

番荔枝内酯类化合物对耐阿霉素乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 体外活性的影响

袁 斐, 白钢钢, 苗筠杰, 陈 勇, 陈建伟, 李 祥*

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 研究 15 种番荔枝内酯类化合物对耐阿霉素乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 的活性, 并初步探讨其构效关系。方法 MTT 法检测 15 种番荔枝内酯化合物: annotemoyin-1 (1)、annosquamin B (2)、annosquamin A (3)、annosquamin C (4)、annosquacin C (5)、urarigrandin A (6)、isodesacetylurvaricin (7)、annosquacin D (8)、annosquacin B (9)、12, 15-*cis*-squamosstatin-A (10)、squamosstatin-A (11)、squamosstanin-B (12)、squamosstanin-A (13)、squamosstatin-D (14)、squamosstatin-E (15) 对 MCF-7/ADR 细胞的抑制作用。结果 所有受试化合物对 MCF-7/ADR 细胞均有强烈的抑制活性, 且活性强于阳性药维拉帕米, 化合物 1 的活性达到维拉帕米的 190 倍之多。结论 四氢呋喃环与内酯环间的碳数越长, 活性越强; 链上羟基越多, 活性越强; 间双四氢呋喃型番荔枝内酯中, 链上含有 4 个羟基的活性最强; 相对构型为赤式的番荔枝内酯的活性比苏式的强, 四氢呋喃环为反式构型的番荔枝内酯的活性比顺式的强。此外, 相对分子质量为 622, 链上含有 3 个羟基, 相对构型为赤式的邻双四氢呋喃型番荔枝内酯活性显著。

关键词: 番荔枝内酯; 多药耐药; 肿瘤; MCF-7/ADR; 构效关系

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)19-2815-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.016

Effects of annonaceous acetogenins against multidrug resistant human breast cancer cell line MCF-7/ADR *in vitro*

YUAN Fei, BAI Gang-gang, MIAO Yun-jie, CHEN Yong, CHEN Jian-wei, LI Xiang

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the effects of 15 annonaceous acetogenins (ACGs) on human breast cancer cell line MCF-7/ADR, and to find out their structure-activity relationship. **Methods** MCF-7/ADR cells were treated with 15 ACGs such as annotemoyin-1 (1), annosquamin B (2), annosquamin A (3), annosquamin C (4), annosquacin C (5), urarigrandin A (6), isodesacetylurvaricin (7), annosquacin D (8), annosquacin B (9), 12, 15-*cis*-squamosstatin-A (10), squamosstatin-A (11), squamosstanin-B (12), squamosstanin-A (13), squamosstatin-D (14), and squamosstatin-E (15) for 48 h, and the inhibition on MCF-7/ADR cells was detected using MTT assay. **Results** All the tested compounds showed significant inhibitory activities against MCF-7/ADR cells, and were more potent than the standard control verapamil. The activity of compound 1 was 190 times higher than that of verapamil. **Conclusion** The ACGs with more carbons between tetrahydrofuran (THF) ring and γ -unsaturated lactone are more potent. If all other structural features are identical, the ACGs with more hydroxyls on aliphatic chain would be more active, and four hydroxyls might be optimal among bis-nonadjacent-THF ACGs. Moreover, ACGs with stereochemical arrangement of *erythro* are more active than those of *threo*, and the compounds with THF ring configuration of *cis* seem to be superior to those of *trans*. Furthermore, bis-adjacent-THF ACGs with molecular weight of 622 and with three hydroxyl groups and stereochemical arrangement of *erythro* partly produce notable cytotoxicity.

Key words: annonaceous acetogenins; multidrug resistance; tumor; MCF-7/ADR; structure-activity relationships

肿瘤细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR) 胞在接触一种化疗药物后, 不仅对这种药物具有耐
是人类癌症化疗失败的主要原因之一, 是指肿瘤细 药性, 同时对其他结构及作用机制不同的化疗药物

收稿日期: 2013-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274057、81403082); 国家教育部博士点专项基金资助项目(20113237110009); 江苏省科技厅资助项目(SBK2012853); 2012年江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(588); 南京中医药大学青年自然科学基金(13XZR23)

作者简介: 袁 斐(1990—), 女, 江苏人, 硕士研究生在读, 研究方向为中药活性成分的基础研究及应用。

Tel: 15195984239 E-mail: yuanfei201092@126.com

*通信作者 李 祥 Tel: 13913925677 E-mail: lixiang_8182@163.com

也产生交叉耐药的现象。目前认为产生 MDR 的机制主要有: 转运蛋白过度表达^[1-3]、多药耐药相关酶表达异常^[4-5]、DNA 损伤修复能力异常、控制细胞凋亡的相关基因异常等。从番荔枝科植物番荔枝中分离得到的番荔枝内酯是一类含 35~37 个碳原子的长链化合物, 其末端含有一个甲基取代的或经重排的 α , β -不饱和 γ -内酯环, 分子中有 0~3 个四氢呋喃环。此外, 碳链上有多种类型的取代基, 如羟基、乙酰基等。这些化合物中通常含有多个手性碳, 因此立体化学结构复杂^[6-9]。已有文献报道, 番荔枝内酯化合物能够抑制耐药肿瘤细胞的生长^[10]。其机制可能与抑制线粒体呼吸链传递, 使细胞产生的能量受阻^[11-12], 诱导肿瘤细胞凋亡^[13], 从而杀死肿瘤细胞有关。

番荔枝内酯类化合物结构复杂, 其结构与抑制耐药肿瘤细胞活性之间的关系值得深入研究。本实验选用分离得到的 15 个番荔枝内酯类化合物, 主要考察结构中四氢呋喃环与 γ -内酯环两环间的碳数、羟基个数、四氢呋喃环的相对构型及绝对构型与抑制耐阿霉素乳腺癌 MCF-7/ADR 细胞生长活性的相关性, 以期为临床治疗找到一种高活性抗多药耐药性肿瘤的化合物结构模型。

1 材料

15 个番荔枝内酯化合物: annotemoyin-1 (1)、annosquamin B (2)、annosquamin A (3)、annosquamin

C (4)、annosquacin C (5)、urarigrandin A (6)、isodesacetyluvaricin (7)、annosquacin D (8)、annosquacin B (9)、12, 15-*cis*-squamostatin-A (10)、squamostatin-A (11)、squamostatin-B (12)、squamostatin-A (13)、squamostatin-D (14)、squamostatin-E (15) (表 1、图 1) 均为本实验室前期分离得到, 经 HPLC-DAD 检测, 质量分数均 > 98%。盐酸维拉帕米注射液, 批号 121101, 上海禾丰制药有限公司; 顺铂, 批号 2WA2A1307047B, 齐鲁制药有限公司; 阿霉素, 批号 130707, 浙江海正药业股份有限公司。MCF-7/ADR 细胞购自中国药科大学。RPMI 1640 培养基, Gibco; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技有限公司; 胰蛋白酶, Biosharp 公司; 青链霉素混合液 (100 X)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、MTT、EDTA, 均购自北京索来宝科技有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 分析纯, 无锡海硕生物有限公司。酶标仪, BIO-RAD。

2 方法

2.1 MCF-7/ADR 细胞培养

MCF-7/ADR 细胞株在含 5 $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素、10% 胎牛血清及 1% 青链霉素混合液的 RPMI 1640 培养基中培养 1 周, 再换成不含阿霉素的培养液培养 2 周后开始实验。细胞置于 CO_2 培养箱中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 条件下培养。

表 1 化合物 1~15 的结构特征

Table 1 Structure characteristics of compounds 1—15

化合物	-OH 位置	两环间碳数	相对构型	分子式	相对分子质量
1	17, 22	15	苏式/反式/苏式	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_5$	564
2	11, 16	9	苏式/反式/赤式	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_5$	564
3	9, 14	7	苏式/反式/赤式	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_5$	564
4	9, 14	7	苏式/反式/苏式	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_5$	564
5	11, 20, 23	9	苏式/反式/苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	622
6	5, 15, 24	13	苏式/反式/苏式/反式/苏式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	622
7	15, 24	13	苏式/反式/苏式/反式/苏式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_6$	606
8	13, 22	11	苏式/反式/苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_6$	606
9	11, 20	9	苏式/反式/苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_6$	606
10	16, 19, 24, 28	9	顺式/苏式-苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	638
11	16, 19, 24, 28	9	反式/苏式-苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	638
12	15, 18, 23, 27	8	反式/苏式-苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	638
13	15, 18, 23, 27	8	反式/苏式-苏式/反式/苏式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	638
14	16, 19, 24	9	反式/苏式-苏式/反式/赤式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	622
15	16, 19, 24	9	反式/苏式-苏式/反式/苏式	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	622

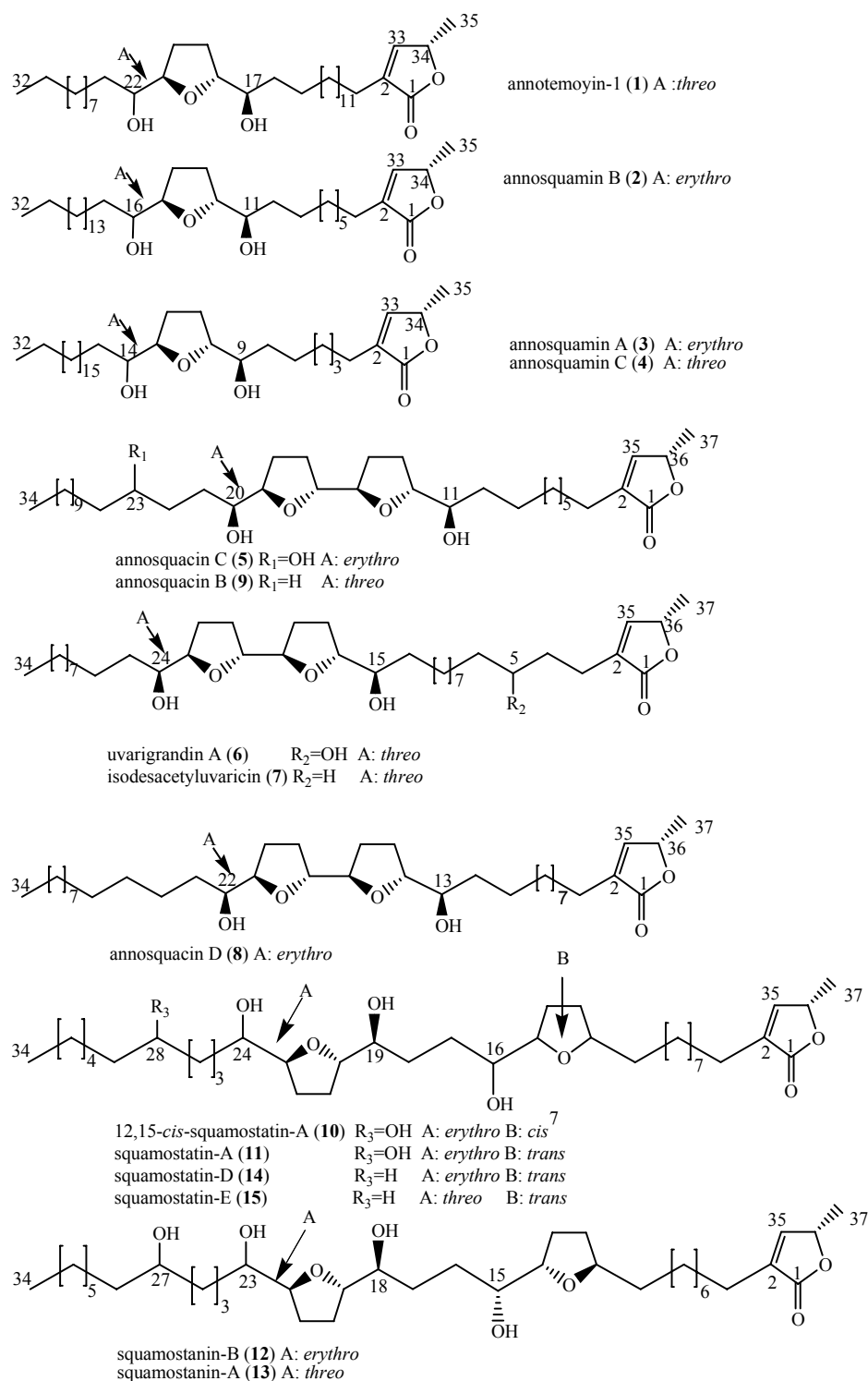


图 1 化合物 1~15 结构

Fig. 1 Structures of compounds 1—15

2.2 MTT 实验

取对数生长期细胞，确定活细胞数大于 90%。用 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板，200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，每孔细胞数约为 1×10^4

个。将细胞分为阴性对照组（细胞用培养基）、溶剂对照组（细胞用含 0.1% DMSO 的培养基处理）、给药组（细胞用 50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25、0.390 625 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度的药物处理）。

培养 24 h 后, 将上清液吸出, 给药组加入 200 μL 含各浓度梯度的番荔枝内酯化合物的培养基, DMSO 体积分数 $<0.1\%$ 。然后将 96 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 48 h。随后每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 20 μL , 继续培养 4 h。然后轻轻吸出 96 孔板中培养液, 加入 DMSO, 150 μL /孔。震荡摇匀 10 min, 使结晶物充分溶解, 并在 490 nm 波长处用酶标仪测定各孔吸光度 (A) 值。实验中采用顺铂和维拉帕米作为阳性对照。采用直线回归法计算药物对 MCF-7/ADM 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。实验重复 3 次。

细胞抑制率 = $1 - \text{实验孔 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$

3 结果

3.1 对耐药细胞的抑制活性

化合物 1~15 对 MCF-7/ADR 细胞均有较强的抑制作用, 其中化合物 1 的活性最强, 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50} 达到维拉帕米的 190 倍之多, 达到顺铂的 270 倍之多, 见表 2。

表 2 化合物 1~15 对 MCF-7/ADR 细胞的 IC_{50}
Table 2 IC_{50} values of compounds 1—15

化合物	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
annotemoyin-1 (1)	0.85 ± 0.08
annosquamin B (2)	1.40 ± 0.19
annosquamin A (3)	18.90 ± 1.62
annosquamin C (4)	19.72 ± 2.06
annosquacin C (5)	6.32 ± 0.45
uvarigrandin A (6)	6.48 ± 0.77
isodesacetylurarin (7)	12.00 ± 1.89
annosquacin D (8)	12.19 ± 1.52
annosquacin B (9)	14.69 ± 1.89
12, 15- <i>cis</i> -squamosstatin-A (10)	5.66 ± 0.66
squamosstatin-A (11)	9.64 ± 1.05
squamosstanin-B (12)	17.52 ± 1.95
squamosstanin-A (13)	19.11 ± 2.08
squamosstatin-D (14)	22.30 ± 2.56
squamosstatin-E (15)	26.54 ± 2.93
维拉帕米	165.52 ± 20.41
顺铂	232.36 ± 30.34

3.2 构效关系分析

根据 15 个受试化合物对耐药细胞的 IC_{50} 值, 结构相似的化合物进行对比分析。

3.2.1 四氢呋喃环与内酯环间的碳数对化合物活

性的影响 由表 2 可见, 单四氢呋喃型番荔枝内酯化合物中, 化合物 1 (两环间碳数为 15 个) 的活性约为化合物 4 (两环间碳数为 7 个) 的 23 倍, 此外, 化合物 2 (两环间碳数为 9 个) 的活性也达到化合物 3 (两环间碳数为 7 个) 的 13 倍。在邻双和间双型番荔枝内酯类化合物中, 化合物 8 (两环间碳数为 11 个) 的活性比化合物 9 (两环间碳数为 9 个) 强, 化合物 11 (两环间碳数为 9 个) 的活性比化合物 12 (两环间碳数为 8 个) 强。由此推测, 该类化合物结构中, 四氢呋喃环与内酯环间碳数越多活性越强。

3.2.2 取代羟基个数对化合物活性的影响 在邻双型番荔枝内酯类化合物中, 化合物 5 和 6 (有 3 个羟基) 的活性强于化合物 9 和 7 (有 2 个羟基)。此外, 在间双型番荔枝内酯类化合物中, 化合物 11 (有 4 个羟基) 的活性约是化合物 14 (有 3 个羟基) 的 2 倍。有文献报道^[14], 链上含有 3 个羟基的番荔枝内酯化合物的活性最强, 但本实验发现, 这并不绝对, 至少在间双型番荔枝内酯类化合物中, 含有 4 个羟基的番荔枝内酯化合物比含有 3 个羟基的番荔枝内酯化合物活性强。由此推测, 链上含有的羟基个数越多, 化合物活性可能越强。

3.2.3 四氢呋喃环构型对化合物活性的影响 四氢呋喃环的构型对化合物的活性也有较大的影响。由表 2 可以发现, 化合物 3 和 4 仅在四氢呋喃环的构型上略有不同, 而化合物 3 (构型为 *threo/trans/erythro*, 即苏式/反式/赤式) 的活性比化合物 4 (构型为 *threo/trans/thero*, 即苏式/反式/苏式) 的活性略强, 此外在间双型番荔枝内酯类化合物中, 化合物 14 和 12 的活性分别比化合物 15 和 13 的活性要强。前者的构型均为 *trans/threo-threo/trans/erythro*, 即反式/苏式-苏式/反式/赤式, 而后的构型均为 *trans/threo-threo/trans/threo*, 即反式/苏式-苏式/反式/苏式。由此推测, 具有赤式构型的番荔枝内酯化合物抑制耐药细胞生长活性比具有苏式构型的番荔枝内酯化合物活性强。此外, 化合物 10 (构型为 *cis/threo-threo/trans/erythro*, 即顺式/苏式-苏式/反式/赤式) 的抑制活性比化合物 11 (构型为 *trans/threo-threo/trans/erythro*, 即反式/苏式-苏式/反式/赤式) 强, 由此推测, 四氢呋喃环为顺式构型的番荔枝内酯类化合物对耐药细胞的抑制活性比反式的强。

4 讨论

通过以上分析, 番荔枝内酯类化合物对

MCF-7/ADR 细胞的抑制活性的影响可以总结如下: (1) 所有受试的化合物均表现出比阳性药维拉帕米和顺铂更强的抑制活性; (2) 四氢呋喃环与内酯环间的碳数越多, 抑制活性越强; (3) 链上取代羟基越多, 抑制活性越强; (4) 具有赤式构型和顺式构型的番荔枝内酯化合物比具有苏式构型和反式构型的番荔枝内酯化合物活性强; (5) 相对分子质量为 622、链上含有 3 个取代羟基、构型为赤式的邻双型番荔枝内酯活性显著。这为合成更为有效的番荔枝内酯化合物模型提供了理论基础。

由本实验结果推测, 对耐药细胞抑制活性的影响因素主要包括四氢呋喃环与内酯环间的碳数、取代羟基个数、四氢呋喃环构型等方面。然而, 这些因素并非单独作用, 而是相互影响, 综合作用。各因素的影响力度也不一样, 这可能与各因素导致番荔枝内酯化合物与受体的结合程度不同有关。

本实验在细胞水平对各种类型的番荔枝内酯化合物抑制耐药细胞生长活性进行了较为系统的研究, 已有研究报道番荔枝内酯化合物如 asimicin 的作用靶点为线粒体复合酶 I 的 ND2 亚基^[15], 因此, 番荔枝内酯类化合物与线粒体复合酶 I 上的 ND2 亚基表达之间的构效关系仍然需要进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Borst P, Evers R, Kool M, *et al.* A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins [J]. *J Nat Cancer Inst*, 2000, 92(16): 1295-1302.
- [2] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273-286.
- [3] 张 慧, 符立梧. 多药耐药相关蛋白及其在肿瘤耐药中的作用 [J]. *药学报*, 2011, 46(5): 479-486.
- [4] Jensen P B, Sorensen B S, Sehested M, *et al.* Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II: Separate structures critical for DNA-cleavage, and for overcoming topoisomerase II-related drug resistance [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(10): 2025-2035.
- [5] Holden J A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic [J]. *Curr Med Chem Anti-cancer Agents*, 2001, 1(1): 1-25.
- [6] Chen Y, Yu D Q. Classification and NMR characteristics of the γ -lactone and THF rings of antitumor bioactive annonaceous acetogenins [J]. *Acta Pharm Sin*, 1998, 33: 553-560.
- [7] 潘锡平, 于德泉. 大花紫玉盘中的新抗肿瘤活性番荔枝内酯及其绝对构型研究 [J]. *药学报*, 1997, 32(4): 286-293.
- [8] 孙 兰, 朱久香, 余竞光, 等. 圆滑番荔枝种子化学成分研究 [J]. *药学报*, 2003, 38(1): 32-36.
- [9] 陈文森, 姚祝军, 吴毓林. 牛心果化学成分的研究 [J]. *有机化学*, 1995, 15(1): 85-88.
- [10] Bermejo A, Figadere B, Zafra-Polo M C, *et al.* Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22: 269-303.
- [11] Morre D J, Cabo R, Farley C, *et al.* Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes [J]. *Life sci*, 1995, 56: 343-348.
- [12] 程春旭, 高颜茹. 抗肿瘤药物作用机制的研究进展 [J]. *吉林医学*, 2009, 30(23): 3080-3083.
- [13] Chiu H F, Chih T T, Hsian Y M, *et al.* Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular c AMP and c GMP levels in human hepatoma 2. 2. 15 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 65(5): 319-327.
- [14] Oberlies N H, Chang C, McLaughlin J L. Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells [J]. *J Med Chem*, 1997, 40: 2102-2106.
- [15] Nakamaru-Ogiso E, Han H, Matsuno-Yagi A, *et al.* The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(5): 883-888.