

# 新型姜黄素衍生物的合成及其抗癌活性研究

林锦璇<sup>1</sup>, 王鹏龙<sup>2</sup>, 褚福浩<sup>2</sup>, 徐昕<sup>2</sup>, 绪扩<sup>2</sup>, 程亚涛<sup>2</sup>, 李国梁<sup>2</sup>, 龚晏<sup>2</sup>, 雷海民<sup>2</sup>, 张宇忠<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 研究新型姜黄素衍生物的合成及其体外抗癌活性。方法: 以“十全大补丸”方中抗癌活性成分为原料, 利用拼合原理, 设计、合成姜黄素衍生物, 并采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法体外检测姜黄素衍生物在 HT-29 (人结肠癌细胞)、Bel7402 (人肝癌细胞)、HepG2 (人肝癌细胞)、Hela (人宫颈癌细胞) 4 种癌细胞模型的抗癌活性和对正常细胞 MDCK (犬肾上皮细胞) 的毒性。结果: 发现化合物 4 和 CU-T 能明显抑制 4 种人源性癌细胞的增殖, 二者体外抗癌活性 (IC<sub>50</sub>) 与顺铂相似, 显著高于姜黄素; 且对 MDCK 细胞的毒性明显小于顺铂。结论: 以拼合原理为指导, 进一步验证了从经典方药中发现高效、低毒的抗癌先导化合物的研究思路是可行的。

**[关键词]** 姜黄素; 衍生物; 拼合原理; 中医药; 抗肿瘤

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0113-05

**[doi]** 10.11653/syfy2014070113

## Synthesis and Anti-tumor Evaluation of New Curcumin Derivants

LIN Jin-xuan<sup>1</sup>, WANG Peng-long<sup>2</sup>, CHU Fu-hao<sup>2</sup>, XU Xin<sup>2</sup>, XU Kuo<sup>2</sup>, CHENG Ya-tao<sup>2</sup>, LI Guo-liang<sup>2</sup>,  
GONG Yan<sup>2</sup>, LEI Hai-min<sup>2</sup>, ZHANG Yu-zhong<sup>1\*</sup>

(1. The School of Preclinical Medicine of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;  
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the synthesis and *in vitro* anti-cancer activity of new curcumin derivatives. **Method:** Three new curcumin derivatives were synthesized using anti-tumor ingredients of Shiquandabu Wan as starting materials. Our idea was enlightened by the ‘combination principle’ in drug discovery. The curcumin derivatives anti-tumor activities were evaluated on the HT-29, Bel-7402, HepG2 and Hela human cancer cell lines and their toxicities were evaluated on MDCK (Madin-Darby canine kidney cell lines). **Result:** Compound 4 and CU-T displayed more antiproliferative activities on these cancer cells than their starting materials; IC<sub>50</sub> values were similar to DDP’s, while curcumin derivatives showed much lower toxicity on MDCK cell than DDP. **Conclusion:** It is feasible to discover high-effect and low-toxicity lead compounds from classic formulas via combination principle.

**[Key words]** curcumin; derivatives; combination principle; traditional Chinese medicine; anti-tumor effect

**[收稿日期]** 20130728(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173519);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-15);北京中医药大学自主课题项目(2013-JYBZZ-XS-040)

**[第一作者]** 林锦璇, 从事中药先导化合物的发现与开发研究, Tel: 18810382895, E-mail: mmzmmk@163.com

**[通讯作者]** \*张宇忠, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药先导化合物的发现与开发研究, Tel: 010-64286964, E-mail: zyz100102@126.com

运用拼合原理, 从中医经典方药中发现先导化合物的研究思路, 引起越来越多学者的关注<sup>[1-4]</sup>。十全大补丸为中医临床辅助治疗癌症的常用方药<sup>[5-6]</sup>, 现代研究发现方中包含姜黄素、桂皮酸、川芎嗪等大量抗癌活性成分<sup>[7-11]</sup>。本课题组在前期工作中, 以方中活性成分为原料, 设计、合成姜黄素衍生物 CU-T (图 1), 通过体外多种药效学评价, 发现该结构具有良好的抗癌活性<sup>[3]</sup>。在此基础上, 本课题组深入研究、合成姜黄素衍生物 4 (图 3) 和 7 (图

5), 并通过体外 4 种癌细胞模型和正常细胞 MDCK 模型, 评价其抗癌活性和毒性, 以期发现高效、低毒的抗癌先导化合物。

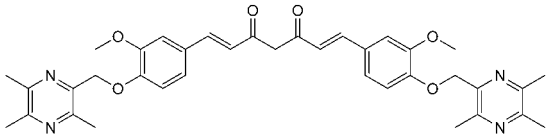


图 1 CU-T 结构式

## 1 材料

**1.1 仪器** BDS200 型倒置显微镜(奥特光学 OPTec 公司)、E103G 型解剖显微镜(Classica 公司)、CJT 型超净工作台(北京长城空气净化工程公司)、X-5 型显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司);  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  由 AM-500 型核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)测定,  $\text{CDCl}_3$  为溶剂, TMS 为内标; HP1100 型 LC/MSD 质谱仪(美国 Agilent 公司); IR 谱采用 Nicolet is10 型红外光谱仪测定, KBr 压片; 微量振荡器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司), Biotek Elx800 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司), 96 孔板(Corning 公司)等。

**1.2 试剂** 姜黄素(curcumin, CU)、川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP, 南京泽朗医药科技有限公司)、桂皮酸(cinnamic acid, CA, 上海晶纯实业有限公司)、顺铂(顺氯氨铂, cisplatin, DDP, 齐鲁制药有限公司, H37021358); 0.9% 医用生理盐水(北京双鹤药业); MTT(四甲基偶氮唑蓝, Serva 公司); RPMI-1640(Gibco-BRL 公司); 胎牛血清(FBS)(四季青公司); 青霉素和链霉素、胰蛋白酶、二甲基亚砷(DMSO, Invitrogen 公司); 体外培养 HT-29(人结肠癌细胞)、Bel-7402(人肝癌细胞)、HepG2(人肝癌细胞)、Hela(人宫颈癌细胞)、MDCK(犬肾上皮细胞)由中国医学科学院北京协和医学院提供。

## 2 方法

### 2.1 姜黄素川芎嗪酸酯和姜黄素桂皮酸酯的合成

**2.1.1 川芎嗪酸的制备** 称取 10.000 g (73.529 mmol) 川芎嗪混悬于 100 mL 的蒸馏水中, 将 11.618 g (73.529 mmol) 高锰酸钾, 分 3 批加入,  $37^\circ\text{C}$  油浴, 磁力搅拌 24 h。将上述混合液, 冷却, 抽滤, 滤液用 36% 的盐酸调 pH 1~2, 然后用乙酸乙酯萃取 3 次, 收集乙酸乙酯层并用无水硫酸钠干燥, 减压回收溶剂, 丙酮重结晶, 得到白色川芎嗪酸 6.101 g, 产率 50.0%, 熔点  $162.0 \sim 163.0^\circ\text{C}$ , MS(ESI)  $m/z$  167.0 [ $(\text{M} + 1)^+$ ] $^{[12]}$ , (图 2)。

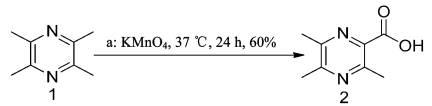


图 2 川芎嗪酸的合成

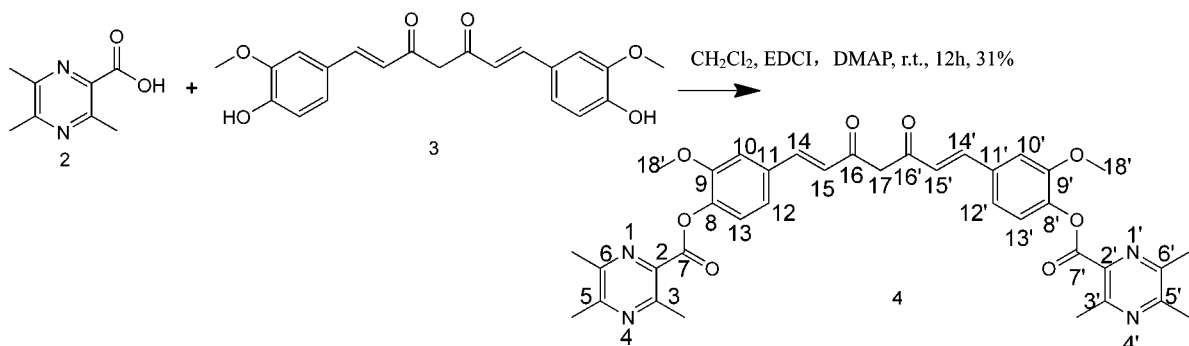
**2.1.2 姜黄素川芎嗪酸酯(4)的合成** 称取 0.359 g (2.16 mmol) 川芎嗪酸、0.413 g (2.16 mmol) EDCI 和 0.026 g (0.216 mmol) DMAP 于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 25 mL 无水二氯甲烷, 磁力搅拌 1 h, 然后加入 0.795 g (2.16 mmol) 姜黄素, 常温搅拌 12 h, TLC 检测反应程度, 待原料基本消失后, 停止反应, 减压浓缩, 加入 3.3 g 硅胶拌样, 减压蒸干, 上硅胶柱, 石油醚-丙酮(5:1)洗脱, 丙酮重结晶, 得到化合物 4(图 2), 淡黄色固体 0.44 g(图 3), 产率 30.7%, 熔点  $185.7 \sim 186.7^\circ\text{C}$ 。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 3.92 (s, 6H, H-18, 18'), 15.89 (s, 1H, H-17), 5.91 (s, 1H, H-17), 6.63 (d,  $J = 16.0$  Hz, 2H, H-15, 15'), 7.68 (d,  $J = 16.0$  Hz, 2H, H-14, 14'), 7.20 ~ 7.26 (m, 6H, H-10, 12, 13, 10', 12', 13'); pyrazine ring: 2.87 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -6, 6'), 2.66 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -5, 5'), 2.65 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -3, 3')。  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 138.3 [C(8, 8')], 151.4 [C(9, 9')], 111.5 [C(10, 10')], 134.2 [C(11, 11')], 124.4 [C(12, 12')], 121.1 [C(13, 13')], 141.5 [C(14, 14')], 123.5 [C(15, 15')], 183.1 [C(16, 16')], 101.9 C(17), 56.0 [C(18, 18')]; Pyrazine ring: 163.7 [C(7, 7')], 140.0 [C(2, 2')], 149.7 [C(3, 3')], 155.3 [C(5, 5')], 152.5 [C(6, 6')], 22.8 (6, 6'- $\text{CH}_3$ ), 22.3 (5, 5'- $\text{CH}_3$ ), 21.7 (3, 3'- $\text{CH}_3$ )。

$\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 454.57, 2 937.23, 1 752.71, 1 628.77 和 1 159.00。

**2.1.3 桂皮酰氯(6)的合成** 称取 0.639 g (4.32 mmol) 桂皮酸溶于 0.514 g (4.32 mmol) 二氯亚砷溶液中, 回流搅拌 2 h, 停止反应, 减压浓缩, 得到白色固体 6(图 4)。

**2.1.4 姜黄素桂皮酸酯(7)的合成** 称取 0.359 g (2.16 mmol) 桂皮酰氯、0.795 g (2.16 mmol) 姜黄素、0.218 g (2.16 mmol) 三乙胺溶于 25 mL 无水二氯甲烷中, 常温搅拌 12 h, 用 TLC 检测反应程度, 待原料基本反应后, 停止反应, 减压浓缩, 加入 3.3 g 硅胶拌样, 减压蒸干, 石油-丙酮 5:1 洗脱, 丙酮重结晶, 得到化合物 7, 淡黄色固体 1.15 g(图 5), 产率



2. TMP-COOH; 3. CU; 4. 1,7-bis(4-(3,5,6-trimethylpyrazin)-2-carboxylate ester)-1,6-heptadiene-3,5-dione

图3 化合物4的合成

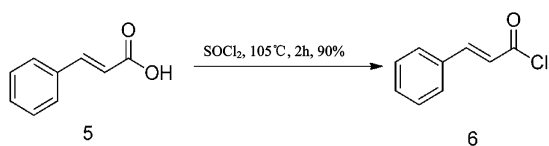
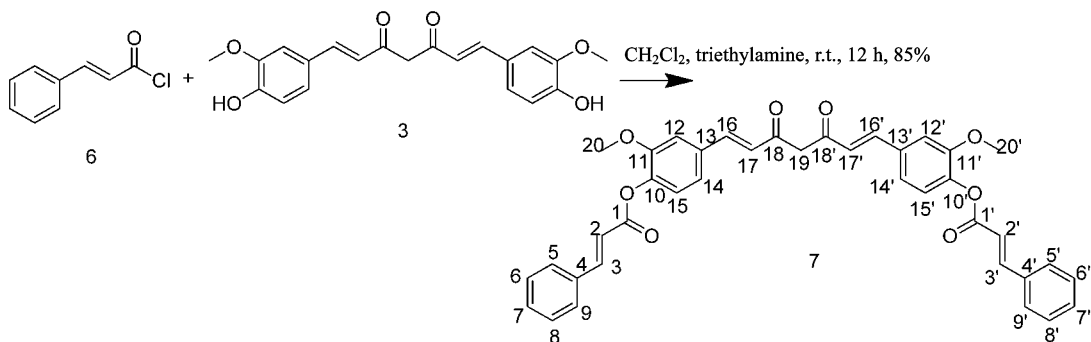


图4 桂皮酰氯合成路线

84.7%, 熔点 205.5 ~ 206.4 °C。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$ : 3.92 (s, 6H, H-20, 20'), 15.90 (s, 1H, H-19), 5.91 (s, 1H, H-19), 6.62 (d,  $J = 15.0$  Hz, 2H, H-17, 17'), 7.67 (d,  $J = 15.0$  Hz, 2H, H-16, 16'), 6.70 (d,  $J = 15.0$  Hz, 2H, H-2, 2'), 7.92 (d,  $J = 15.0$  Hz, 2H, H-3, 3'), 7.17 ~ 7.69 (m, 6H, H-5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 15, 5', 6', 7', 8', 9', 12', 14', 15')。  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 151.6 [C(10, 10')], 147.1 [C(11, 11')], 111.5 [C(12, 12')], 134.0 [C(13, 13')], 124.3 [C(14, 14')], 116.7 [C(15, 15')], 140.1 [C(16, 16')], 121.2 [C(17, 17')], 183.1 [C(18, 18')], 101.9 [C(19)], 56.0 [C(20, 20')].



3. CU; 6. cinnamoyl chloride; 7. [2E, 2'E)-((1E, 6E)-3, 5-dioxohepta-1, 6-diene-1, 7-diyl]

bis(2-methoxy-4, 1-phenylene) bis(3-phenylacrylate)

图5 化合物7的合成

164.8 [C(1, 1')], 123.5 [C(2, 2')], 141.4 [C(3, 3')], 134.1 [C(4, 4')], 128.4 [C(5, 9, 5', 9')], 129.0 [C(6, 8, 6', 8')], 130.8 [C(7, 7')];  $\text{IR}_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3 447.99, 2 919.20, 1 729.02, 1 634.75和1 135.02。

**2.2 姜黄素及其衍生物对癌细胞的抑制活性和对正常细胞 MDCK 的毒性 MTT 法:**参照本课题组前期工作<sup>[4-5]</sup>,取对数生长期细胞,0.25%胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/mL,每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中,将所要测的化合物用 DMSO 溶解为  $1 \times 10^4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液,再用新鲜配制的培养基稀释至所需浓度后加入接种的细胞中,每孔加入化合物溶液 100  $\mu\text{L}$ ,每个样品设 5 个浓度级别,每一浓度平行 3 孔,对照组加入等体积(含 0.15% DMSO)培养液,每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ 。将 96 孔培养板置于 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养 72 h 后,每孔加入新鲜配置的质量浓度为  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ , 37 °C 下继续培养 4 h 后,除去上清液。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解 formazan 沉淀,置微量振荡器上震荡 5 min 使其充分溶解。在

BIOTEK Elx800 型酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度(A)。按下列公式计算肿瘤细胞生成抑制率,再以药物浓度对肿瘤细胞生成抑制率作图得到量效曲线。根据线性回归方程求出该药物的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。实验重复 3 次。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率} = (1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$$

### 3 结果

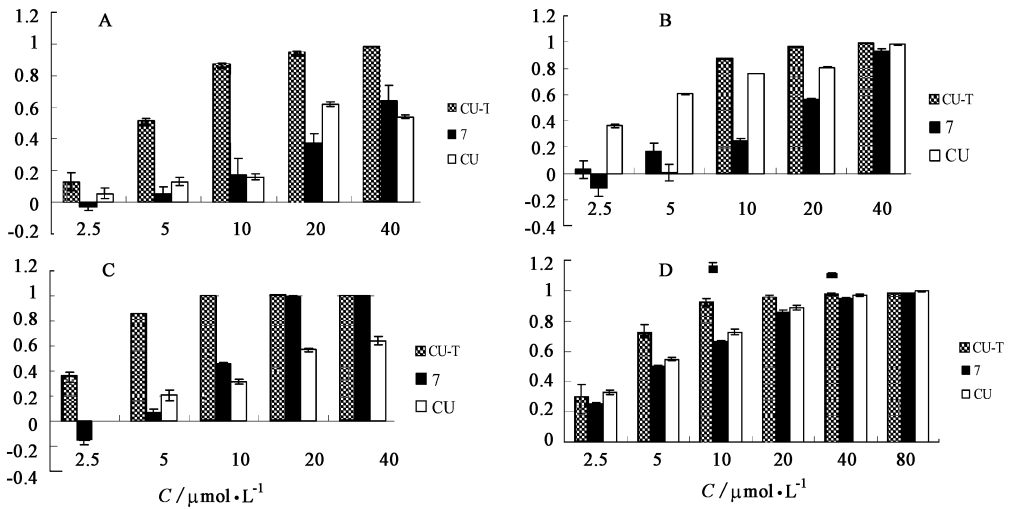
姜黄素衍生物对癌细胞的增殖抑制活性及正常细胞的毒性 MTT 结果表明:针对 4 种肿瘤细胞株,化合物 CU-T 和 7 均具有较好的抑制癌细胞增殖活性,其 IC<sub>50</sub> 与顺铂相当,明显强于前体合成原料(TMP,CA,CU),对肿瘤细胞抑制作用具有剂量依赖性。随着药物浓度的增加,肿瘤细胞存活率明显降低,倒置显微镜下观察发现姜黄素衍生物作用于癌细胞后胞质中颗粒、空泡增多,部分细胞漂浮、死

亡,细胞数明显减少;除顺铂外,其他化合物对正常 MDCK 细胞未发现毒性反应,结果见表 1 和图 6。

表 1 姜黄素衍生物及其前体合成原料的抗肿瘤活性  
μmol·L<sup>-1</sup>

化合物	IC <sub>50</sub>				
	HepG2	Bel-7402	HT-29	Hela	MDCK
TMP, CA	> 20	> 20	> 20	> 20	> 80
CU-T	4. 815	6. 769	3. 785	3. 147	> 80
4	> 20	> 20	> 20	> 20	> 80
7	3. 449	9. 684	8. 073	4. 027	> 80
CU	10. 390	18. 700	15. 960	4. 635	> 80
DDP	4. 565	5. 914	5. 278	5. 472	14. 700

注:IC<sub>50</sub> 计算软件:Graphpad Prism 5.0。



A. 不同浓度的姜黄素及其衍生物对 HepG2 细胞的抑制率(72 h); B. 不同浓度的姜黄素及其衍生物对 Bel-7402 细胞的抑制率(72 h); C. 不同浓度姜黄素及其衍生物对 HT-29 细胞的抑制率(72 h); D. 不同浓度姜黄素及其衍生物对 Hela 细胞的抑制率(72 h)

图 6 不同浓度姜黄素及其衍生物对 4 种癌细胞的抑制效果( $\bar{x} \pm s$ )

### 4 讨论

姜黄素及其衍生物对正常犬肾上皮细胞 MDCK 几乎无毒性,而顺铂对 MDCK 细胞表现出较强的毒性,这与临床上顺铂主要产生肾毒性报道相吻合<sup>[13-15]</sup>,提示姜黄素类化合物对癌细胞抑制的同时,不会产生肾毒性,为进一步的体内实验研究提供了依据。此外,化合物 4 和 CU-T 的抗癌活性基本一致,提示川芎嗪与姜黄素的无论是酯键拼合,还是醚键拼合均能显著增强抗癌效果,为后期姜黄素衍生物的结构设计提供了思路。

当前,诸多文献报道姜黄素体外具有良好的抗癌活性<sup>[3,9,10,16]</sup>,但临床研究表明其生物利用度很

低<sup>[17]</sup>,而川芎嗪不仅具有良好的口服吸收性,还能透过血脑屏障<sup>[18]</sup>,通过将姜黄素和川芎嗪拼合,获得的姜黄素衍生物,或能改善姜黄素的生物利用度低的缺陷,具备良好的口服吸收性,本课题组在今后将做进一步探讨。

姜黄素衍生物 4 和 7, CU-T,通过对体外 4 种人源性癌细胞模型均具有良好的抑制活性,效果显著优于姜黄素,但其作用机制尚不清楚,本课题组正在应用 S180 和 H22 荷瘤小鼠模型开展此类结构的体内抗癌药效学及作用机制研究,以期发现新型高效、低毒的姜黄素类抗癌先导化合物。

## [参考文献]

- [1] 王忠雷, 张小华, 杨丽燕, 等. 拮合原理在降血糖新药研发中的应用设想[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 351.
- [2] Wang P L, Cheng Y T, Xu K, et al. Synthesis and anti-tumor evaluation of one novel etramethylpyrazine-Rhein derivative [J]. Asian J Chem, 2013, 25(9): 4885.
- [3] Wang P L, She G M, Yang Y N, et al. Synthesis and biological evaluation of new ligustrazine derivatives as anti-tumor agents[J]. Molecules, 2012, 17(5): 4972.
- [4] Wang P L, Zhang Y Z, Xu K, et al. A new ligustrazine derivative. Pharmacokinetic evaluation and antitumor activity by suppression of NF- $\kappa$ B/p65 and COX-2 expression in S180 mice[J]. Die Pharmazie, 2013, 68(9): 782.
- [5] 倪敏, 陈樟树, 彭永海. 十全大补汤配合腹腔化疗对进展期胃癌术后的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(3): 288.
- [6] 郭刚, 许建华. 十全大补汤抑制肿瘤侵袭、转移的研究概述[J]. 环球中医药, 2011, 4(1): 74.
- [7] Yin J, Yu C, Yang Z, et al. Tetramethylpyrazine inhibits migration of SKOV3 human ovarian carcinoma cells and decreases the expression of interleukin-8 via the ERK1/2, p38 and AP-1 signaling pathways [J]. Oncol Rep, 2011, 26(3): 671.
- [8] Zheng C Y, Xiao W, Zhu M X, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by tetramethylpyrazine and its effects on A549 cell invasion and metastasis[J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 2029.
- [9] Kunnumakkara A B, Anand P, Aggarwal B B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 199.
- [10] Bill M A, Bakan C, Benson D M J, et al. Curcumin induces proapoptotic effects against human melanoma cells and modulates the cellular response to immunotherapeutic cytokines [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(9): 2726.
- [11] Ekmekecioglu C, Feyertag J, Marktl W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells[J]. Cancer Lett, 1998, 128(2): 137.
- [12] Li Z, Yu F, Cui L, et al. Ligustrazine derivatives. Part 6: design, synthesis and evaluation of novel ligustrazinyl acylguanidine derivatives as potential cardiovascular agents[J]. Med Chem, 2012, 8(5): 928.
- [13] 廖英俊, 汤浩, 金亚平. 抗癌药顺铂对小鼠的耳、肾和肝毒性及其机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 82.
- [14] 邓成艳, 黄荣丽, 连利娟, 等. 顺铂的毒副作用及其防治[J]. 中华妇产科杂志, 1995, 30(6): 376.
- [15] 汪明明, 崔速南, 潘启超. 顺铂的肾毒性作用及其防治[J]. 癌症, 1990, 9(3): 259.
- [16] 范昊宁, 佟丽, 范钦. 姜黄素对肿瘤的抑制和放射增敏作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 333.
- [17] Garcea G, Jones D J, Singh R, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration[J]. Br J Cancer, 2004, 90(5): 1011.
- [18] 孙寒静, 吴伟, 陈宏王, 等. 川芎嗪的药代动力学研究状况 [J]. 中国新药与临床药理, 2002, 13(1): 61.

[责任编辑 邹晓翠]