

齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物的合成与抗肿瘤活性研究

苏春华,程克光*,初相伍,田小艳,黄晓超,王恒山,邹连珍

(国家重点实验室培育基地——广西壮族自治区药用资源化学与
药物分子工程重点实验室;广西师范大学化学与药学学院,广西 桂林 541004)

[摘要] **目的:**合成新型的齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物,并研究其抗肿瘤活性。**方法:**以齐墩果酸为原料,经乙酰化反应后,与草酰氯反应成酰氯,继而在三乙胺作为缚酸剂的条件下,与 α -氨基膦酸酯进行反应,一共合成了 9 个齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物,并对其结构进行表征。采用体外抗肿瘤活性测试 MTT 法,在细胞培养密度为 $2 \sim 3 \times 10^4$ 个/mL,药物测试浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,作用时间为 48 h 条件下测试合成的齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG-2、人宫颈癌细胞 Hela 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制活性。**结果:**这些化合物对受试肿瘤细胞株表现出不同程度的抑制活性。其中化合物 **2,4,7,10** 对人肺癌细胞 A549 和人宫颈癌细胞 Hela 具有显著的增殖抑制活性(对 A549 的抑制率分别为 87.5%,85.3%,87.1%,87.8%,对 Hela 的抑制率分别为 85.7%,78.7%,83.6%,87.9%);化合物 **2** 和 **10** 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制活性很好(抑制率分别为 82.0%,88.1%)。**结论:**这些齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物表现出不同程度的抗肿瘤活性,其中,苯环上邻位有卤素取代的齐墩果酸- α -氨基膦酸酯衍生物对测试细胞的增殖抑制活性较好。

[关键词] 齐墩果酸; α -氨基膦酸酯; 合成; 抗肿瘤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0123-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080123

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000036.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:21

Synthesis and Anti-tumor Activity Evaluation of Oleanolic Acid- α -aminophosphonate Derivatives

SU Chun-hua, CHENG Ke-guang*, CHU Xiang-wu, TIAN Xiao-yan,
HUANG Xiao-chao, WANG Heng-shan, ZOU Lian-zhen

(State Key Laboratory Cultivation Base for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources,
Ministry of Science and Technology of China, School of Chemistry and Pharmaceutical
Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize and evaluate anti-tumor activity of oleanolic acid- α -aminophosphonate derivatives. **Method:** Oleanolic acid- α -aminophosphonate derivatives were synthesized from oleanolic acid, which was treated by acetylation, then the acetylated product was reacted with oxalyl chloride, followed by esterification with α -aminophosphonate under triethylamine to obtain nine target compounds. The structures of these compounds were identified. MTT method was used to assay the anti-tumor activity of synthesized compounds against human lung cancer cell lines A549, human hepatic cell lines HepG-2, human cervical

[收稿日期] 20130808(001)

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973 计划)前期研究专项(2011CB512005);广西自然科学基金项目(2011GXNSFD018010, 2013GXNSFBA019184);广西教育厅科研项目(201202ZD008);广西师范大学校重点项目(2010ZD008);药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室课题(CMEMR2012-B03, CMEMR2013-A01, CMEMR2013-C02);广西医药产业人才小高地项目(1109)

[第一作者] 苏春华,在读研究生,E-mail:chunhuasu2009@163.com

[通讯作者] *程克光,博士,副教授,从事天然产物的结构修饰与改造,E-mail:kgcheng2008@gmail.com

carcinoma cell lines HeLa and human breast cancer cell lines MDA-MB-231. The density of cell culture was $2-3 \times 10^4/\text{mL}$, the concentration of drug was $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48 hours. **Result:** These target compounds showed varying degrees of inhibitory activity against tumor cell lines. Compounds **2**, **4**, **7** and **10** exhibited significant inhibitory activity against human lung tumor cell A549 and human cervical carcinoma HeLa (the inhibition rate against A549 was respectively 87.5%, 85.3%, 87.1% and 87.8%; the inhibition rate against HeLa was respectively 85.7%, 78.7%, 83.6% and 87.9%). Compounds **2** and **10** showed high inhibitory activity against human breast tumor cell MDA-MB-231 (the inhibition rate was respectively 82.0% and 88.1%). **Conclusion:** These oleanolic acid- α -aminophosphonate derivatives exhibited varying degrees of inhibitory activity against tumor cell lines. The compounds with ortho-substituted by halogen in phenyl ring showed better inhibitory activity.

[**Key words**] oleanolic acid; α -aminophosphonate; synthesis; anti-tumor

磷酸酯作为一种生物体内氨基酸的类似物,广泛地参与到生命体活动的各个生化过程中,研究者在肌肉、红细胞、脑等人体组织内都发现了磷酸酯及其他氨基酸类似物的痕迹^[1]。近年来针对涉及生命活动相关过程的磷酸酯的研究广泛开展,一系列磷酸酯被发现或合成出来,并表现出了良好的生物活性,如抗病毒、抗 HIV、抗肿瘤等。如替诺福韦(tenofovir disoproxil, TDF)的抗 HIV 活性是不含有磷酸酯结构的母体无环核苷酸类似物的 100 多倍^[2]。阿德福韦(adeфовir dipivoxil, ADV)使用剂量小且没有明显的毒副作用^[3]。西多福韦(cidofovир)作为一种抗巨细胞病毒(CMV)药物,对 CMV 有很高的抑制活性,且药效持久^[4]。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)和异环磷酰胺(ifosfamide)都是国内目前用于治疗癌症的一线治疗药物^[5]。

α -氨基磷酸酯作为磷酸酯中的一种重要组成部分,是磷酸化氨基酸的类似物,具有抗肿瘤、抗植物病毒、抑制酶活性等多种重要生物活性^[6]。

齐墩果酸(oleanolic acid, OA),一种五环三萜类化合物,广泛存在于食物、医学草本植物和其他植物中,具有解肝毒^[7]、抗肿瘤^[8]、降血糖^[9]、降血脂^[10]、抗 HIV^[11]等多种生物活性,是一种具有开发潜力的植物先导化合物。

为了改善齐墩果酸的溶解性,提高生物利用度,寻找药效好、毒性低的抗肿瘤药物,本文以齐墩果酸和 α -氨基磷酸酯为原料,利用酰化反应,将 α -氨基磷酸酯引入到齐墩果酸中,合成了一类新型的齐墩果酸- α -氨基磷酸酯衍生物,具体合成路线见图 1,并对它们的抗肿瘤活性进行了初步研究。

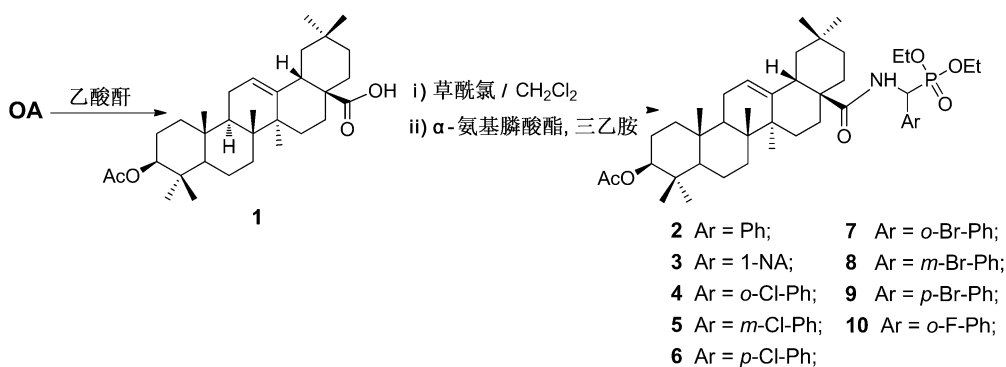


图 1 齐墩果酸- α -氨基磷酸酯衍生物的合成

1 实验部分

1.1 仪器及试剂 AVANCE/AV500 MHz 超导核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);RY-1 熔点测定仪(天津天分分析仪器厂);DLSB-5/20 型低温冷却液循环浆(郑州长城科工贸有限公司)。AIRTECH 超净台;Eppendorf AG 22331 Hamburg 离心机;Thermo Scientific 培养箱;Olympus 显微镜;TECAN infinite

M1000 酶标仪(瑞士,帝肯集团公司)。

胰蛋白酶消化液、RPMI1640、胎牛血清、DMSO、PBS 等生物活性测试用药品均购于阿法埃莎(天津)化学有限公司。测试细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。齐墩果酸购于陕西省宝鸡市国康生物科技有限公司, α -氨基磷酸酯按照 Sobhani^[12]提供的合成方法制备而使用。所有化

学合成用原料均为化学纯或分析纯试剂。

1.2 化合物的合成与表征

1.2.1 化合物 1 齐墩果酸 (5.000 g, 10.95 mmol) 溶解于无水吡啶:CH₂Cl₂ (8 mL, 7:1) 中,加入 DMAP(0.134 g, 1.1 mmol) 和乙酸酐(1.56 mL, 16.5 mmol), 室温搅拌 12 h。减压蒸除溶剂, 残余物分散在 2 mol·L⁻¹ HCl(50 mL) 中, 乙酸乙酯(3×30 mL) 萃取, 合并有机层, 依次用水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 滤液蒸除溶剂后得粗产物, 用乙醇-石油醚(24 mL, 5:3) 混合溶剂于 80 °C 重结晶得化合物 1^[13] (4.900 g, 89.3%)。白色固体, R_f = 0.216 (Petroleum ether: EtOAc 6:1), mp 269 ~ 271 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.76, 0.85, 0.87, 0.91, 0.93, 0.94, 1.13 (7s, each 3H, 7 × CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃COO), 0.63-2.10 (m, 22H), 2.82 (d, 1H, *J* = 4.0, 13.8 Hz, H-18), 4.50 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-3), 5.28 (s, 1H, H-12)。

1.2.2 化合物 2 ~ 10 的合成通法 将化合物 1 (0.20 mmol) 溶于无水 CH₂Cl₂ (3 mL) 中, 0 °C 下滴加草酰氯 (0.32 mL, 3.40 mmol), 室温搅拌过夜。减压蒸除草酰氯, 残余物溶解于无水 THF (3 mL) 中, 加入氨基磷酸酯 (0.20 mmol) 和三乙胺 (1 mL), 室温搅拌 4 h。减压旋除溶剂, 加入乙酸乙酯 (30 mL), 依次用水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 滤液浓缩, 所得残留物经硅胶柱层析分离纯化得产物。

1.2.3 化合物 2 将化合物 1 (0.099 g, 0.20 mmol)、草酰氯 (0.34 mL, 3.40 mmol) 和二乙基-[氨基(苯基)甲基]-膦酸酯 (0.048 g, 0.20 mmol), 按合成通法制备, 硅胶柱层析分离提纯, 得化合物 2 (0.040 g, 27.8%)。白色固体, R_f = 0.189 (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 122.1 ~ 123.5 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.60 (2s, 3H, CH₃), 0.74 ~ 2.20 (m, 46H, include 8 × CH₃), 2.04 (2s, 3H, CH₃COO), 2.59 ~ 2.87 (m, 1H, H-18), 3.51 ~ 4.53 (m, 5H, H-3, 2 × OCH₂), 5.33 ~ 5.55 (m, 2H, N-CH-P, H-12), 6.68 (2dd, 1H, *J* = 4.5, 8.7 Hz, NH), 7.25 ~ 7.35 (m, 3H, ArH), 7.36 ~ 7.44 (m, 2H, ArH), ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 22.11, 22.62。

1.2.4 化合物 3 将化合物 1 (0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯 (3.23 mL, 34.00 mmol) 和二乙基-[氨基(萘基-1)甲基]-膦酸酯 (0.586 g, 2.00

mmol), 按合成通法制备, 硅胶柱层析分离提纯, 得化合物 3 (0.701 g, 45.3%)。白色固体, R_f = 0.209 (Petroleum ether: EtOAc 4:1)。mp 124.5 ~ 126.3 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.32 (2s, 3H, CH₃), 0.76 ~ 2.26 (m, 46H, include 8 × CH₃), 2.18 (2s, 3H, CH₃COO), 2.90 (2d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-18), 3.63 ~ 4.64 (m, 5H, H-3, 2 × OCH₂), 5.55 (2s, 1H, H-12), 5.75 (2dd, 1H, *J* = 8.9, 20.0 Hz, N-CH-P), 6.92 (2d, 1H, *J* = 8.6 Hz, NH), 7.70 ~ 7.58 (m, 3H, ArH), 8.06 ~ 7.91 (m, 4H, ArH), ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 21.97, 22.51。

1.2.5 化合物 4 将 3 位-羟基保护的齐墩果酸化合物 1 (0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯 (3.23 mL, 34.00 mmol) 和二乙基-[氨基(2-氯-苯基)甲基]-膦酸酯 (0.554 g, 2.00 mmol), 按合成通法制备, 硅胶柱层析分离提纯, 得化合物 4 (1.154 g, 76.1%)。白色固体, R_f = 0.243 (Petroleum ether: EtOAc 4:1) mp 135.6 ~ 137.2 °C, ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.64 (2s, 3H, CH₃), 2.02 ~ 0.75 (m, 46H, include 8 × CH₃), 2.04 (2s, 3H, CH₃COO), 2.71 (2d, 1H, *J* = 9.4 Hz, H-18), 3.45 ~ 4.54 (m, 5H, H-3, 2 × OCH₂), 5.29 ~ 5.46 (m, 1H, H-12), 6.02 (2dd, 1H, *J* = 8.3, 20.6 Hz, N-CH-P), 6.97 ~ 6.61 (m, 1H, NH), 7.18 ~ 7.25 (m, 2H, ArH), 7.36 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 7.39 ~ 7.56 (m, 1H, ArH), ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 21.46, 21.97。

1.2.6 化合物 5 将 3 位-羟基保护的齐墩果酸化合物 1 (0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯 (3.23 mL, 34.00 mmol) 和二乙基-[氨基(3-氯-苯基)甲基]-膦酸酯 (0.554 g, 2.00 mmol), 按合成通法制备, 硅胶柱层析分离提纯, 得化合物 5 (0.884 g, 58.3%)。白色固体, R_f = 0.225 (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 115.7 ~ 117.2 °C, ¹H-NMR (500 MHz, DMSO) δ 0.31 (2s, 3H, CH₃), 0.72 ~ 2.00 (m, 46H, include 8 × CH₃), 2.04 (2s, 3H, *J* = 1.3 Hz, CH₃COO), 2.72 (2d, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-18), 3.59 ~ 4.57 (m, 5H, H-3, 2 × OCH₂), 5.23 ~ 5.55 (m, 2H, N-CH-P, H-12), 6.55 ~ 6.81 (m, 1H, NH), 7.14 ~ 7.52 (m, 4H, ArH), ³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ 21.43, 21.89。

1.2.7 化合物 6 将 3 位-羟基保护的齐墩果酸化合物 1 (0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯 (3.23 mL,

34.00 mmol)和二乙基-[氨基(4-氯-苯基)甲基]-膦酸酯(0.554 g, 2.00 mmol),按合成通法制备,硅胶柱层析分离提纯,得化合物**6**(0.869 g, 57.3%)。白色固体, $R_f = 0.257$ (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 129.5 ~ 132.3 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.28 (2s, 3H, CH_3), 2.00 ~ 0.68 (m, 46H, include $8 \times \text{CH}_3$), 2.03 (2s, 3H, $J = 1.3$ Hz, CH_3COO), 2.70 (2d, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-18), 3.59 ~ 4.56 (m, 5H, H-3, $2 \times \text{OCH}_2$), 5.26 ~ 5.52 (m, 2H, N-CH-P, H-12), 6.51 ~ 6.72 (m, 1H, NH), 7.27 ~ 7.37 (m, 4H, ArH), $^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ 21.59, 22.07。

1.2.8 化合物**7** 将3位-羟基保护的齐墩果酸化合物**1**(0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯(3.23 mL, 34.00 mmol)和二乙基-[氨基(2-溴-苯基)甲基]-膦酸酯(0.644 g, 2.00 mmol),按合成通法制备,硅胶柱层析分离提纯,得化合物**7**(0.926 g, 57.7%)。白色固体, $R_f = 0.187$ (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 172.2 ~ 173.5 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.63 (2s, 3H, CH_3), 0.74 ~ 2.01 (m, 46H, include $8 \times \text{CH}_3$), 2.03 (2s, 3H, CH_3COO), 2.70 (2d, 1H, $J = 10.0$ Hz, H-18), 3.35 ~ 4.54 (m, 5H, H-3 and $2 \times \text{OCH}_2$), 5.38 (2s, 1H, H-12), 6.01 (2dd, $J = 8.1, 20.5$ Hz, 1H, N-CH-P), 6.58 ~ 6.98 (m, 1H, NH), 7.17 ~ 7.28 (m, 2H, ArH), 7.36 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 7.46 (2d, 1H, $J = 7.5$ Hz, ArH), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO) δ 177.16, 176.66, 171.15, 144.12, 143.54, 134.43, 134.23, 133.37, 129.92, 129.33, 129.10, 128.62, 127.02, 123.12, 122.94, 81.00, 80.95, 77.41, 77.16, 76.91, 63.86, 63.80, 63.54, 63.49, 63.16, 63.10, 62.96, 62.91, 55.33, 55.30, 48.10, 47.65, 47.51, 46.86, 46.68, 46.45, 46.29, 42.64, 42.04, 41.91, 39.34, 39.29, 38.26, 38.21, 37.79, 37.75, 36.98, 36.88, 34.16, 33.12, 33.04, 32.91, 32.75, 32.62, 30.86, 30.80, 28.16, 28.11, 27.44, 25.73, 23.84, 23.74, 23.64, 23.42, 21.44, 18.30, 18.16, 17.03, 16.82, 16.78, 16.57, 16.52, 16.47, 16.36, 16.20, 16.15, 15.54, 15.39, $^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ 21.43, 21.97。

1.2.9 化合物**8** 将3位-羟基保护的齐墩果酸化合物**1**(0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯(3.23 mL,

34.00 mmol)和二乙基-[氨基(3-溴-苯基)甲基]-膦酸酯(0.644 g, 2.00 mmol),按合成通法制备,硅胶柱层析分离提纯,得化合物**8**(0.820 g, 51.1%)。白色固体, $R_f = 0.194$ (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 122.3 ~ 124.5 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.30 (2s, 3H, CH_3), 0.70 ~ 1.95 (m, 46H, include $8 \times \text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H, CH_3COO), 2.71 (2d, 1H, $J = 12.9$ Hz, H-18), 3.60 ~ 4.58 (m, 5H, H-3, $2 \times \text{OCH}_2$), 5.24 ~ 5.57 (m, 2H, H-12, N-CH-P), 6.55 ~ 6.75 (m, 1H, NH), 7.18 (dd, 1H, $J = 7.7, 13.8$ Hz, ArH), 7.33 (s, 1H, ArH), 7.41 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, ArH), 7.52 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, ArH), $^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ 21.41, 21.88。

1.2.10 化合物**9** 将3位-羟基保护的齐墩果酸化合物**1**(0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯(3.23 mL, 34.00 mmol)和二乙基-[氨基(4-溴-苯基)甲基]-膦酸酯(0.644 g, 2.00 mmol),按合成通法制备,硅胶柱层析分离提纯,得化合物**9**(0.855 g, 53.3%)。白色固体, $R_f = 0.206$ (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 134.5 ~ 136.2 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.27 (2s, 3H, CH_3), 0.77 ~ 2.00 (m, 46H, include $8 \times \text{CH}_3$), 2.04 (s, 3H, CH_3COO), 2.56 ~ 2.88 (m, 1H, H-18), 3.63 ~ 4.54 (m, 5H, H-3, $2 \times \text{OCH}_2$), 5.26 ~ 5.50 (m, 2H, H-12, N-CH-P), 6.63 ~ 6.91 (m, 1H, NH), 7.24 ~ 7.36 (m, 2H, ArH), 7.53 ~ 7.42 (m, 2H, ArH), $^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ 21.49, 21.94。

1.2.11 化合物**10** 将3位-羟基保护的齐墩果酸化合物**1**(0.997 g, 2.00 mmol)、草酰氯(3.23 mL, 34.00 mmol)和二乙基-[氨基(2-氟-苯基)甲基]-膦酸酯(0.522 g, 2.00 mmol),按合成通法制备,硅胶柱层析分离提纯,得化合物**10**(0.868 g, 58.5%)。白色固体, $R_f = 0.177$ (Petroleum ether: EtOAc 4:1), mp 124.5 ~ 126.1 °C, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 0.30 (2s, 3H, CH_3), 0.72 ~ 1.75 (m, 46H, include $8 \times \text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H, CH_3COO), 2.70 (2d, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-18), 3.59 ~ 4.55 (m, 5H, H-3, $2 \times \text{OCH}_2$), 5.37 (dd, 1H, $J = 3.5, 7.2$ Hz, H-12), 5.77 (2dd, 1H, $J = 8.7, 20.7, 84.0$ Hz, N-CH-P), 6.63 ~ 6.82 (m, 1H, NH), 6.98 ~ 7.16 (m, 2H, ArH), 7.23 ~ 7.30 (m, 1H, ArH), 7.39 (2t, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH)。 $^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ 21.02 (d, $J = 4.8$ Hz), 21.60

(d, $J=4.4$ Hz)。

1.3 化合物的抗肿瘤活性测试 以相应溶剂作阴性对照,选择人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG-2、人宫颈癌细胞 Hela 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为测试细胞株,用 MTT 法^[14]对目标化合物进行了体外抗肿瘤活性测试,具体实验操作如下:取生长对数期的癌细胞加入 0.25% 胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 为培养液稀释为 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个/mL 细胞悬液后接种于 96 孔培养板中,每孔 180 μL ;于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱中孵育至细胞贴壁(约 6 h),加入浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的测试化合物,每孔 20 μL (经 PBS 缓冲液稀释使 DMSO 含量低于 1%);培养 48 h 后将 10 μL /孔 MTT 的 PBS 溶液(质量浓度为 0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)加入 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱反应 4 h。吸去上清液,加入 DMSO 100 μL /孔,平板摇床上振摇 5 min。用酶联免疫检测仪在波长为 570 nm 和参考波长为 630 nm 处测定每孔的吸光度(A),根据所得的 A 计算抑制率。细胞抑制率的计算公式为:

$$\text{细胞抑制率} = (\text{阴性对照组 } A - \text{测试物组 } A) / \text{阴性对照组 } A \times 100\%$$

2 结果

表 1 是化合物的体外抗肿瘤活性测试结果,从表中可以看出,所合成的化合物对测试的几种肿瘤细胞株表现出不同程度的抑制活性。

表 1 测试化合物对不同细胞株的体外抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$) %

化合物	A549	HepG-2	Hela	MDA-MB-231
2	87.5	20.7	85.7	82.0
3	40.3	30.7	59.0	60.9
4	85.3	30.9	78.7	54.1
5	26.3	44.0	39.4	71.7
6	24.3	38.3	34.8	77.4
7	87.1	46.2	83.6	87.0
8	19.6	40.7	32.4	69.8
9	28.6	13.1	41.0	70.6
10	87.8	48.2	87.9	88.1

注:测试化合物的测试浓度均为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;实验数据为 3 次实验的平均值。

氟、氯和溴基均为吸电子基,对氨基磷酸酯结构上的苯环起到钝化作用,从表 1 数据可以看出,卤素取代基位置的不同对化合物的体外抗肿瘤细胞增殖活性产生一定的影响。苯环上没有取代的化合物 2 和邻位取代的化合物 4,7,10 对人肺癌细胞 A549 和

人宫颈癌细胞 Hela 具有显著的增殖抑制活性(对 A549 抑制率 >85%,对 Hela 抑制率 >78%),明显优于间位和对位取代。测试化合物对人肝癌细胞 HepG-2 的增殖抑制活性相对较弱,其中邻位取代的化合物 10 对 HepG-2 的抑制活性最高。测试化合物对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 表现出良好的增殖抑制活性(抑制率 >50%),间位和对位取代的氯原子化合物 5 和 6 对 MDA-MB-231 的抑制活性优于邻位氯取代的化合物 4,而邻位溴取代的化合物 7 对 MDA-MB-231 的抑制活性优于间位和对位取代的溴原子化合物 8 和 9。苯环上无取代的化合物 2 和邻位氟取代的化合物 10 对 MDA-MB-231 的抑制率都很好(>80%)。萘基取代的化合物 3 对测试细胞表现出中等抑制活性。从整体看,苯环上邻位有卤素取代的化合物对测试细胞的增殖抑制活性较好。

3 结论

本文以齐墩果酸为原料,经乙酰化反应后,与草酰氯反应成酰氯,继而在三乙胺作为缚酸剂的条件下,与 α -氨基磷酸酯进行反应制得一类新型的齐墩果酸- α -氨基磷酸酯衍生物 2~10。药理活性测试结果显示这些化合物对人肺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG-2、人宫颈癌细胞 Hela 和人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 株表现出不同程度的抑制活性。其中,化合物 2,4,7 和 10 对人肺癌细胞 A549 和人宫颈癌细胞 Hela 具有显著的增殖抑制活性(对 A549 抑制率 >85%,对 Hela 抑制率 >78%);化合物 2 和 10 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制活性很好(>80%)。从整体看,苯环上邻位有卤素取代的化合物对测试细胞的增殖抑制活性较好。

[致谢] 感谢 2013 年广西师范大学第一批青年骨干教师成长支持计划。

[参考文献]

- [1] Alhadeff J A, Daves G Doyle. Occurrence of 2-aminoethylphosphonic acid in human brain [J]. *Biochem*, 1970, 9 (25):4866.
- [2] Deeksl S G, Barditch-Crovo P, Lietman P S, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of intravenous 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy) propyl] adenine, a novel anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy, in HIV-infected adults [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42 (9):2380.
- [3] Kahn J, Lagakos S, Wulfsohn M, et al. Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial [J]. *J Am Med*, 1999, 282 (24):2305.

参芪益心方对阿霉素诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌结构和细胞因子的影响

金娟¹, 崔璐², 邹国良¹, 刘莉^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 观察参芪益心方对慢性心力衰竭(CHF)大鼠心肌形态、心功能、血浆中血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。方法: 将90只Wistar雄性大鼠随机平均分为6组: 正常对照组、模型组、依那普利对照组、芪苈强心对照组、参芪益心方低剂量($16.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组、高剂量($33.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)组。利用阿霉素第1, 3, 5周, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 第2, 4, 6周, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量, 每日1次, 灌胃4周, 观察大鼠的心肌组织形态学及超微结构变化, 运用超声心动图检测大鼠左室收缩末期内径(LVSD)、左室舒张末期内径(LVDD)、左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS), 放免法测定大鼠血浆AngⅡ, TNF- α 。结果: 经EF, FS提示造模成功, 各治疗组LVSD, LVDD, EF, FS均有改善, 参芪益心方高剂量组、中药对照组、西药对照组与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。各治疗组AngⅡ, TNF- α 均有不同程度的降低, 与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 参芪益心方可以改善CHF大鼠心肌组织形态, 抑制心室重构, 改善CHF大鼠心功能。

[关键词] 心力衰竭; 阿霉素; 参芪益心方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0128-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080128

[收稿日期] 20130819(021)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金(QC2010091/C190402); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531615); 黑龙江中医药大学新药基金(201102)

[第一作者] 金娟, 博士, 副主任医师, 从事心力衰竭发生机制与治疗方面的研究, Tel: 13845112850, E-mail: jinjuan_723@163.com

[通讯作者] * 刘莉, 博士, 主任医师, 从事心力衰竭与代谢综合征方面的研究, Tel: 13904616262, E-mail: liliu429@163.com

- [4] Hitchcock M J M, Jaffe H S, Martin J C, et al. Cidofovir, a new agent with potent antiherpes virus activity [J]. Antiviral Chem Chemother, 1996, 7(3):115.
- [5] 施畅, 廖明阳. 环磷酰胺与异环磷酰胺在体内的代谢特点分析[J]. 解放军药学报, 2001, 17(2):92.
- [6] 廖新成, 刘伦, 郭艳春, 等. α -氨基磷酸酯衍生物的合成及其表征[J]. 有机化学, 2006, 26(2):233.
- [7] 孙宏斌. 五环三萜类天然产物的研究进展[J]. 药物化学进展, 2006(4):253.
- [8] 王会敏, 田炜, 喇孝瑾, 等. 葛根素、齐墩果酸及其配伍对T2DM大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15):174.
- [9] Yuko F, Takeshi Y, Shun-ichw, et al. Lupane and oleanane triterpenoids from the cones of liquidamber strytraciflua[J]. J Nat Prod, 2006, 69(1):142.
- [10] 邹盛勤, 黄浩. RP-HPLC同时测定草莓中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11):79.
- [11] Ma C M, Nakamura N, Hattori M. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization [J]. Chem Pharm Bull, 2000, 48(11):1681.
- [12] Sobhani S, Tashrfi Z. Al(OTf)₃ as an efficient catalyst for one-pot synthesis of primary diethyl 1-aminophosphonates under solvent-free conditions [J]. Synthetic Commun, 2009, 39:120.
- [13] Zhu Y Y, Qian L W, Zhang J, et al. New approaches to the structural modification of olean-type pentacyclic triterpenes via microbial oxidation and glycosylation [J]. Tetrahedron, 2011, 67(23):4206.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1):55.

[责任编辑 聂淑琴]