箱中培养 24 h 换液, 加入受试化合物 (化合物用 DMSO 溶解后用 PBS 稀释), 对照组浓度分别为 8.0、16.0、31.0、63.0、125.0、250.0、500.0、1 000.0、2 000.0、4 000.0、8 000.0 $\mu\text{mol/L}$, 样品组浓度分别为 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、31.0、63.0、125.0、250.0、500.0、1 000.0 $\mu\text{mol/mL}$ 。每孔 100 μL , 培养 48 h 加入 MTT, 每孔 10 μL , 于培养箱中反应 4 h 后吸去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 在平板摇床上振摇 5 min, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定每孔的吸光度 (A) 值, 计算被测物对肿瘤细胞生长的抑制率和半抑制浓度 (IC_{50})。见表 1。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{治疗}}) / A_{\text{对照}}$$

表 1 目标化合物对 SMMC-7721、MCF-7 的细胞毒活性
Fig. 1 Cytotoxic effects of target compounds on SMMC-7721 and MCF-7 cells

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	
	SMMC-7721	MCF-7
化合物 4	86.1	133.1
化合物 5	94.2	362.0
18 α -甘草次酸	126.1	235.1
18 β -甘草次酸	211.2	145.2
苦参碱	—	—
美法仑	657.0	743.2

“—”表示其 IC_{50} 值超出实验中最大给药浓度

“—”indicate beyond maximum concentration of IC_{50}

3 讨论

MTT 结果显示目标化合物 4 和 5 对人肝癌 SMMC-7721、人乳腺癌 MCF-7 细胞株的体外抗肿瘤活性明显高于母体苦参碱及甘草次酸, 优于对照药美法仑, 尤其对肝癌细胞生长产生较好的抑制作用。其中通过对比发现 18 α -甘草次酸-苦参碱复合物的抗肿瘤活性优于 18 β -甘草次酸-苦参碱复合物, 可能与蛋白结合能力有关^[13], 因其抗肿瘤活性显著, 小鼠体内的抗肿瘤实验正在进行中, 肝靶向抗癌特征有待进一步研究确证。

本实验将甘草次酸和苦参碱进行拼合, 以甘草次酸和槐果碱为原料, 经加成、氧化、酯化缩合等反应合成了目标化合物, 并经 MS 和 $^1\text{H-NMR}$ 等波

谱数据得以确证。目标化合物具有一定抗肿瘤活性, 为寻找具有肝靶向潜能的抗癌复合物做了一定的创新性工作, 为其生物活性研究奠定了物质基础。本实验设计的合成路线简单, 收率稳定, 能保证进一步研究的需要, 具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 高 军. 分子靶向药物在肝癌治疗中的应用 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(5): 560-563.
- [2] 刘 斐, 商 倩, 张士俊. 中药活性成分抗肝癌的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 624-628.
- [3] 雍建平, 张毓洪, 赵 巍, 等. 甘草次酸及甘草次酸衍生物药理活性研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3335-3337.
- [4] Luo H L, Huang W, Zhang Z L, *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca^{2+} release in human breast carcinoma cells [J]. *C-GJCO*, 2004, 3(3): 137-140.
- [5] 赵龙铨, 张晓翠, 赵春晖, 等. 甘草次酸衍生物的合成与表征 [J]. 大连大学学报, 2011, 32(3): 40-43.
- [6] 孟艳秋, 杨 哲, 张 萌, 等. 甘草次酸 C_3 、 C_{11} 、 C_{30} 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 6-10.
- [7] Lallemand B, Gelboke M, Dubois J, *et al.* Structure-activity relationship analyses of glycyrrhetic acid derivatives as anticancer agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(10): 881-887.
- [8] 木合布力·阿布力孜, 闵 杰, 热娜卡·西莫夫. 18- α 甘草次酸及其甲酯的制备 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 58-59.
- [9] 殷 飞, 赵军艳, 姚树坤. 苦参碱对肝癌 SMMC-7721 细胞 JAK-STAT 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 873-877.
- [10] 石 鹏, 刘伟中, 梁 超, 等. 苦参碱对人肝癌细胞及正常细胞增殖和粘附功能影响的比较 [J]. 江西医药, 2009, 44(10): 955-958.
- [11] 王 鹏, 陶遵威, 郑晓辉, 等. 新型酯类苦参碱衍生物的合成与体外抗肿瘤活性 [J]. 中国新药杂志, 2012, (21)21: 2547-2551.
- [12] Subba Rao G S, Kondaiah P, Singh S K, *et al.* Chemical modifications of natural triterpenes-glycyrrhetic and boswellic acids: evaluation of their biological activity [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(51): 1541-1548.
- [13] 木合布力·阿布力孜, 郑大成, 热娜·卡斯木, 等. 甘草次酸类化合物的制备和抗肿瘤活性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(2): 126-133.