

• 实验研究 •

美法仑-甘草次酸复合物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

张娜, 赵秀梅, 李冬冬, 陶遵威*

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: 目的 设计合成美法仑-甘草次酸复合物, 并对其体外抗肿瘤活性进行研究。方法 以美法仑和 18 α -甘草次酸为原料, 通过酯化、氧化、酰化和缩合反应制备目标化合物 **3a** 和 **3b**, 结构经元素分析、MS、¹H-NMR 确证, 并采用 MTT 法对其体外抗肿瘤活性进行研究, 同时考察了其正常大鼠肝细胞 BRL 和小鼠成纤维细胞 L929 的细胞毒性。结果 目标化合物 **3a**、**3b** 的体外抗肿瘤活性明显优于母体药物 18 α -甘草次酸和美法仑, 且对正常细胞的毒性小于氮芥类药物美法仑。结论 美法仑-甘草次酸复合物 **3a** 和 **3b** 抗肿瘤活性良好, 具有开发成抗肿瘤候选药物的前景。

关键词: 美法仑; 18 α -甘草次酸; 复合物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914.2; R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2016)07-0929-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.07.001

Synthesis of melphalan-glycyrrhetic acid complexes and their antitumor activity *in vitro*

ZHANG Na, ZHAO Xiu-mei, LI Dong-dong, TAO Zun-wei

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To design and synthesize melphalan-glycyrrhetic acid complexes, and evaluate its antitumor activity *in vitro*. **Methods** Melphalan and 18 α -glycyrrhetic acid were used as starting materials to synthesize the target compounds **3a** and **3b** by esterification, oxidation, acylation, and condensation reaction. The target compounds were characterized by elemental analyses, MS, and ¹H-NMR. The antitumor activities *in vitro* were evaluated by MTT method. The cytotoxicity of target compounds against normal BRL and L929 cells were also evaluated. **Results** The *in vitro* antitumor activity experiments showed that the antitumor activities of target compounds **3a** and **3b** were higher than those of parent drugs, 18 α -glycyrrhetic acid, and melphalan, and less toxicity than melphalan. **Conclusion** Melphalan-glycyrrhetic acid complexes **3a** and **3b** exhibit high antitumor activity, which have the prospect for development into anticancer drugs.

Key words: melphalan; 18 α -glycyrrhetic acid; complexes antitumor activity

美法仑为氨基酸氮芥类抗肿瘤药物, 其应用广泛、效果肯定, 属于细胞周期特异性药物^[1], 但因选择性差、毒性高等缺点限制了临床应用。氮芥基团无结构专一性, 美法仑的结构修饰只能集中在载体部分^[2]。甘草次酸是从甘草中提取的一种五环三萜类化合物, 以保肝、抗肝炎药物应用于临床, 其对肝细胞有选择性亲和力, 同时能促进肝细胞凋亡^[3-5]。为了降低美法仑的毒性和提高抗肿瘤活性, 本研究选

择肝靶向作用更强的 18 α -甘草次酸对美法仑进行载体修饰^[6]。

拼合原理是将两种药物拼合在同一分子内, 以期二者活性联合增强和毒副作用减弱^[7]。本课题组前期拼合制备了苦参碱与甘草次酸的一系列衍生物^[8-9], 结果表明氮芥的引入提高了苦参碱的活性, 其中母体 18 α -甘草次酸的活性远大于苦参碱, 18 α -甘草次酸的 3 位羰基化和酯化更能提高抗肿瘤活性。本文

收稿日期: 2016-05-17

基金项目: 天津市卫生局科技基金资助项目 (2014KY38)

作者简介: 张娜 (1982—), 女, 天津人, 硕士, 助理研究员, 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

在前期基础上进一步进行更优化拼合和改进, 将18 α -甘草次酸的3位氧化成羰基, 再与酯化保护的

美法仑通过酰化缩合得到新型美法仑-甘草次酸复合物(化合物**3a**和**3b**), 对其进行肝癌和乳腺癌细胞的抗肿瘤活性筛选, 以及考察对大鼠正常肝细胞和小鼠成纤维细胞的细胞毒性。具体合成路线见图1。

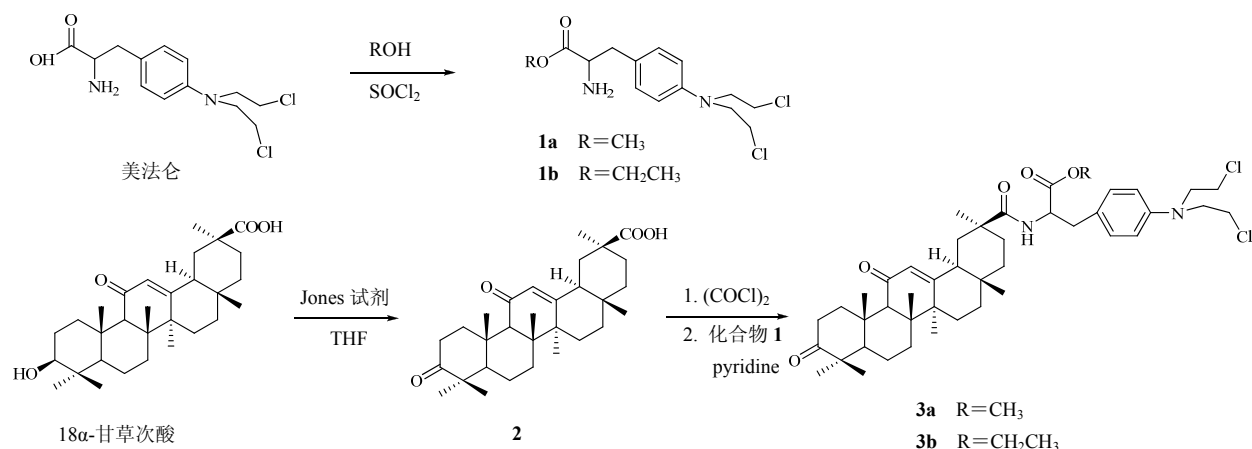


图1 目标化合物的合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of target compounds

1 仪器与试药

1.1 仪器

VGZAB-HS 型质谱仪; AC-P400 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); 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 试药

18 α -甘草次酸(质量分数 $\geq 98\%$, 大连美仑生物技术有限公司); 美法仑(质量分数 $\geq 95\%$, 苏州市立德化学有限公司); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司); 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、大鼠正常肝细胞 BRL 和小鼠成纤维细胞 L929 由天津市医药科学研究所提供, 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 合成部分

2.1.1 2-氨基-3-[4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基]-丙酸甲酯(1a)的制备 取美法仑(4.61 g, 15 mmol)于 250 mL 三口瓶中, 加入 150 mL 无水甲醇, 冰浴条件下滴加 9 mL 二氯亚砷, 并反应 1 h, 然后 55 °C 下回流反应 5 h, 减压浓缩后加入 30 mL 水, 调 pH 值到 8, 氯仿萃取, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 抽滤, 浓缩

得淡黄色固体。石油醚-醋酸乙酯(1:1)混合液进行洗脱, 柱色谱分离得目标化合物**1a**(3.56 g), 收率为 70.0%。分子式为 C₁₄H₂₀C₁₂N₂O₂, 元素分析(%): C (52.60), H (6.35), O (10.05), N (8.84); ESI-MS *m/z*: 318.5 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.08 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, Ar-H), 6.62 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH₃), 3.70~3.62 (m, 9H, CH₂Cl $\times$ 2, NCH₂ $\times$ 2, H-2), 3.02 (dd, *J*=13.7、7.2 Hz, 1H, H-1), 2.73 (dd, *J*=13.7、5.7 Hz, 1H, H-1), 1.64 (s, 2H, NH₂)。

2.1.2 2-氨基-3-[4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基]-丙酸乙酯(1b)的制备 取美法仑(4.61 g, 15 mmol)于 250 mL 三口瓶中, 加入 150 mL 无水乙醇, 其他反应步骤同上, 得到目标化合物**1b**(2.95 g), 收率为 62.0%。分子式为 C₁₅H₂₂C₁₂N₂O₂, 元素分析(%): C (54.03), H (6.66), O (9.62), N (8.41); ESI-MS *m/z*: 333.1 [M+H]⁺。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.08 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.63 (d, *J*=8.5 Hz, 2H, Ar-H), 4.18 (q, *J*=7.1 Hz, 2H, H-3), 3.73~3.60 (m, 9H, CH₂Cl $\times$ 2, NCH₂ $\times$ 2, H-2), 3.00 (dd, *J*=13.7、5.1 Hz, 1H, H-1), 2.78 (dd, *J*=13.7、7.8 Hz, 1H, H-1), 1.66 (s, 1H, NH₂), 1.27 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, CH₃-3)。

2.1.3 3-羰基-18 α -甘草次酸(2)的制备 根据文献报道^[8], 取 18 α -甘草次酸(2.4 g, 5.08 mmol)于

250 mL 三口瓶中, 加入 100 mL 四氢呋喃, 冰浴下慢慢滴加 20 mL Jones 试剂, 滴毕, 继续搅拌 3 h。加入 200 mL 水, 析出白色固体, 抽滤, 滤饼水洗至 pH 值 6~7, 浓缩得到化合物 **2** (2.24 g), 收率为 96.0%。mp 293~295 °C。分子式为 $C_{30}H_{44}O_4$, 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, $CDCl_3$) δ : 5.74 (s, 1H, H-12), 3.00~2.93 (m, 1H, H-9), 2.69~2.59 (m, 2H, H-18, He-2), 2.40~2.33 (m, 2H, Ha-2、He-21), 2.23~2.19 (m, 2H, Ha-21, He-1), 2.05~1.81 (m, 5H, He-6、7、19, Ha-1, H-5), 1.69~1.52 (m, 4H, Ha-19, He-15、16、22), 1.49~1.41 (m, 4H, Ha-6、7、15、22), 1.38 (s, 3H, H-29), 1.32 (d, 1H, $J=6.3$ Hz, Ha-16), 1.28 (s, 3H, H-25), 1.23 (s, 3H, H-27), 1.18 (s, 3H, H-23), 1.11 (s, 3H, H-26), 1.07 (s, 3H, H-24), 0.85 (s, 3H, H-28)。

2.1.4 (2-(3-羰基-18 α -甘草次酸-30-甲酰胺基)-3-[4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基]-丙酸甲酯) (**3a**) 的制备 取化合物 **2** (2.34 g, 5.0 mmol) 于 250 mL 三口瓶中, 加入 100 mL 二氯甲烷, 冰浴下慢慢滴加 4 mL 草酰氯, 室温反应 0.5 h 后回流 2 h, 浓缩得黄色油状物, 再加入 30 mL 二氯甲烷备用。另取化合物 **1a** (1.90 g, 6.0 mmol)、碳酸钾 (0.69 g, 5.0 mmol) 于 250 mL 三口瓶中, 加入 80 mL 二氯甲烷, 冰浴下慢慢滴加上步合成备用的酰氯液, 室温反应 24 h。经抽滤, 水洗, 无水 Na_2SO_4 干燥、滤过、浓缩得黄色油状物。用石油醚-醋酸乙酯(4:1)混合液进行洗脱, 柱色谱分离得白色固体 1.66 g, 收率为 43.8%。分子式为 $C_{44}H_{62}Cl_2N_2O_5$, 元素分析 (%): C (68.62), H (8.14), O (10.40), N (3.63); ESI-MS m/z : 769.4 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.00 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ar-H), 6.68 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, Ar-H), 6.01 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, NH), 5.66 (s, 1H, H-12), 4.88 (dd, $J=13.4$ 、5.9 Hz, 1H, H-31), 3.79 (s, 3H, OCH_3 -31), 3.70 (m, 4H, $CH_2Cl \times 2$), 3.62 (t, $J=6.5$ Hz, 4H, $NCH_2 \times 2$), 3.11 (dd, $J=14.3$ 、5.4 Hz, 1H, H-32), 3.02 (dd, $J=14.2$ 、6.4 Hz, 1H, H-32), 2.41 (s, 1H, H-9), 1.94~1.82 (m, 3H, 18, H-21), 1.78~1.52 (m, 13H, He-6、7、22, CH_2 , CH), 1.36 (s, 3H, H-29), 1.31~1.28 (m, 4H, H-6、7, CH_2 , CH), 1.26 (s, 3H, H-27), 1.15 (s, 3H, H-25),

1.10 (d, $J=4.3$ Hz, 6H, H-23、26), 1.07 (s, 3H, H-24), 0.78 (s, 3H, H-28)。

2.1.5 (2-(3-羰基-18 α -甘草次酸-30-甲酰胺基)-3-[4-(双 2-氯乙基)氨基-苯基]-丙酸甲酯) (**3b**) 的制备 取化合物 **1b** (2.00 g, 6.0 mmol) 代替 2.1.4 项下化合物 **1a**, 其余反应步骤同上, 得到化合物 **3b** (1.40 g), 收率为 36.2%。分子式为 $C_{45}H_{64}Cl_2N_2O_5$, 元素分析 (%): C (68.91), H (8.15), O (10.22), N (3.56); ESI-MS m/z : 783.3 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.01 (d, $J=7.9$ Hz, 2H, Ar-H), 6.66 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, Ar-H), 5.67 (s, 1H, H-12), 4.85 (dd, $J=12.9$ 、6.3 Hz, 1H, H-31), 4.23 (q, $J=7.1$ Hz, 2H, OCH_2 -31), 3.69 (t, $J=5.7$ Hz, 4H, $CH_2Cl \times 2$), 3.62 (t, $J=5.3$ Hz, 4H, $NCH_2 \times 2$), 3.11 (dd, $J=14.2$ 、5.3 Hz, 1H, H-32), 3.01 (dd, $J=14.0$ 、6.3 Hz, 1H, H-32), 2.68~2.59 (m, 1H, He-2), 2.41 (s, 1H, H-9), 2.39~2.33 (m, 1H, Ha-2), 2.19~2.13 (m, 1H, He-21), 2.05 (s, 1H, H-18), 2.03~1.98 (m, 1H, Ha-21), 1.93~1.64 (m, 10H, He-6、7、22, CH_2 , CH), 1.36 (s, 3H, H-29), 1.32~1.28 (m, 8H, Ha-6、7, CH_2 , CH), 1.26 (s, 3H, H-27), 1.15 (s, 3H, H-25), 1.09 (d, $J=4.3$ Hz, 6H, H-23、24), 1.07 (s, 3H, H-26), 0.78 (s, 3H, H-28)。

2.2 体外活性实验

采用 MTT 法测试 2 个目标化合物对人体肝癌 SMMC-7721 和人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抗肿瘤作用, 以 18 α -甘草次酸和美法仑为阳性对照, 取对数生长期的肝癌细胞 SMMC-7721 和人乳腺癌 MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L。培养 24 h 后, 每孔加入 8.0、16.0、31.0、63.0、125.0、250.0、500.0、1 000.0、2 000 μ mol/L 的目标产物和阳性对照。药物作用 48 h 后, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 继续培养 4 h 后弃去上清液, 每孔再加入 150 μ L DMSO, 振荡 5 min, 用酶标仪在波长 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算抑制率, 舍弃偏离数据, 求出半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。见表 1。同时采用 MTT 法测试目标产物对正常大鼠肝细胞 BRL 和小鼠成纤维细胞 L929 的生长抑制作用, 测定 A 值, 并计算抑制率, 见表 2。

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

由表 1 可知, 化合物 **3a** 和 **3b** 对 SMMC-7721 和 MCF-7 肿瘤细胞都有一定程度的抑制作用, 均高

表1 目标化合物对 SMMC-7721、MCF-7 的细胞毒活性

Fig. 1 Cytotoxic effect of target compounds against SMMC-7721 and MCF-7 cells

细胞	化合物	抑制率/%							IC ₅₀ /($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
		16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	63 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
SMMC-7721	3a	23.04	48.44	55.82	57.80	73.29	72.77	88.81	54.8
	3b	17.66	21.49	31.23	72.09	78.71	81.31	86.62	86.7
	18 α -甘草次酸	17.16	15.23	24.77	32.01	45.18	77.88	82.73	211.2
	美法仑	0.19	2.10	6.00	20.86	44.40	46.02	56.30	657.0
MCF-7	3a	20.16	24.99	30.84	51.64	67.42	68.47	88.26	119.0
	3b	3.45	2.28	21.97	61.29	71.03	83.40	86.26	133.0
	18 α -甘草次酸	12.96	16.37	34.66	31.73	49.81	66.84	72.07	235.1
	美法仑	1.49	1.28	3.13	11.03	24.80	35.79	54.97	743.2

表2 目标化合物对 BRL 和 L929 正常细胞毒活性

Fig. 2 Cytotoxicity of target compounds against normal BRL and L929 cells

细胞	化合物	抑制率/%				
		31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	63 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
BRL	3a	17.75	34.93	45.76	80.56	86.53
	3b	24.76	35.83	54.99	82.20	84.29
	美法仑	74.37	85.97	85.88	85.03	84.28
L929	3a	15.18	30.00	55.68	67.96	84.37
	3b	10.41	35.12	63.60	78.83	86.68
	美法仑	67.99	87.52	89.59	89.12	88.04

于母体药物 18 α -甘草次酸和美法仑,其中化合物 **3a** 和 **3b** 对 SMMC-7721 的抗肿瘤活性比对 MCF-7 更为显著。通过比较相同浓度时的抑制率得出,化合物 **3a**、**3b** 对正常大鼠肝细胞 BRL 和小鼠成纤维细胞 L929 的毒性和美法仑相比均降低。

3 讨论

本文以美法仑与 18 α -甘草次酸为原料,通过酯化、氧化、酰化和缩合反应制备目标化合物 **3a** 和 **3b**,其结构经质谱、核磁等波谱数据确证,合成路线简单易行,收率高。通过进一步的体外抗肿瘤活性实验表明目标化合物 **3a** 和 **3b** 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的活性明显优于母体药物 18 α -甘草次酸和美法仑,且对人乳腺癌 MCF-7 有一定程度的选择性,但对肝癌具有更加显著的抑制作用。同时由于拼合加入了天然产物甘草次酸还降低了对正常细胞的毒性,详细的药理活性和机制有待进一步研究。

本文将美法仑与 18 α -甘草次酸拼合成了具有一定抗肿瘤活性的复合物,降低了氮芥类药物的毒性,同时提高了甘草次酸的抗肿瘤活性,两者协同发挥

抗肿瘤作用,该复合物有望发展成疗效好、毒副作用小的新型靶向药物,具有开发成抗肿瘤候选药物的前景,为寻找肝靶向抗癌新药做了一定的基础工作,更加验证了运用拼合原理设计合成高效、低毒抗癌药物的研发思路是可行的。

参考文献

- [1] Li D, Lu B, Huang Z, *et al.* A novel melphalan polymeric prodrug: preparation and property study [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 111: 928-935.
- [2] Yang J, Wang J, Zhu S, *et al.* C-reactive protein augments hypoxia-induced apoptosis through mitochondrion-dependent pathway in cardiac myocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 310(1/2): 215-226.
- [3] Luo H L, Huang W, Zhang Z L, *et al.* 18 β -glycyrrhetic acid-induced apoptosis and relation with intracellular Ca²⁺ release in human breast carcinoma cells [J]. *Chin-German J Clin Oncol*, 2004, 3(3): 137-140.
- [4] 木合布力·阿布力孜, 郑大成, 热娜·卡斯木, 等. 18 α -和 18 β -甘草次酸甲磷酰氮芥酯的制备及结构表征 [J]. 华

- 西药学杂志, 2011, 26(4): 310-313.
- [5] 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.
- [6] 范 益, 丁建花, 刘苏怡, 等. α -和 β -甘草酸在小鼠体内分布的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(6): 619-622.
- [7] 刘 敏, 章文军, 高 宁. 拼合原理及其在新药设计中的应用 [J]. 化学试剂, 2009, 31(10): 795-797.
- [8] 张 娜, 崔晓燕, 赵秀梅, 等. 甘草次酸-苦参碱复合物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1199-1202.
- [9] 张 娜, 崔晓燕, 赵秀梅, 等. 美法仑衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(2): 115-119.