

· 化学成分 ·

桔梗细胞悬浮培养体系对斑蝥素的生物转化研究

叶 敏,戴均贵,果德安*

(北京大学药学院 中医药现代研究中心,北京 100083)

摘 要: 目的 研究桔梗细胞悬浮培养体系对抗癌天然活性成分斑蝥素的生物转化,以获得具有新颖结构的斑蝥素衍生物。方法 往桔梗悬浮培养体系中加入斑蝥素并培养 6 d,培养液经萃取后采用色谱方法进行分离纯化,产物的结构根据光谱数据予以鉴定。结果 分离得到了以 2∶1 比例混合存在的两个转化产物。经光谱分析,两个产物鉴定为羰基还原为羟基的一对差向异构体 β -羟基斑蝥素(II_a)及 1α -羟基斑蝥素(II_b)。结论 II_a和 II_b均为未见报道的新化合物。桔梗细胞培养体系对斑蝥素具有较强的选择性还原作用,此转化反应可用于斑蝥素衍生物的制备。

关键词: 斑蝥素;桔梗;细胞悬浮培养;生物转化

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)10-0869-03

Biotransformation of cantharidin by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorus*

YE Min, DAI Jun-gui, GUO De-an

(School of Pharmaceutical Sciences and Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract **Object** To investigate the biotransformation of cantharidin by cell suspension cultures of *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. **Methods** Cantharidin was added into cell suspension cultures of *P. grandiflorus* and incubated for another six days. The culture supernatant was extracted with EtOAc and then subjected to silica gel chromatography. **Results** Two products were isolated as a mixture in a molar ratio of about 2∶1. Their structures were identified on the basis of spectroscopic data as β -OH-cantharidin (II_a) and 1α -OH-cantharidin (II_b). The relative configuration was elucidated according to NOESY spectrum. **Conclusion** The two products were new cantharidin derivatives.

Key words cantharidin; *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC.; cell suspension culture; biotransformation

斑蝥为芫青科昆虫南方大斑蝥 *Mylabris phalerata* Pallas 或黄黑小斑蝥 *M. cichorii* Linnaeus 的干燥体,属传统中药,早在《神农本草经》中就有记载。具有破血消瘀、攻毒蚀疮等功效,中医临床用于治疗瘰疬肿块、积年顽癣等病症^[1]。现代研究表明,斑蝥的主要有效成分为斑蝥素(cantharidin)。该成分具有显著的抗肿瘤活性,对原发性肝癌、腹水型肝癌、S₈₀实体瘤等均具有显著疗效,其机制主要是通过诱导细胞凋亡^[2]。与一般抗肿瘤药物不同的是,斑蝥素在抑制肿瘤的同时,还可促进骨髓产生白细胞^[3]。因此,这类成分的深入研究对于发现新型抗肿瘤药物具有重要意义。但是,临床观察表明斑蝥素

对黏膜组织表现出强烈的毒性和刺激作用,尤其是胃肠道、尿道和肾脏^[4]。这些不良反应严重影响了斑蝥素的临床应用。迄今,有机化学家已合成了大量的斑蝥素衍生物,以期发现更为安全有效的药物。此类研究主要是针对于斑蝥素结构中的桥头碳原子以及酸酐键的开裂^[5~7]。遗憾的是,此类衍生物的抗肿瘤活性大多不太理想。

生物转化是利用生物体系产生的酶对外源化合物进行的酶催化反应。由于通过生物转化往往能得到化学合成难以获得的新颖结构,此技术在天然产物及其他有机化合物的结构改造研究中已显得越来越重要^[8]。斑蝥素的生物转化目前尚未见到报道。本

* 收稿日期: 2002-12-16

基金项目: 国家杰出青年基金(39925040); 教育部跨世纪优秀人才基金

* 通讯作者 Tel (010) 62091516 E-mail gda@bjmu.edu.cn

文采用桔梗细胞悬浮培养体系,对斑蝥素这一来源于动物的天然活性成分进行了生物转化研究

1 材料与试剂

1.1 仪器与试剂: Avatar 360型傅里叶红外光谱仪测定; Bruker DRX-500型核磁共振仪测定; MS为 Finnigan MAT-90及 Bruker BIFLEX III型质谱仪。柱色谱用硅胶(200~300目)购自青岛海洋化工厂。石油醚(60℃~90℃),醋酸乙酯,丙酮均为分析纯,北京化工厂产品。

1.2 药品(底物): 斑蝥素购自中国药品生物制品检定所,用前以丙酮溶解,配成 5 mg/mL 的溶液

1.3 细胞培养: 桔梗细胞悬浮培养体系诱导自桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 的幼嫩叶和茎段。细胞体系的建立及培养参照文献^[9]。所用培养基为 MS培养基,另加 0.5 mg/L NAA(α-萘乙酸), 0.5 mg/L 6-BA(6-苄基腺嘌呤), 0.2 mg/L 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)及 3%蔗糖。培养基于灭菌前调 pH值为 5.8 继代时往 500 mL三角瓶(盛 200 mL培养基)中接入约 2.0 g/L细胞(干重),于黑暗条件下室温振荡培养,摇床转速为 110 r/min,每两周继代一次

2 实验方法

2.1 转化反应预试: 往预培养 4 d的桔梗悬浮细胞(500 mL)中加入 5 mg/mL斑蝥素丙酮溶液 0.5 mL,继续培养 6 d后,用等体积醋酸乙酯萃取 3次,萃取液合并,40℃减压浓缩至干,残渣以 1 mL丙酮溶解,作为样品溶液。取该溶液进行硅胶薄层色谱, TLC条件为石油醚-丙酮(4:1),展开后挥尽展开剂,置碘蒸汽中显色,斑蝥素与产物均呈淡黄色斑点。另设对照组,往桔梗悬细胞中加入等量丙酮,其余操作同前

2.2 制备生物转化试验: 往预培养 4 d的桔梗悬浮培养细胞中加入 5 mg/mL斑蝥素丙酮溶液 1.0 mL,共用 4瓶细胞。同 2.1所述,继续培养 6 d后用醋酸乙酯萃取,浓缩所得残渣以丙酮溶解,与少量硅胶拌合,晾干。该样品行硅胶柱色谱(200~300目, 10 g, 1.5 cm×25 cm),洗脱剂为石油醚-丙酮(4:1),分别得到无色细针状结晶 I (3 mg)和 II (8 mg, 得率 40%)。

3 结果与讨论

在转化预试验中,样品液经 TLC分析,用碘蒸汽显色,薄层板上在与斑蝥素相应的位置(Rf 0.40)及其下方(Rf 0.25)处均呈淡黄色斑点,而在对照组样品中则未见相应斑点,表明斑蝥素在桔梗悬浮培

养体系中有转化反应发生。

往桔梗悬浮培养体系中投入 20 mg斑蝥素,进行制备转化试验,细胞液经提取分离,得到 3 mg未转化的底物斑蝥素 I,以及 8 mg产物 II。其结构根据光谱数据予以鉴定(图 1)。

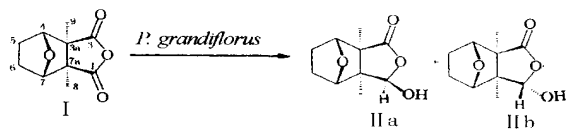


图 1 桔梗细胞悬浮培养体系对斑蝥素的生物转化反应

Fig. 1 Biotransformation of cantharidin by cell suspension culture of *P. grandiflorus*

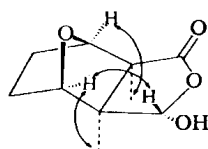


图 2 化合物 II b 的主要 NOE 增益关系

TOF-MS显示其 $[M+H]^+$ 峰为 199.1 m/z,表明 II 的相对分子质量为 198,比斑蝥素大 2。其 1H -NMR与 ^{13}C -NMR谱中信号均以大约 2:1 的比例成对出现,提示 II 为摩尔比为 2:1 的一对异构体混合物,二者结构非常相似,其中量大者为 II a,量小者为 II b

Fig. 2 Key NOE 1H -NMR谱中, II a和 II b 均呈现出二个甲基氢信号,表明其结构已失去了斑蝥素的对称性。在 ^{13}C -NMR谱中, II a, II b 均仅见一个酯羰基信号,而分别在 δ 105.4

和 δ 103.2 出现两个饱和叔碳信号。根据 HSQC 谱,其对应的氢信号分别为 δ 5.37(1H, s)和 δ 5.61(1H, s),可推断此为同时与两个氧原子相连的碳。据此,可确定 II a和 II b 为羰基还原为羟基的斑蝥素衍生物,二者结构的差别仅在于羟基的构型不同。根据 NOESY 谱, II b 的 H-1 信号(δ 5.61)与 H-7(δ 4.36)有 NOE增益,表明 H-1 处于 β 构型,即 II b 为 α -OH 衍生物,则 II a 为 β -OH 衍生物(图 2)。II a 中 H-1(δ 5.37)与 8-CH₃(δ 1.09)之间的 NOE增益亦证明其 H-1 处于 α 构型。据以上推导, II a 的结构鉴定为 β 羟基斑蝥素(β -OH cantharidin), II b 为 α 羟基斑蝥素(α -OH cantharidin),二者均为新化合物,其 1H -NMR, ^{13}C -NMR信号根据 DEPT, HSQC及 HMBBC谱予以归属^[10]。

II a 1H -NMR(500 MHz, CDCl₃, δ): 5.37(1H, s, H-1), 4.73(1H, d, J = 4.5 Hz, H-7), 4.58(1H, d, J = 4.5 Hz, H-4), 1.6~1.8(4H, m, H-5, H-6), 1.13(3H, s, 9-CH₃), 1.09(3H, s, 8-CH₃); ^{13}C -NMR(125 MHz, CDCl₃, δ): 179.9(s, C-3), 105.4(d, C-

1), 83. 2(d, C-4), 82. 1(d, C-7), 54. 1(s, C-7a), 52. 4(s, C-3a), 24. 2(t, C-6), 22. 5(t, C-5), 15. 4(q, C-8), 14. 5(q, C-9).

II b $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , δ): 5. 61(1H, s, H-1), 4. 51(1H, d, $J=5.0$ Hz, H-4), 4. 36(1H, d, $J=5.0$ Hz, H-7), 1. 6~1. 8(4H, m, H-5, H-6), 1. 14(3H, s, 9-CH₃), 1. 01(3H, s, 8-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , δ): 179. 9(s, C-3), 103. 2(d, C-1), 86. 5(d, C-7), 84. 5(d, C-4), 55. 2(s, C-7a), 52. 2(s, C-3a), 24. 1(t, C-5), 23. 5(t, C-6), 13. 1(q, C-9), 11. 2(q, C-8); EI-MS (m/z , rel. int.): 169(7. 1), 153(4. 5), 112(62. 3), 96(100. 0); TOF-MS (m/z): 199. 1[M⁺ H⁺].

II a及II b结构中的 1-OH 属半缩醛羟基,性质活泼,在溶液状态下易发生翻转,故二者以混合物的形式存在,难以分离。

McCluskey 曾用 Pd/C 加氢还原的方法,以去甲斑蝥素为底物制备得到类似的加氢产物 III,亦为一混合物(图 3)^[3]。抗肿瘤试验结果表明,III 对于大肠癌细胞株表现出显著的选择性细胞毒活性,提示加氢反应对于斑蝥素类似物的抗肿瘤作用具有一定的意义。本实验中得到的产物尚有待作抗肿瘤活性测试。

作者曾尝试桔梗、长春花、连翘等多种植物细胞悬浮培养体系,结果表明桔梗体系对斑蝥素的转化比较完全。Gao 等报道了酵母菌对酮基的加氢还原

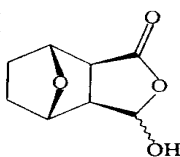


图 3 化合物 III 的化学结构式

Fig. 3 Chemical structure of compound III

反应^[11],本文则采用桔梗细胞悬浮培养体系得到了类似结果,提示这些生物体系中存在相似的还原酶。

References

- [1] Ch P (中国药典) [J]. 2000 ed. Vol I .
- [2] Jin W, Wang Y W, Zhou Z X, *et al.* The effects of cantharidin on HL-60 and QGY7703 cell lines [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2001, 29(4): 42-43.
- [3] McCluskey A, Bowyer M C, Collins E, *et al.* Anhydride modified cantharidin analogues: synthesis, inhibition of protein phosphatases 1 and 2A and anticancer activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10: 1687-1690.
- [4] Wang C C, Wu C H, Hsieh K J, *et al.* Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells [J]. *Toxicology*, 2000, 147: 77-87.
- [5] McCluskey A, Keane M A, Mudgee L M, *et al.* Anhydride modified cantharidin analogues. Is ring opening important in the inhibition of protein phosphatase 2A [J]. *Eur J Med Chem*, 2000, 35: 957-964.
- [6] McCluskey A, Walkom C, Bowyer M C, *et al.* Cantharimides: new class of modified cantharidin analogues inhibiting protein phosphatases 1 and 2A [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2941-2946.
- [7] Essers M, Wibbeling B, Haufe G. Synthesis of the first fluorinated cantharidin analogues [J]. *Tetrahedron Lett*, 2001, 42: 5429-5433.
- [8] Loughlin W A. Biotransformation in organic synthesis [J]. *Bioresource Technol*, 2000, 74: 49-62.
- [9] Dai J G, Gong Z, Zhu D M, *et al.* Biotransformation of gasterodin by *Catharanthus roseus* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2002, 44(3): 377-378.
- [10] Chen D C. *Handbook for CMM Chemical Reference Substances* (中药化学对照品工作手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2002.
- [11] Gao X, Zhou G, Guan Y K, *et al.* Baker's yeast mediated reduction of optically active diketone [J]. *Chin Chem Lett* (中国化学快报), 2001, 12: 291-292.

《中药新药与临床药理》杂志 2004年征订启事

《中药新药与临床药理》杂志是由国家食品药品监督管理局主管,广州中医药大学主办的一份学术性杂志,为中国科技论文统计源期刊,标准刊号 ISSN 1003-9783, CN 44-1308/R,国内外公开发行。

以《药品管理法》和《新药审批办法》为办刊宗旨,积极宣传和报道中药新药及临床药理的研究成果和进展。主要报道中药新药和临床药理研究的新成果、新技术、新方法、新经验和新思路,是中药新药开发和中药临床药理研究的核心刊物。主要栏目有:论坛、专题报道、专家笔谈、临床研究、临床用药、药效及毒理学研究、质量分析研究、工艺研究、中药现代化、中药指纹图谱研究、不良反应与合理用药、新药介绍、新技术与新方法、讲座、学术探讨、综述、论著摘要、药政法规、企业之窗、信息、书评、国外药事、简讯等。

本刊为双月刊,逢单月 25 日出版,每册订价 10 元,全年 60 元,邮发代号: 46-210。欢迎各有关单位及广大读者及时向当地邮局订阅本刊,读者尚可直接向编辑部补购近年的合订本。

开户银行:中国农业银行广州市景泰办事处 帐号: 44-067501040000058 帐户: 中药新药与临床药理编辑部

国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,本刊代号 4647BM)

编辑部地址: 广州市机场路 12 号大院《中药新药与临床药理》编辑部 邮编: 510405

编辑部电话: (020) 36585483 36585613 86552367 E-mail: zxl@adr.com.cn; zyxyk@pub.guangzhou.gd.cn