

· 资源与质量评价 ·

救必应酸衍生物的合成及抗肿瘤活性分析

南敏伦¹, 赫玉芳^{1,2*}, 司学玲³, 赵昱玮¹, 王雪^{1,4}, 白雪^{1,4}, 李川晶^{1,4}

(1. 吉林省中医药科学院, 长春 130012; 2. 长春中医药大学, 长春 130118;

3. 修正药业集团长春高新制药有限公司, 长春 130012; 4. 吉林农业大学, 长春 130118)

[摘要] 目的:设计、合成以救必应酸(rotundic acid)为母核,引入芳香酯类基团的系列救必应酸衍生物,测试其抑制肿瘤细胞增殖活性,探讨救必应酸衍生物抑制肿瘤细胞增殖的构效关系,获得抗肿瘤活性更好的救必应酸衍生物。方法:以救必应酸为起始原料,通过 28 位酯化,3 β 位和 23 位二芳香酯化反应合成目标化合物 **1~8**。以人恶性黑色素瘤细胞(A375),人宫颈癌细胞(HeLa),人肺腺癌细胞(SPC-A1),人肝癌细胞(HepG2)为靶细胞,采用噻唑蓝(MTT)法对所合成的化合物进行体外抗肿瘤活性评价。结果:化合物 **2~8** 共 7 个救必应酸衍生物均为新化合物,其结构经熔点(MP),高分辨质谱(HR-ESI-MS),核磁共振氢谱(¹H-NMR),核磁共振碳谱(¹³C-NMR)表征均为目标化合物。MTT 实验结果表明化合物 **3,5** 和 **8** 均具有显著的抗肿瘤活性,特别是化合物 **5** 对 HeLa, A375, HepG2, SPC-A1 细胞的半抑制浓度(IC₅₀)分别为(5.25 ± 1.08), (5.99 ± 0.88), (3.31 ± 1.89), (5.74 ± 1.78) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,救必应酸分别是其的 1.92, 3.22, 3.79, 3.72 倍。结论:化合物 **5** 具有显著的抗肿瘤活性,具有进一步研究、开发抗肿瘤新药的意义。

[关键词] 救必应酸; 衍生物; 合成; 抗肿瘤

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0139-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190414

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181101.1612.013.html>

[网络出版时间] 2018-11-05 15:09

Synthesis and Anti-tumor Activity of New Rotundic Acid Derivatives

NAN Min-lun¹, HE Yu-fang^{1,2*}, SI Xue-ling³, ZHAO Yu-wei¹, WANG Xue^{1,4}, BAI Xue^{1,4}, LI Chuan-jing^{1,4}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences of Jilin Province, Changchun 130012, China;

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130118, China;

3. Xiuzheng Pharmaceutical Changchun Hi-tech Pharmaceutical Co. Ltd., Changchun 130012, China;

4. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] **Objective:** To design and synthesize series of rotundic acid derivatives by introducing aromatic ester groups with rotundic acid as the parent nucleus, test their anti-tumor activity *in vitro*, investigate the structure-activity relationship of rotundic acid derivatives in inhibiting tumor cell proliferation, and obtain the novel rotundic acid derivatives with high anti-tumor activity. **Method:** Compounds **1-8** were synthesized with rotundic acid as the initial raw material through the 28-etherification, 3 β and 23di-aromatic esterification eaction. The anti-tumor activities *in vitro* were evaluated by MTT assay against A375 (human malignant melanoma cells), HeLa (human cervical cancer cells), SPC-A1 (human lung adenocarcinoma cells), and HepG2 (human liver cancer cells). **Result:** Compounds **2-8** were new compounds. Their structures were identified by melting point (MP), high resolution electrospray ionization tandem mass spectrometry (HR-ESI-MS), ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR). MTT results showed that compounds **3, 5** and **8**

[收稿日期] 20180612(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31470418)

[第一作者] 南敏伦,副研究员,从事植物化学及结构修饰研究,E-mail:nml2000@163.com

[通信作者] *赫玉芳,研究员,从事植物化学及结构修饰研究,Tel:0431-86058683,E-mail:hyf_1992@163.com

exhibited significant anti-tumor activity, especially compound **5** was found to have the best inhibition activity on HeLa, A375, HepG2 and SPC-A1 with IC_{50} values of (5.25 ± 1.08) , (5.99 ± 0.88) , (3.31 ± 1.89) , $(5.74 \pm 1.78) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1.92, 3.22, 3.79, 3.72 times of that of rotundic acid, respectively. **Conclusion:** Compound **5** has significant anti-tumor activity with great significance for further research and development of new anti-tumor medicines.

[Key words] rotundic acid; derivatives; synthesis; anti-tumor

救必应酸 (rotundic acid, RA) 是一种五环三萜酸类化合物, 主要存在于铁冬青^[1]、四季青^[2] 和全缘冬青^[3] 等冬青属植物中。文献报道 RA 具有抗肿瘤^[4]、降血脂^[5]、预防和治疗心脑血管疾病^[6] 等药理作用, 特别其抗肿瘤活性引起了广大学者们的关注。虽然 RA 有一定的抗肿瘤的生物学活性, 但由于 RA 为五环三萜酸类化合物, 极性较小, 脂溶性较强, 生物利用度较低。为改善其生物学活性, 从根本上提高 RA 的生物利用度进而提高其活性是开发 RA 亟待解决的问题。

近年来从天然中草药入手, 找到先导化合物, 然后经过化学修饰得到溶解性更好、生物学活性更强、疗效更确切的化合物是目前新药研发的趋势和热点。国内外学者已经开展了对五环三萜类化合物的结构修饰工作, 如齐敦果酸^[7-8]、熊果酸^[9]、桦木酸^[10] 等进行抗肿瘤活性研究, 而且已筛选出一些高溶解度、高活性、低毒性的化合物。

受此启发, 本课题组开展了 RA 的结构修饰及抗肿瘤活性研究工作。RA 的化学结构特点是含有 $3\beta\text{-OH}$, $19\alpha\text{-OH}$, 23-OH 共 3 个羟基基团, 在 28 位含有 1 个羧基基团, 这说明 RA 分子中含有可修饰的化学位点, 而且分子结构复杂程度相对较低, 有利于增加反应产物的纯度和收率。本课题组的前期工作表明, RA 可以从铁冬青中产业化大量制备, 收率可达 5% 以上。因此, RA 无论从原料易得程度、抗肿瘤活性、化学结构特点方面都适于进行结构修饰研究。到目前为止, 本课题组已进行了部分结构修饰及其抗肿瘤活性、机制的研究工作, 并已发表了相关论文^[11-12]。除本课题组之外, 未见关于 RA 结构修饰的相关报道。

根据文献报道在药物母体上引入亲脂基团, 提高其脂溶性, 能够增强其透过血脑屏障的能力^[13], 进而提高其生物学活性。参考以上文献, 进行了论文中救必应酸芳香酯化的结构修饰。

本实验对合成的救必应酸衍生物进行体外抗肿瘤试验 [噻唑蓝 (MTT) 法], 评价救必应酸衍生物在抗肿瘤方面的活性, 并探讨化学结构与抗肿瘤作用

之间的构效关系, 同时也希望能够发现抗肿瘤活性更好的化合物, 为新型抗肿瘤药物的开发提供更多的依据。具体设计路线见图 1。

1 材料

IX83 型倒置显微镜, SZ61 型解剖显微镜 (奥林巴斯); VS-1300L 型超净工作台 (昆明苏净科技有限公司); X-4 型熔点测定仪 (巩义市予华仪器有限责任公司); DD2 400-MR 型核磁共振仪, 7900IPC-MSD 型质谱仪 (美国安捷伦); MR-96A 型酶标仪 (迈瑞医疗有限公司); 96 孔板 (Corning 公司)。

救必应酸 (自制, 经 HPLC 测定, 峰面积归一化法计算纯度为 99.2%); MTT, 胰蛋白酶, 二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司); 胎牛血清 (上海玉博生物科技有限公司); 体外培养人恶性黑色素瘤细胞 (A375), 人宫颈癌细胞 (HeLa), 人肺腺癌细胞 (SPC-A1), 人肝癌细胞 (HepG2), 犬肾上皮细胞 (MDCK) 由吉林大学基础医学院提供。

2 方法

2.1 衍生物的合成

2.1.1 化合物 1 的合成 取救必应酸 0.976 g (0.002 mol), 置圆底烧瓶中, 加入 *N,N*-二甲基甲酰胺 30 mL, 无水碳酸钾 0.966 g (0.007 mol), 边搅拌边加入碘甲烷 0.62 mL (0.01 mol), 以石油醚-乙酸乙酯 (1:1) 进行 TLC 检测, 室温搅拌 6 h, 反应完毕后, 加入水 200 mL, 搅拌, 过滤, 滤饼用水洗脱至中性, 用乙酸乙酯 100 mL 溶解, 依次用饱和碳酸氢钠, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液, 水各洗脱 3 次, 每次 30 mL, 无水硫酸钠脱水, 过滤, 回收溶剂, 干燥, 即得化合物 1。

化合物 1 救必应酸甲酯, 白色粉末 0.84 g, 产率为 83.7%; mp 249.8 ~ 251.7 °C; MS (ESI) m/z 525 [$M + Na$]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ : 5.19 (1H, 2-CH), 4.39 (1H, 19-OH), 4.14 (1H, 3-OH), 3.85 (1H, 23-OH), 3.50 (3H, 1'-CH₂), 3.44 ~ 3.41 (1H, 3-CH), 3.32 (1H, 23-CH₂), 3.09 ~ 3.06 (1H, 23-CH₂), 2.61 ~ 2.54 (1H, 11-CH₂), 2.40 (1H, 18-CH), 1.88 ~ 1.45 (14H), 1.29 (3H, 30-CH₃),

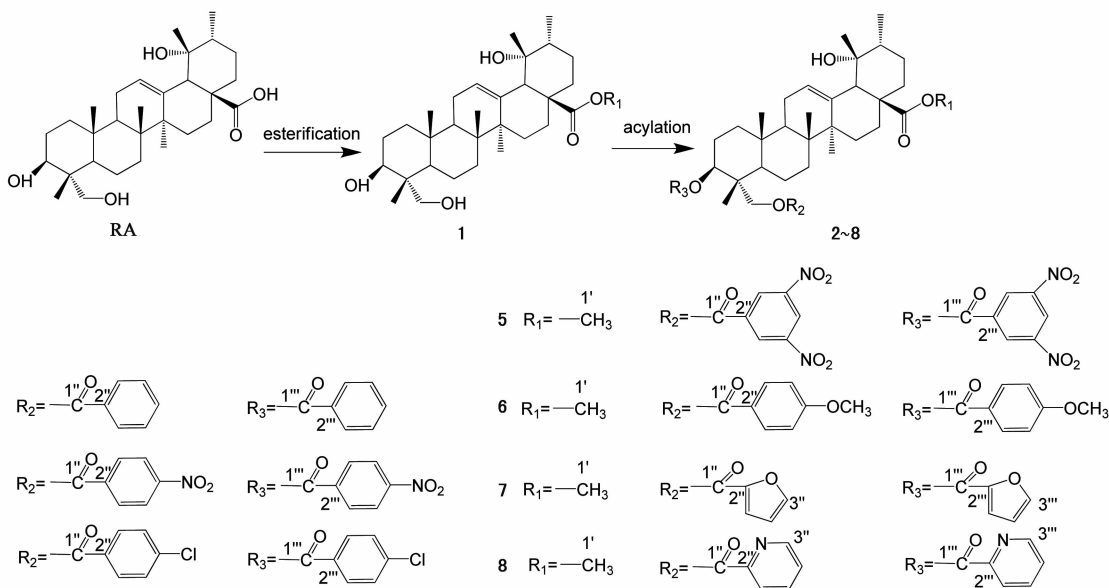


图 1 目标化合物合成路线

Fig.1 Synthetic route of target compounds

1. 25 ~ 1.13 (5H), 1.08 (3H, 27-CH₃), 0.93 ~ 0.91 (1H), 0.87 (3H, 24-CH₃), 0.84 (3H, d, J = 6.9 Hz, 29-CH₃), 0.60 (3H, 26-CH₃), 0.53 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177.41 (C-28), 138.28 (C-13), 127.20 (C-12), 71.62 (C-3), 70.52 (C-19), 64.69 (C-23), 53.31 (C-18), 51.19 (C-1'), 47.49 (C-5), 46.67 (C-9), 46.54 (C-17), 41.81 (C-20), 41.33 (C-14), 41.05 (C-8), 39.24 (C-1), 38.01 (C-4), 37.16 (C-22), 36.23 (C-10), 32.16 (C-7), 28.02 (C-15), 26.54 (C-21), 26.29 (C-29), 25.80 (C-2), 25.13 (C-16), 24.08 (C-27), 23.14 (C-11), 17.57 (C-6), 16.29 (C-25), 16.17 (C-26), 15.41 (C-30), 12.55 (C-24)。

2.1.2 化合物 2 ~ 8 的合成 取救必应酸甲酯 0.75 g (0.0015 mol), 溶于二氯甲烷 100 mL 中, 加入芳香酸 0.0045 mol, 4-二甲氨基吡啶 0.366 g (0.003 mol), 搅拌使其完全溶解, 加入二环己基碳二亚胺 (DCC) 0.582 g (0.003 mol), 室温反应 24 h, 滤过, 滤液用水、饱和食盐水各洗 3 次, 每次 25 mL, 二氯甲烷液用无水硫酸钠脱水, 回收溶剂, 以石油醚-乙酸乙酯柱色谱, 收集相同组分, 回收溶剂, 用乙醇溶解, 析晶, 滤过, 干燥, 即得化合物 2 ~ 8。

化合物 2 3,23-O-双(苯甲酰基)救必应酸甲酯, 白色粉末 0.49 g, 产率为 48.7%; mp 154.3 ~ 156.1 °C; MS (ESI) m/z 711.42 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7.98 ~ 7.94 (4H, m), 7.69 ~ 7.63 (2H, m), 7.55 ~ 7.48 (4H, m), 5.21 (1H, 12-

CH), 5.04 ~ 4.98 (1H, 19-OH), 4.17 ~ 4.13 (1H, 3-CH), 4.00 ~ 3.96 (1H, 23-CH₂), 3.87 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.58 ~ 2.54 (1H, 11-CH₂), 2.41 (1H, 18-CH), 1.93 ~ 1.41 (16H), 1.31 ~ 1.29 (1H), 1.24 (3H, 30-CH₃), 1.16 ~ 1.14 (3H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 1.04 (3H, 24-CH₃), 1.01 (3H, 26-CH₃), 0.84 (3H, d, J = 6.6 Hz, 29-CH₃), 0.65 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177.38 (C-28), 165.10 (C-1''), 165.04 (C-1'''), 138.30 (C-13), 133.39 (C-5''), 133.24 (C-5'''), 129.99 (C-2''), 129.64 (C-2'''), 129.10 (C-4'' 和 C-6''), 128.98 (C-3'' 和 C-7''), 128.85 (C-4''' 和 C-6'''), 128.72 (C-3''' 和 C-7'''), 127.05 (C-12), 75.03 (C-3), 71.61 (C-19), 65.33 (C-23), 53.40 (C-18), 51.22 (C-1'), 47.92 (C-5), 47.54 (C-9), 47.03 (C-17), 41.33 (C-20), 41.05 (C-14), 40.99 (C-8), 37.66 (C-1), 37.10 (C-4), 36.24 (C-22), 32.22 (C-10), 27.95 (C-7), 26.28 (C-15), 25.79 (C-21), 25.11 (C-29), 25.01 (C-2), 23.55 (C-16), 23.13 (C-27), 22.68 (C-11), 17.73 (C-6), 16.30 (C-25), 16.16 (C-26), 15.27 (C-30), 12.89 (C-24)。

化合物 3 3,23-O-双(4-硝基苯甲酰基)救必应酸甲酯, 白色粉末 0.47 g, 产率为 39.2%; mp 148.3 ~ 150.7 °C, MS (ESI) m/z 801.39 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 8.33 ~ 8.28 (m, 4H), 8.18 ~ 8.14 (4H, m), 5.21 (1H, 12-CH), 5.09 ~ 5.03 (1H, 19-OH), 4.25 ~ 4.21 (1H, 3-CH),

4. 10 ~ 4. 06 (1H, 23-CH₂), 3. 87 (1H, 23-CH₂), 3. 50 (3H, 1'-CH₃), 2. 59 ~ 2. 54 (1H, 11-CH₂), 2. 41 (1H, 18-CH), 1. 93 ~ 1. 38 (14H), 1. 24 (3H, 30-CH₃), 1. 22 ~ 1. 14 (5H), 1. 09 (3H, 27-CH₃), 1. 08 (3H, 24-CH₃), 1. 01 (3H, 26-CH₃), 0. 94 ~ 0. 88 (1H), 0. 84 (3H, d, *J* = 6. 6 Hz, 29-CH₃), 0. 65 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177. 38 (C-28), 163. 69 (C-1''), 163. 67 (C-1'''), 150. 26 (C-5''), 150. 22 (C-5'''), 138. 30 (C-13), 135. 30 (C-2''), 134. 96 (C-2'''), 130. 61 (C-3'' 和 C-7''), 130. 45 (C-3''' 和 C-7'''), 127. 04 (C-12), 123. 93 (C-4'' 和 C-6''), 123. 80 (C-4''' 和 C-6'''), 76. 32 (C-3), 71. 60 (C-19), 66. 54 (C-23), 53. 41 (C-18), 51. 21 (C-1'), 48. 06 (C-5), 47. 54 (C-9), 46. 85 (C-17), 41. 33 (C-20), 41. 10 (C-14), 41. 02 (C-8), 37. 37 (C-1), 37. 09 (C-4), 36. 28 (C-22), 32. 25 (C-10), 27. 96 (C-7), 26. 25 (C-15), 25. 79 (C-21), 25. 63 (C-29), 25. 11 (C-2), 23. 55 (C-16), 23. 13 (C-27), 22. 64 (C-11), 17. 76 (C-6), 16. 29 (C-25), 16. 15 (C-26), 15. 28 (C-30), 12. 73 (C-24)。

化合物4 3,23-*O*-双(4-氯苯甲酰基)救必应酸甲酯, 白色粉末 0. 56 g, 产率为 47. 9%; mp 177. 6 ~ 179. 0 °C; MS (ESI) *m/z* 779. 34 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7. 96 ~ 7. 93 (m, 4H), 7. 60 ~ 7. 55 (4H, m), 5. 20 (1H, 12-CH), 5. 03 ~ 4. 97 (1H, 19-OH), 4. 20 ~ 4. 16 (1H, 3-CH), 3. 98 ~ 3. 94 (1H, 23-CH₂), 3. 87 (1H, 23-CH₂), 3. 50 (3H, 1'-CH₃), 2. 61 ~ 2. 54 (1H, 11-CH₂), 2. 40 (1H, 18-CH), 1. 91 ~ 1. 35 (16H), 1. 23 (3H, 30-CH₃), 1. 19 ~ 1. 14 (3H), 1. 09 (3H, 27-CH₃), 1. 03 (3H, 24-CH₃), 1. 00 (3H, 26-CH₃), 0. 90 ~ 0. 88 (1H), 0. 84 (3H, d, *J* = 6. 6 Hz, 29-CH₃), 0. 65 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177. 39 (C-28), 164. 29 (C-1''), 164. 23 (C-1'''), 138. 36 (C-13), 138. 31 (C-5'''), 138. 24 (C-5''), 130. 97 (C-3'' 和 C-7''), 130. 81 (C-3''' 和 C-7'''), 128. 91 (C-4'' 和 C-6''), 128. 77 (C-4''' 和 C-6'''), 128. 42 (C-2''), 127. 16 (C-2'''), 127. 07 (C-12), 75. 53 (C-3), 71. 60 (C-19), 65. 81 (C-23), 53. 41 (C-18), 51. 24 (C-1'), 48. 00 (C-5), 47. 54 (C-9), 46. 95 (C-17), 41. 33 (C-20), 41. 07 (C-14), 41. 00 (C-8), 37. 53 (C-1), 37. 11 (C-4), 36. 25 (C-22), 32. 23 (C-10), 27. 95 (C-7), 26. 27 (C-15), 25. 80 (C-21), 25. 10 (C-29), 25. 00 (C-2), 23. 53 (C-16), 23. 13 (C-27), 22. 67 (C-11), 17. 74 (C-6), 16. 31 (C-25), 16. 18 (C-26), 15. 27 (C-30), 12. 79 (C-24)。

化合物5 3,23-*O*-双(3,5-二硝基苯甲酰基)救必应酸甲酯, 淡黄色粉末 0. 42 g, 产率为 31. 4%; mp 217. 5 ~ 219. 2 °C; MS (ESI) *m/z* 891. 37 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 9. 06 ~ 9. 04 (m, 2H), 8. 91 ~ 8. 88 (4H, m), 5. 22 (1H, 12-CH), 5. 12 ~ 5. 06 (1H, 19-OH), 4. 37 ~ 4. 33 (1H, 3-CH), 4. 18 ~ 4. 15 (1H, 23-CH₂), 3. 91 (1H, 23-CH₂), 3. 52 (3H, 1'-CH₃), 2. 64 ~ 2. 54 (1H, 11-CH₂), 2. 42 (1H, 18-CH), 1. 96 ~ 1. 58 (16H), 1. 35 (3H, 30-CH₃), 1. 30 ~ 1. 16 (3H), 1. 12 (3H, 27-CH₃), 1. 10 (3H, 24-CH₃), 1. 05 (3H, 26-CH₃), 0. 94 ~ 0. 90 (1H), 0. 85 (3H, d, *J* = 6. 6 Hz, 29-CH₃), 0. 68 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177. 39 (C-28), 162. 07 (C-1''), 161. 93 (C-1'''), 148. 41 (C-4'' 和 C-6''), 148. 38 (C-4''' 和 C-6'''), 138. 43 (C-13), 132. 66 (C-2''), 132. 36 (C-2'''), 128. 71 (C-3'' 和 C-7''), 128. 55 (C-3''' 和 C-7'''), 126. 83 (C-12), 122. 62 (C-5''), 122. 51 (C-5'''), 76. 82 (C-3), 71. 62 (C-19), 66. 55 (C-23), 53. 26 (C-18), 51. 21 (C-1'), 48. 06 (C-5), 47. 46 (C-9), 46. 72 (C-17), 41. 30 (C-20), 41. 12 (C-14), 41. 88 (C-8), 37. 39 (C-1), 37. 13 (C-4), 36. 35 (C-22), 32. 23 (C-10), 27. 99 (C-7), 26. 26 (C-15), 25. 77 (C-21), 25. 22 (C-29), 25. 09 (C-2), 23. 66 (C-16), 23. 08 (C-27), 22. 50 (C-11), 17. 60 (C-6), 16. 17 (C-25), 16. 13 (C-26), 15. 34 (C-30), 12. 84 (C-24)。

化合物6 3,23-*O*-双(对甲氧基苯甲酰基)救必应酸甲酯, 白色粉末 0. 56 g, 产率为 48. 4%; mp 242. 2 ~ 243. 9 °C; MS (ESI) *m/z* 771. 54 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7. 93 ~ 7. 88 (m, 4H), 7. 06 ~ 7. 00 (m, 4H), 5. 21 (1H, 12-CH), 4. 99 ~ 4. 94 (1H, 19-OH), 4. 13 ~ 4. 09 (1H, 3-CH), 3. 91 ~ 3. 87 (1H, 23-CH₂), 3. 83 (6H), 3. 50 (3H, 1'-CH₃), 3. 48 ~ 3. 43 (1H, 23-CH₂), 2. 59 ~ 2. 54 (1H, 11-CH₂), 2. 41 (1H, 18-CH), 1. 93 ~ 1. 39 (16H), 1. 24 (3H, 30-CH₃), 1. 18 ~ 1. 12 (3H), 1. 09 (3H, 27-CH₃), 1. 02 (3H, 24-CH₃), 1. 00 (3H, 26-CH₃), 0. 95 ~ 0. 88 (1H), 0. 85 (d, *J* = 6. 6 Hz, 3H, 29-CH₃), 0. 65 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177. 35 (C-28), 164. 74 (C-1''), 163. 10 (C-1'''), 138. 27 (C-13), 131. 14 (C-5''), 131. 02 (C-5'''), 127. 05 (C-12), 122. 21 (C-3''', C-3'', C-7'', C-7'''), 121. 82 (C-2''', C-2''), 113. 97 (C-4'', C-6'', C-4''', C-6'''), 74. 58 (C-3), 71. 56 (C-19), 65. 07 (C-23),

55.48 (C-18), 55.47 (C-5"-OCH₃ 和 C-5'"-OCH₃), 53.36 (C-1'), 47.90 (C-5), 47.49 (C-9), 46.99 (C-17), 41.29 (C-20), 40.99 (C-14), 40.93 (C-8), 37.64 (C-1), 37.07 (C-4), 36.20 (C-22), 32.16 (C-10), 27.90 (C-7), 26.24 (C-15), 25.76 (C-21), 25.49 (C-29), 25.07 (C-2), 23.52 (C-16), 23.09 (C-27), 22.71 (C-11), 17.71 (C-6), 16.26 (C-25), 16.13 (C-26), 15.23 (C-30), 12.88 (C-24)。

化合物 7 3,23-O-双(咪喃甲酰基)救必应酸甲酯,白色粉末 0.44 g,产率为 42.5%;mp 243.8 ~ 245.3 °C;MS(ESI) *m/z* 691.42 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 7.97 ~ 7.96 (2H, m), 7.30 ~ 7.29 (1H, m), 7.26 ~ 7.25 (1H, m), 6.70 ~ 6.69 (2H, m), 5.20 (1H, 12-CH), 4.94 ~ 4.88 (1H, 19-OH), 4.12 ~ 4.08 (1H, 3-CH), 3.91 ~ 3.88 (1H, 23-CH₂), 3.86 (1H, 23-CH₂), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.59 ~ 2.56 (1H, 11-CH₂), 2.41 (1H, 18-CH), 1.92 ~ 1.43 (16H), 1.24 (3H, 30-CH₃), 1.19 ~ 1.12 (3H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 0.98 (3H, 24-CH₃), 0.96 (3H, 26-CH₃), 0.91 ~ 0.89 (1H), 0.85 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 29-CH₃), 0.64 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177.35 (C-28), 157.36 (C-1"), 157.32 (C-1'''), 147.75 (C-2"), 147.50 (C-2'''), 143.87 (C-3"), 143.63 (C-3'''), 138.28 (C-13), 126.99 (C-12), 118.25 (C-4'''), 118.09 (C-4''), 112.82 (C-5"), 112.17 (C-5'''), 74.91 (C-3), 71.57 (C-19), 65.10 (C-23), 53.34 (C-18), 51.19 (C-1'), 47.63 (C-5), 47.49 (C-9), 46.83 (C-17), 41.29 (C-20), 40.93 (C-14), 40.85 (C-8), 37.42 (C-1), 37.06 (C-4), 36.16 (C-22), 32.08 (C-10), 27.91 (C-7), 26.24 (C-15), 25.75 (C-21), 25.59 (C-29), 25.06 (C-2), 23.65 (C-16), 23.07 (C-27), 22.66 (C-11), 17.66 (C-6), 16.24 (C-25), 16.14 (C-26), 15.24 (C-30), 12.66 (C-24)。

化合物 8 3,23-O-双(吡啶甲酰基)救必应酸甲酯,白色粉末 0.48 g,产率为 44.9%;mp 149.6 ~ 151.1 °C;MS(ESI) *m/z* 713.40 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO) δ: 8.73 ~ 8.68 (2H, ArH), 8.04 ~ 7.95 (4H, ArH), 7.65 ~ 7.61 (2H, ArH), 5.21 (1H, 12-CH), 5.08 ~ 5.03 (1H, 19-OH), 4.21 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, 23-CH₂), 4.03 (1H, d, *J* = 11.7 Hz, 23-CH₂), 3.83 (1H, 3-CH), 3.50 (3H, 1'-CH₃), 2.59 ~ 2.54 (1H, 11-CH₂), 2.41 (1H, 18-CH), 1.98 ~ 1.88 (2H), 1.80 ~ 1.39 (13H), 1.23 (3H, 30-CH₃),

1.20 ~ 1.15 (4H), 1.09 (3H, 27-CH₃), 1.04 (3H, 24-CH₃), 1.00 (3H, 26-CH₃), 0.94 ~ 0.90 (1H), 0.85 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, 29-CH₃), 0.65 (3H, 25-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO) δ: 177.46 (C-28), 164.11 (C-1"), 164.03 (C-1'''), 149.98 (C-2"), 149.89 (C-2'''), 147.92 (C-3"), 147.63 (C-3'''), 138.46 (C-13), 137.47 (C-5"), 137.40 (C-5'''), 127.36 (C-4'''), 127.29 (C-4''), 127.12 (C-12), 124.91 (C-4'''), 124.72 (C-4''), 75.85 (C-3), 71.71 (C-19), 66.05 (C-23), 53.49 (C-18), 51.29 (C-1'), 47.68 (C-5), 47.62 (C-9), 47.02 (C-17), 41.41 (C-20), 41.15 (C-14), 40.09 (C-8), 37.68 (C-1), 37.19 (C-4), 36.33 (C-22), 32.19 (C-10), 28.02 (C-7), 26.43 (C-15), 26.38 (C-21), 25.89 (C-29), 25.19 (C-2), 23.73 (C-16), 23.21 (C-27), 22.71 (C-11), 17.86 (C-6), 16.39 (C-25), 16.24 (C-26), 15.37 (C-30), 12.94 (C-24)。

2.2 救必应酸及其衍生物对肿瘤细胞的抑制活性和对正常细胞 MDCK 的毒性 采用 MTT 法,参照前期工作基础^[14-15],取对数生长期的细胞,用 0.1% 胰蛋白酶消化以后,加入含血清的培养基终止消化,吹打使成单细胞悬液,计数,用培养液稀释成 1 × 10⁵ 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板。于 37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中静置培养 24 h 以后,弃去培养基,加入含供试品(浓度分别为 5, 10, 20, 40 μmol·L⁻¹)的培养基 200 μL。以加入相同浓度的溶媒孔作为阴性组,只加入培养基为空白组。分别培养 24 h 后,加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h,离心 10 min,弃去上清液,加入 DMSO 150 μL,振摇 10 min。用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度 *A*,通过与阴性组的比较得到实验组的相对细胞增殖抑制率。每个样品设 3 个平行孔,试验重复 3 次。可得到同一药物剂量反应曲线,从而求得半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{样品组}}) / (A_{\text{阴性组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

3 结果

MTT 法结果表明,针对 4 种肿瘤细胞株,化合物 3, 5 和 8 均具有较好的抑制癌细胞增殖活性,其 IC₅₀ 明显强于先导化合物 RA,并且具有显著性差异;倒置显微镜下观察发现救必应酸衍生物作用于肿瘤细胞后胞质中颗粒、空泡增多,部分细胞漂浮、死亡,细胞数明显减少;RA 及衍生物对正常 MDCK 细胞未发现毒性反应,结果见表 1。

表 1 救必应酸及其衍生物对肿瘤细胞的 IC₅₀ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化合物	HeLa	A375	HepG2	SPC-A1
RA	10.08 ± 0.85	19.28 ± 1.05	12.56 ± 0.82	21.35 ± 1.06
1	18.35 ± 1.25	20.35 ± 1.12	10.95 ± 1.21	15.32 ± 2.15
2	28.42 ± 1.15	20.60 ± 0.67	34.39 ± 2.87	47.80 ± 2.15
3	5.15 ± 0.58 ¹⁾	7.65 ± 1.08 ¹⁾	6.25 ± 1.85 ¹⁾	6.18 ± 2.05 ¹⁾
4	20.15 ± 1.23	21.69 ± 1.28	18.68 ± 1.65	12.68 ± 1.65
5	5.25 ± 1.08 ¹⁾	5.99 ± 0.88 ¹⁾	3.31 ± 1.89 ¹⁾	5.74 ± 1.78 ¹⁾
6	15.36 ± 2.25	22.35 ± 1.25	18.18 ± 2.35	18.32 ± 2.64
7	13.48 ± 0.52	15.68 ± 0.57	12.01 ± 1.05	18.35 ± 1.18
8	6.05 ± 0.44 ¹⁾	10.32 ± 0.98 ¹⁾	5.68 ± 0.28 ¹⁾	8.62 ± 1.02 ¹⁾

注:与救必应酸比较¹⁾ P < 0.05。对 MDCK 的 IC₅₀ 均 > 100 μmol·L⁻¹。

4 讨论

本文是以从救必应药材中提取、降解、分离得到的 RA 为先导化合物,首先合成得到救必应酸甲酯,再与不同的芳香酸反应得到一系列全新的芳香酯类衍生物,并对其体外抗肿瘤活性进行了研究。实验结果表明 7 个化合物对 4 种肿瘤细胞具有不同的细胞毒性,说明引入芳香酯后衍生物的活性总体上有所提高。其中化合物 3,5 和 8 的抗肿瘤活性明显优于其他化合物,分析其中原因可能是因为在这 3 个化合物中均含有吸电子基团,而化合物 5 的活性优于化合物 3 和 8 的原因是因为在化合物 5 中含有 2 个吸电子基团。化合物 5 对 HeLa, A375, HepG2, SPC-A1 细胞的 IC₅₀ 分别为 5.25, 5.99, 3.31, 5.74 μmol·L⁻¹, RA 分别是其的 1.92, 3.21, 3.79, 3.72 倍。另外,通过分析数据可知合成的 7 个化合物对于 HepG2 活性总体上优于其他 3 种肿瘤细胞,分析原因可能是因为化合物对不同细胞的选择性不同。更进一步的构效关系探讨有待于更深入地研究。

综上所述,本文合成的 7 个救必应酸衍生物均具有一定的抗肿瘤活性,特别是化合物 5,可以作为开发新的抗肿瘤药物的潜在化合物,有待于进一步研究,为研究 RA 的结构修饰及其构效关系奠定了基础,也为从天然药物中寻找安全有效的抗肿瘤化合物提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 孙辉,张晓琦,蔡艳,等. 救必应的化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(1): 111-114.

[2] 解军波,毕志明,李萍. HPLC-ELSD 法测定四季青中三萜及其皂苷的含量[J]. 药学报, 2003, 38(7): 534-536.

[3] Haraguchi H, Kataoka S, Okamoto S, et al. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of

antifungal action [J]. *Phytother Res*, 2015, 13(2): 151-156.

[4] 赵立春. 响应曲面法用于救必应等三种药材高效提取及其提取物的药理活性研究[D]. 保定: 河北大学, 2013.

[5] 刘国樵. 五环三萜皂苷化合物的用途: 中国, CN101342186[P]. 2009-01-14.

[6] 赵全成, 南敏伦, 赫玉芳, 等. 救必应酸在制备防治心脑血管疾病的药物中的应用: 中国, CN101856357A [P]. 2010-10-13.

[7] 贺兴隆. 齐墩果酸衍生物的合成与表征及其抑菌活性的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2011.

[8] 刘玲, 赵建龙, 王建刚. 齐墩果酸诱导人肝癌 Bel-7402 细胞 G₂/M 期阻滞及凋亡的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4897-4902.

[9] 杨定菊, 李颖, 尹述凡. 3-O-乙酰基熊果酸-3-乙酰基-2-[(未)取代苯基]-2,3-二氢-1,3,4-噁二唑-5-甲酯的合成及其抗炎活性研究[J]. 有机化学, 2008, 28(6): 1055-1060.

[10] 倪明宇, 马莉, 吴英良, 等. 桦木酸的抗肿瘤作用及其诱导 KB 细胞凋亡的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 38-42.

[11] HE Y F, NAN M L, SUN J M, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of new rotundic acid derivatives[J]. *Molecules*, 2012, 17(2): 1278-1291.

[12] HE Y F, NAN M L, SUN J M, et al. Design, synthesis and cytotoxicity of cell death mechanism of rotundic acid derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(9): 2543-2547.

[13] 陈荣, 廖晓峰. 熊果酸酯的合成研究[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 181-182.

[14] 林锦璇, 王鹏龙, 褚福浩, 等. 新型姜黄素衍生物的合成及其抗癌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 113-117.

[15] 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): 333-335.

[责任编辑 顾雪竹]