

## • 实验研究 •

 $\alpha$ -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<sup>1</sup>, 郑丽丽<sup>1</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 陈晓艳<sup>2\*</sup>

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -常春藤皂苷的 28 位羧基和呋喃氮氧化物连接在一起得到  $\alpha$ -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  $\alpha$ -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物, 其结构均通过 <sup>1</sup>H-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  $\alpha$ -常春藤皂苷。结论  $\alpha$ -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  $\alpha$ -hederin and their antitumor activitiesLEI Ming-dao<sup>1</sup>, ZHENG Li-li<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>1</sup>, CHEN Xiao-yan<sup>2</sup>

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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -hederin. The anti-breast cancer activities were determined by MTT assays. **Results** The four nitric oxide-donating derivatives of  $\alpha$ -hederin were synthesized and the structures had been confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and MS spectra. The biological results showed that they displayed the better biological effect than  $\alpha$ -hederin. **Conclusion** The nitric oxide-donating derivatives of  $\alpha$ -hederin have good antitumor activities, which has the further development value.

**Key words:**  $\alpha$ -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  $\alpha$ -常春藤皂苷是 1 个典型的五环三萜类皂苷<sup>[1-3]</sup>, 结构中含有鼠李糖和阿拉伯糖,  $\alpha$ -常春藤皂苷的化学结构见图 1。在前期研究中发现  $\alpha$ -常春藤皂苷具有很

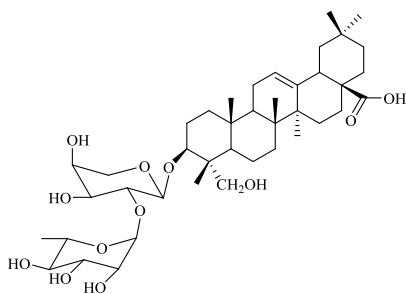
好的抗肿瘤作用, 尤其对乳腺癌具有很好的抑制作用, 但是化合物也存在着缺点, 尤其是强的溶血性使得动物给药剂量无法提高, 肿瘤抑制率不能达到 60% 以上, 这些缺点限制了  $\alpha$ -常春藤皂苷作为候选药物的进一步开发。最近的研究发现高浓度的一氧化氮 (NO) 具有很好的抗肿瘤作用。因此本研究计划在  $\alpha$ -常春藤皂苷上接上 NO 供体, 当药物到达肿

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  $\alpha$ -常春藤皂苷的化学结构Fig. 1 Chemical structure of  $\alpha$ -hederin

瘤部位后释放出 NO 和  $\alpha$ -常春藤皂苷, 以实现  $\alpha$ -常春藤皂苷和 NO 协同抗肿瘤作用, 提高  $\alpha$ -常春藤皂苷的肿瘤抑制率<sup>[4-6]</sup>。在各种 NO 供体中, 呋咱氮氧化物能够释放大量的二氧化氮, 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  $\alpha$ -常春藤皂苷的 28 位羧基和呋咱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。 $\alpha$ -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 mmol), 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  $\alpha$ -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%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.06 (d,  $J=7.7$  Hz, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.86 (t,  $J=7.4$  Hz, 1H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.73 (t,  $J=7.9$  Hz, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 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, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.51~4.47 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.44 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H, H-11), 4.26~4.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.26~2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.23 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H, H-6II), 1.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>),

0.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 1 033.240 3 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **6b**: 收率 65.1%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.04~8.03 (m, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.84~7.82 (m, 1H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.70~7.68 (m, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 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, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.41 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H, H-11), 4.14~4.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.97~1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.86~1.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.20 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H, H-6II), 1.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 1 047.261 3 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **6c**: 收率 62.3%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.09~8.04 (m, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.87~7.85 (m, 1H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.76~7.71 (m, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 5.24 (s, 1H, H-12), 5.19 (s, 1H, H-11), 5.16~5.14 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.49 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.45 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H, H-11), 4.40 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.26~2.19 (m,

1H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.13~2.09 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.33 (d,  $J=2.5$  Hz, 3H, CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.25 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H, H-6II), 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 1 047.261 6 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **6d**: 收率 59.4%。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 8.08 (d,  $J=7.4$  Hz, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.86 (t,  $J=7.6$  Hz, 1H, SO<sub>2</sub>Ph), 7.72 (t,  $J=8.1$  Hz, 2H, SO<sub>2</sub>Ph), 5.97~5.90 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 5.27 (t,  $J=3.2$  Hz, 1H, H-12), 5.19 (s, 1H, H-11), 5.11 (d,  $J=5.8$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 4.76 (dd,  $J=6.6$ 、13.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 4.68 (dd,  $J=6.1$ 、13.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 4.45 (d,  $J=7.7$  Hz, 1H, H-11), 1.24 (d,  $J=6.2$  Hz, 3H, H-6II), 1.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)。HR-ESI-MS  $m/z$ : 1 045.252 8 [M+H]<sup>+</sup>。

$\alpha$ -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成路线见图2。

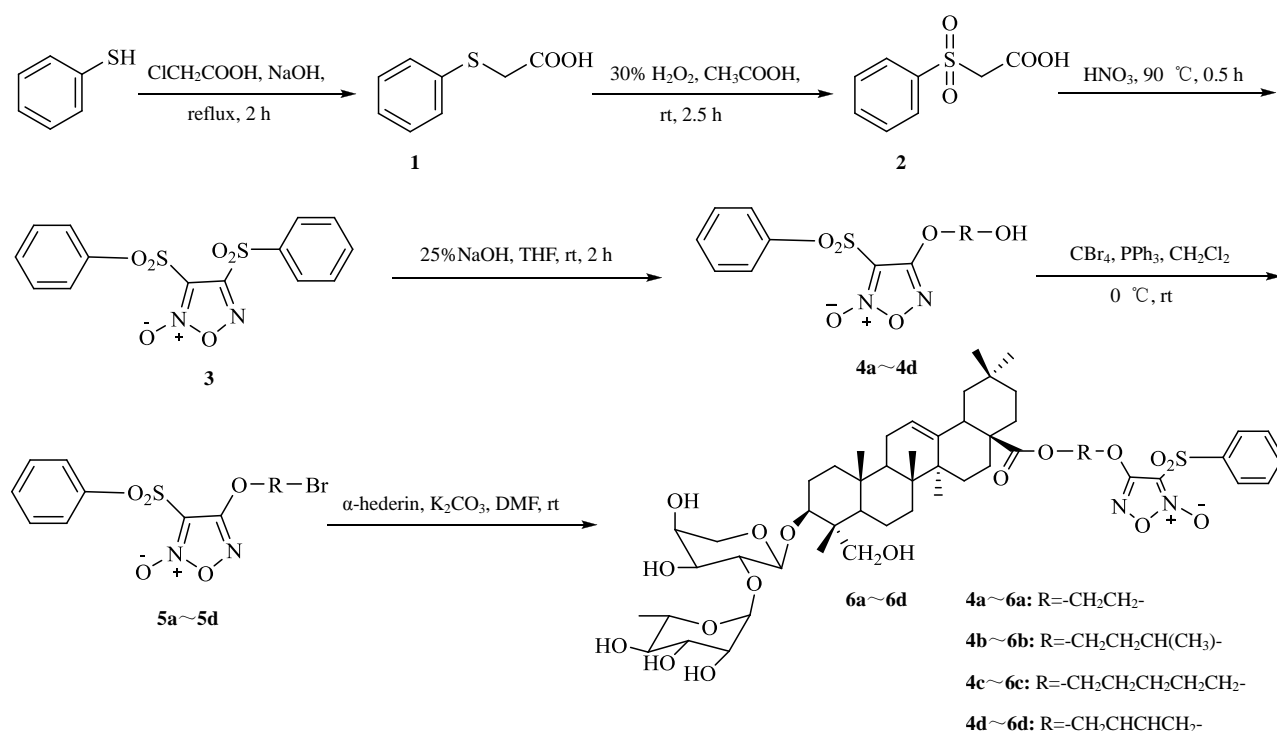


图2  $\alpha$ -常春藤皂苷一氧化氮供体衍生物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of nitric oxide-donating derivatives of  $\alpha$ -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%CO<sub>2</sub>, 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  $5 \times 10^4$  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  $\alpha$ -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 (IC<sub>50</sub>) 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  $\alpha$ -常春藤皂苷好, 其中化合物 **6a** 抑制肿瘤的活性最强。

表 1  $\alpha$ -hederin 及其衍生物的体外活性实验结果

Table 1 *In vitro* activity test results of  $\alpha$ -hederin and its derivative

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )				
	MCF7 细胞	T47D 细胞	ZR75-1 细胞	MB231 细胞	MB453 细胞
<b>6a</b>	3.2±0.4	2.9±0.4	1.8±0.1	1.3±0.2	2.3±0.3
<b>6b</b>	3.8±0.5	3.1±0.3	2.3±0.5	2.1±0.3	3.1±0.5
<b>6c</b>	4.5±0.7	2.6±0.2	1.6±0.2	3.8±0.5	2.9±0.2
<b>6d</b>	4.2±0.3	4.3±0.2	3.6±0.3	3.2±0.3	4.1±0.4
$\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -常春藤皂苷溶血性的来源, 因此为降低  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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。

$\alpha$ -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  $\alpha$ -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.