

# 具有双迈克尔受体结构单元的齐墩果酸衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性

王天元, 晏晨\*

(安顺市人民医院, 贵州 安顺 561000)

**[摘要]** 目的:设计、合成具有双迈克尔受体结构单元的齐墩果酸衍生物并研究其体外抗肿瘤活性。方法:以齐墩果酸为原料,经过酰化、酯化、水解、氧化以及醇醛缩合反应得到目标化合物;采用 MTT 法在白血病 HL-60, 肝癌 SMMC-7721, 肺癌 A-549, 乳腺癌 MCF-7, 结肠癌 SW480 细胞株上进行了体外抗肿瘤活性的测试。结果:合成了一个具有双迈克尔受体结构单元的新齐墩果酸衍生物,并经过<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, ESI-MS 确证了化学结构。结论:初步的体外抗肿瘤活性显示,该化合物具有较好的抗肿瘤活性,在结肠癌 SW480 细胞株上较为明显。

**[关键词]** 齐墩果酸; 双迈克尔受体结构单元; 合成; 抗肿瘤

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0040-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2015160040

**Design, Synthesis and Antitumor Activities on a Derivative of Oleanolic Acid Bearing Double “Michael Reaction Acceptor” Group** WANG Tian-yuan, YAN Chen\* (Department of Pharmacy, Anshun City People's Hospital, Anshun 561000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To design and synthesize a derivative of oleanolic acid bearing double ‘Michael reaction acceptor’ group and to study anti-tumor activity *in vitro*. **Method:** The target compound was synthesized from oleanolic acid, *via* several steps including acylation, esterification, hydrolysis, oxidation and aldolcondensation. The anti-tumor activity of the compound was studied *in vitro* by MTT assay on Human promyelocytic leukemia cells HL-60, human hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721, human lung adenocarcinoma cells A-549, human mammary adenocarcinoma cells MCF-7, colon carcinoma cells SW480. **Result:** The compound was synthesized, and chemical structure was confirmed by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and ESI-MS. **Conclusion:** Preliminary anti-tumor activity *in vitro* displays the compound had good activity in antitumors, especially inagainsting SW480 cell lines.

**[Key words]** oleanolic acid; double ‘Michael reaction acceptor’ group; synthesis; anti-tumor

齐墩果酸具有保肝解毒、降血糖、降脂、抗炎、抗变态反应、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[1-4]</sup>。但是其生物活性较弱,生物利用度低,限制了其临床应用。具有迈克尔受体结构单元的分子通常具有重要的生理活性,其直接或者间接的参与生命过程,也是许多信号传导途径的调节者,在化学生物学研究中起着非常重要的作用<sup>[5]</sup>。齐墩果酸的结构修饰及药理活性的报道相当多,其修饰主要有 C-3 及 C-28 的修饰, C 环修饰, C-2 位的修饰<sup>[6]</sup>, 其中最重要的衍生

物为 CDDO 和 CDDO-Me, 具有很强的抗肿瘤活性和一氧化氮抑制活性<sup>[7]</sup>。α, β-不饱和酮作为重要的药效团存在于多种化学合成体及天然活性物质中, 如抗肿瘤药、植物生长调节剂等<sup>[8]</sup>。但是具有环外双迈克尔受体结构单元的齐墩果酸衍生物文献未见报道, 本研究将以齐墩果酸(1)为原料, 首先经过其 3 位羟基乙酰基化, 羧基甲酯化, 然后 12 和 13 位的环内双键氧化为羰基, 水解 3 位乙酰基, 再氧化, 最后经过一个羟醛缩合反应得到一个新型的具有环外双

**[收稿日期]** 20141017(019)

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金(黔科合 J 字[2010]2219 号)

**[第一作者]** 王天元, 硕士, 药剂师, 从事中药质量控制研究, Tel:0853-3322070, E-mail:meijian2009@163.com

**[通讯作者]** \*晏晨, 博士, 助理研究员, 从事天然活性先导化合物的结构优化及成药性研究, Tel:0853-3349385, E-mail:meij\_2005@163.com

迈克尔受体结构单元的化合物 **7**, 产物经过<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 和 ESI-MS 确证其结构, 并评价其体外抗肿瘤活性, 该化合物结构及抗肿瘤活性文献均未见报道。

## 1 材料

400 型核磁共振仪 (Inova), 四甲基硅烷为内标, 氘代试剂 (J&K Chemical LTD); 1100MSD 型 ESI 质谱仪 (美国惠普); 正相硅胶 (40 ~ 80, 200 ~ 300, 300 ~ 400 目), 薄层色谱硅胶 GF<sub>254</sub> (0.20 ~ 0.25 mm), 柱色谱硅胶, 薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂生产); 所用溶剂为化学纯或分析纯; 显色剂 5% 浓硫酸的乙醇溶液, 5% 磷酸铝乙醇溶液, 碘蒸气。

## 2 方法与结果<sup>[9-11]</sup>

**2.1 化合物 2 的制备** 将化合物 **1** (1 000.0 mg), 4-二甲氨基吡啶 (DMAP, 20.0 mg) 置于干燥的反应瓶中, 用干燥的二氯甲烷 (DCM) 100 mL 溶解样品, N<sub>2</sub> 保护下搅拌, 置于 0 °C 下相继加入吡啶 (2 mL), 乙酰氯 (184.7 μL), 搅拌 30 min 后, 置于常温搅拌 10 h, 薄层色谱点板跟踪, 发现原料消失后, 加水 100 mL 淬灭反应, 分出二氯甲烷层, 水层继续用二氯甲烷 100 mL 萃取 1 次, 合并二氯甲烷层, 用饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、浓缩, 经过简单的硅胶柱色谱得到化合物 **2** (1 036.0 mg, 收率 95%)。无色粉末, 相对分子质量 498, ESI-MS *m/z* 521.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.27 (1H, m, H-12), 4.49 (1H, m, H-3), 2.81 (1H, m, H-18), 2.05 (3H, s, H-OAc), 1.12 (3H, s, H-27-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, H-25-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, s, H-30-CH<sub>3</sub>), 0.90 (3H, s, H-29-CH<sub>3</sub>), 0.86 (3H, s, H-24-CH<sub>3</sub>), 0.84 (3H, s, H-23-CH<sub>3</sub>), 0.74 (3H, s, H-26-CH<sub>3</sub>), 其波谱数据与 3-乙酰齐墩果酸文献 [12] 报道基本一致。

**2.2 化合物 3 的制备** 将化合物 **2** (1 000.0 mg) 加甲醇 100 mL 溶解, 于 0 °C 下缓慢滴加二氯亚砷 (583.8 μL) 并快速搅拌, 添加完毕后, 置于 80 °C 下加热回流搅拌 5 h, 待原料消失后, 停止搅拌, 减压旋干后, 经过硅胶柱色谱得化合物 **3** (942 mg, 收率 92%), 无色粉末, 相对分子质量 512, ESI-MS *m/z* 535.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.28 (1H, m, H-12), 4.48 (1H, m, H-3), 3.62 (3H, s, H-COOCH<sub>3</sub>), 2.85 (1H, m, H-18), 2.04 (3H, s, H-OAc), 1.12 (3H, s, H-27-CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, s, H-25-CH<sub>3</sub>), 0.92 (3H, s, H-30-CH<sub>3</sub>), 0.89 (3H, s, H-29-CH<sub>3</sub>), 0.86 (3H, s, H-24-

CH<sub>3</sub>), 0.85 (3H, s, H-23-CH<sub>3</sub>), 0.72 (3H, s, H-26-CH<sub>3</sub>), 其波谱数据与 3β-乙酰氧基-齐墩果-12-烯-28-酸甲酯文献 [13] 报道基本一致。

**2.3 化合物 4 的制备** 将 30% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.08 mL) 缓慢滴加到化合物 **3** (930 mg) 和甲酸-四氢呋喃 25 mL (1:4) 中, 在室温下搅拌 40 h, 加入 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液 100 mL 搅拌 5 min, 终止反应, 用乙酸乙酯萃取, 有机层相继用饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 经过硅胶柱色谱得化合物 **4** (573 mg, 60%), 无色粉末, 相对分子质量为 528, ESI-MS *m/z* 551.2 [M + Na]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.47 (1H, dd, *J* = 4.8, 10.8 Hz, H-3), 3.68 (3H, s, H-COOCH<sub>3</sub>), 2.79 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-18), 2.61 (1H, d, *J* = 4.4 Hz, H-13), 2.24 (1H, dd, *J* = 4.8, 16.8 Hz, H-11β), 2.13 (1H, m, H-11α), 2.04 (3H, s, H-Me), 0.97 (3H, s, H-Me), 0.96 (3H, s, H-Me), 0.94 (3H, s, H-Me), 0.90 (3H, s, H-Me), 0.88 (3H, s, H-Me), 0.87 (3H, s, H-Me), 0.86 (3H, s, H-Me), 其中 H-11, H-13 参照文献 [7] 进行归属。

**2.4 化合物 5, 6 的制备** 取化合物 **4** 500 mg (0.94 mmol), 加甲醇 20 mL 溶解, 加入碳酸钾 (261 mg), 室温下搅拌 4 h, 原料消失后, 倒入 100 mL 水中, 用乙酸乙酯 (100 mL × 2) 萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥得化合物 **5** 的粗品, 未经纯化直接用于下一步的反应。将草酰氯 (176.7 μL) 在 N<sub>2</sub> 保护下注入装有干燥二氯甲烷 (DCM) 20 mL 的长颈反应瓶中, 置于 -78 °C 下搅拌, 缓慢滴加 DMSO 283 μL 加入 DCM 2 mL 中, 搅拌 30 min, 再缓慢滴加化合物 **5** 的二氯甲烷溶液 (溶解在 2 mL DCM 中), 在 -78 °C 下搅拌 30 min 后, 滴加三乙胺 (577 μL) 后放置至室温, 倒入 50 mL 水中, 用 DCM (50 mL × 2) 萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 经过硅胶柱色谱得到化合物 **6** (409 mg, 收率 90%), 无色粉末, 相对分子质量 484, ESI-MS *m/z* 485.2 [M + H]<sup>+</sup>。

**2.5 化合物 7 的制备** 称好化合物 **6** (409 mg), 多聚甲醛 (252 mg), *n*-Bu<sub>4</sub>NI (73.8 mg), 无水碳酸钾 (347.8 mg) 至 50 mL 干燥圆底烧瓶中, N<sub>2</sub> 保护下, 用干燥甲苯 20 mL 溶解, 反应混合物至 50 °C 下搅拌 24 h, TLC 点板确定原料消失后, 冷却至室温加入水 20 mL, 用乙酸乙酯萃取 (20 mL × 2), 有机层用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得残余物经硅胶柱色谱得到化合物 **7** (256 mg, 收率 60%), 无色粉末, 相对分子质量 508, ESI-MS *m/z* 431.3 [M + H]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H-

NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.05 [1H, s, H-(C<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>)], 5.99 [1H, s, H-(C<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>)], 5.39 [1H, s, H-(C<sub>11</sub> = CH<sub>2</sub>)], 5.17 [1H, s, H-(C<sub>11</sub> = CH<sub>2</sub>)], 3.67(3H, s, H-COOCH<sub>3</sub>), 3.27 (1H, d, J = 15.6 Hz), 2.84(1H, d, J = 13.6 Hz), 2.43(1H, s), 2.16 (1H, d, J = 15.6 Hz), 1.15(3H, s, H-Me), 1.13 (3H, s, H-Me), 1.10(3H, s, H-Me), 1.05(3H, s, H-Me), 1.00(3H, s, H-Me), 0.95(3H, s, H-Me), 0.92(3H, s, H-Me)。<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 206.4, 203.8, 178.2, 146.5, 141.4, 123.7, 122.7, 55.7, 53.8, 51.8, 51.6, 47.2, 46.3, 46.2, 41.8, 40.8, 37.3, 35.9, 34.4, 33.3, 32.8, 32.1, 30.6, 30.4, 28.4, 27.7, 23.0, 22.73, 22.70, 20.6, 19.7, 16.6, 13.6。

### 3 体外抗肿瘤活性试验<sup>[14]</sup>

用含 10% 胎牛血清的培养液 (DMEM 或者 RPMI 1640) 配成单个细胞悬液, 以每孔 5 000 ~ 10 000 个细胞接种到 96 孔板, 每孔体积 100 μL, 贴壁细胞提前 12 h 接种培养。加入待测化合物溶液 (固定浓度 40 μmol·L<sup>-1</sup> 初筛, 在该浓度对肿瘤细胞生长抑制在 50% 附近的化合物设 5 个浓度进入梯度复筛), 每孔终体积 200 μL, 每种处理均设 3 个复孔。37 °C 培养 48 h 后, 每孔加 MTT 溶液 20 μL。继续孵育 4 h, 终止培养, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加 200 μL 的 SDS 溶液 (10%), 过夜孵育 (温度 37 °C), 使结晶物充分融解。选择 595 nm 波长测定, 以质量浓度为横坐标, 细胞存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线, 应用两点法计算化合物的 IC<sub>50</sub>。见表 1。

表 1 化合物 1, 7 的体外肿瘤细胞毒 IC<sub>50</sub>

Table 1	Compound 1, 7 in vitro cytotoxic IC <sub>50</sub>				
	μmol·L <sup>-1</sup>				
化合物	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW-480
1	>40	>40	>40	>40	>40
7	9.72	15.38	7.57	13.40	4.49
顺铂	1.81	8.86	11.68	15.92	16.65

### 4 讨论

本论文以齐墩果酸 (1) 为原料, 通过酰化、酯化、水解、氧化和醇醛缩合反应制备了具有环外双迈克尔受体结构单元的齐墩果酸衍生物 (7), 经过 SciFinder 查新为全新结构, 通过核磁和质谱波谱数据确证了其结构。体外的抗肿瘤实验发现, 化合物 7 在 5 个被测肿瘤细胞株中比母体化合物具有更强的体外细胞毒活性, 在结肠癌 SW480 细胞株中更为明显, 其 IC<sub>50</sub> 为 4.49 μmol·L<sup>-1</sup>。研究结果显示迈克尔受体结构单元可以增强齐墩果酸的体外抗肿瘤活

性, 其作用机制有待进一步的研究, 该研究为齐墩果酸衍生物在抗肿瘤方面的开发利用和药效等研究工作的开展提供了一定的理论依据。

### [参考文献]

[1] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2012, 27(12): 884-886.

[2] Ortiz A R, Garcia-Jimenez S, Castillo-Espana p, et al. α-Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 109(1): 48-53.

[3] 张明发, 沈雅琴. 齐墩果酸和熊果酸的抗炎及其看变态反应[J]. 抗感染药学, 2011, 8(4): 235-240.

[4] 王丹丹, 葛文中. 齐墩果酸衍生物合成及抗肿瘤活性的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2010, 22(3): 84-88.

[5] 赵勤实, 从玉文. 迈克尔反应受体分子化学生物学研究[J]. 化学进展, 2007, 19(12): 1973-1976.

[6] 唐初, 陈玉, 柏舜, 等. 齐墩果酸的结构修饰与生物活性研究进展[J]. 有机化学, 2013, 33: 46-56.

[7] Tadashi H, BarbieAnn V R, Lothar B, et al. Synthetic oleanane and ursanetriterpenoids with modified rings A and C: A series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages[J]. J Med Chem, 2000, 43(22): 4233-4236.

[8] 李红彩, 杨新美, 王朋, 等. α, β-不饱和酮衍生物的合成[J]. 化学试剂, 2009, 31(11): 933-935.

[9] Michael B S, Karen T L, Mark M Y, et al. New synthetic triterpenoids: Potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress [J]. J Nat Prod, 2011, 74(3): 537-542.

[10] Wang W L, Yang D L, Gao L X, et al. 1H-2, 3-dihydroperimidin derivatives: A new class of potent protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors [J]. Molecules, 2014, 19(1): 102-107.

[11] Yan C, Huang L, Liu H C, et al. Spiramine derivatives induce apoptosis of Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup> MEF cell and cancer cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24, 1884-1888.

[12] 郭夫江, 林绥, 李援朝. 鹅掌藤中三萜类化合物的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(5): 294-296.

[13] 吕广颖, 牟关敏, 杨海君. 新型齐墩果酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 合成化学, 2012, 20(4): 416-420.

[14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55-63.

[责任编辑 顾雪竹]