

双(3-吗啉丙氧基)姜黄素抗肿瘤活性研究

刘洋¹, 陈纯², 张志强³, 许建华^{3*}

¹福建医科大学药学院药物化学系; ²福建医科大学药学院药理学系;

³福建医科大学药学院新药研究所 福建省高校天然药物药理学重点实验室, 福州 350108

摘要: 合成双(3-吗啉丙氧基)姜黄素(PR1), 研究 PR1 体内外抗肿瘤活性。姜黄素与 *N*-(3-氯丙基)吗啉反应制备 PR1, MTT 法评价 PR1 体外对人肾癌细胞 OS-RC-2、786-O 和人慢性粒细胞白血病耐药细胞 KA 的抑制增殖活性, 考察 PR1 体内抑制人结肠癌 HT29 裸鼠移植性肿瘤活性。PR1 体外对肾癌细胞 OS-RC-2 和 786-O 抑制活性比姜黄素强, 而对白血病耐药细胞 KA 抑制活性比姜黄素差。PR1 体内对 BALB/C-nu 小鼠 HT29 皮下移植瘤的抑制作用明显, 100 mg/kg·d 灌胃的抑制率为 55.7%, 差别具有显著性 ($P < 0.01$), 对裸鼠的体重无明显影响。PR1 在体内外均有较强抗肿瘤活性。

关键词: 姜黄素; 姜黄素衍生物; 双(3-吗啉丙氧基)姜黄素; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.027

Antitumor Activity of Bis(3-morpholinopropoxy) Curcumin

LIU Yang, CHEN Cun², ZHANG Zhi-qiang³, XU Jian-hua^{3*}

¹Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Fujian Medical University; ²Department of

Pharmacology, School of Pharmacy, Fujian Medical University; ³Institute of Materia Medica, School of Pharmacy, Fujian Medical University, Fujian Provincial Key Laboratory of Natural Medicine Pharmacology, Fuzhou, 350108, China

Abstract: The objectives of this study were to synthesize bis(3-morpholinopropoxy) curcumin (PR1) and to evaluate its antitumor activity. PR1 was synthesized from curcumin and *N*-(3-chloropropyl) morpholine. The *in vitro* antitumor activities of PR1 was evaluated through MTT assays against gastric carcinoma cells (OS-RC-2 and 786-O) and chronic myelogenous leukemia resistance cell (KA). The *in vivo* antitumor activities of PR1 were evaluated by its growth inhibition of human colon cancer HT29 tumor xenograft in BALB/C-nu nude mice. Compared with curcumin, PR1 showed improved activities against OS-RC-2, 786-O cells, while less activities against KA cell. PR1 showed remarkable *in vivo* tumor growth inhibition activity. A dose of 100 mg/kg·d was able to inhibit the growth of HT29 xenograft in BALB/C-nu nude mice by 55.7%. No obvious decrease on the body weight of tested nude mice was observed. In conclusion, PR1 showed obvious antitumor activities both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: curcumin; curcumin derivatives; bis(3-morpholinopropoxy) curcumin; antitumor activity

姜黄素(Curcumin, Cur)为天然植物姜黄中的有效成分,有一定预防和治疗癌症活性,但存在水溶性差,生物利用度低等缺点^[1],以姜黄素为先导物进行结构优化具有重要的意义。目前报道的姜黄素衍生物和类似物(Curs)已有很多,不少 Curs 体外活性很强,但以提高药代和水溶性为目的进行改造,并有体内实验数据报道的极少^[2-4]。在抗肿瘤药物吉非替尼的研发过程中,在原型药 4-苯胺基喹唑啉 6 位

酚羟基引入一个碱性的 3-氯丙基吗啉支链得到吉非替尼,药代动力学特性得到明显改善,半衰期由 3 h 提高到可一天一次口服剂量^[5]。作者参考上述改造思路,在姜黄素酚羟基处引入碱性烷基支链,设计合成了双(3-吗啉丙氧基)姜黄素(PR1, 结构式见图 1), 希望提高姜黄素的活性和生物利用度。

1 仪器与材料

核磁共振波谱仪(Bruker Avance III, 400 MHz), 高效液相-质谱仪(Agilent 1100 LC/MSD Trap 离子阱液质联用仪), 显微熔点仪(X-4, 上海精密仪器厂), 温度未经校正。姜黄素(上海试剂三厂, 分析

纯,批号 951105),3-氯丙基吗啉盐酸盐(阿拉丁公司),除特殊说明外,所用试剂及溶剂均为国药集团化学试剂有限公司产分析纯或化学纯。

裸鼠 BALB/C-nu,SPF 级,♂,18~20 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2007-0005,于本校实验动物中心动物 SPF 环境常规饲养操作。人结肠癌细胞 HT29 细胞、人肾癌细胞 OS-RC-2、786-O 和人慢性粒细胞白血病急变细胞 K562 耐药细胞 KA 均购自中科院上海细胞生物研究所,由福建医科大学新药研究所常规传代培养。PR1 用熔融法与 F68 制成固体分散体(PR1:F68=1

:6)。临用前以双蒸水配制成 5 mg/mL 溶液。PRMI-1640,新生牛血清,GIBCO 产品;上海旭东海普药业有限公司,批号 H31020593,用生理盐水配制成 25 mg/kg 浓度药液。环磷酰胺(CTX),江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:08010721。

2 实验方法

2.1 PR1 的合成

PR1 由姜黄素酚羟基与 3-氯丙基吗啉烷基化成醚得到(合成路线见图 1)。

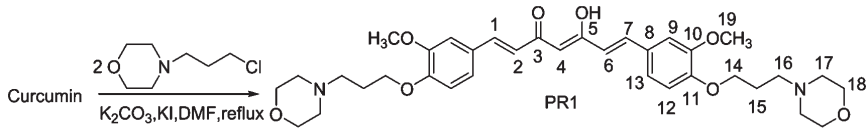


图 1 目标化合物 PR1 的合成

Fig. 1 Synthetic route of PR1

姜黄素 1.84 g,无水碳酸钾 3.45 g,DMF 20 mL,碘化钾 0.2 g,混匀,搅拌下加热至 85 °C,加入 3-氯丙基吗啉盐酸盐 2.4 g,同温下反应 1 h 后,冷却后倒入冰水 150 mL 中,静置过夜后,有褐色粉末析出。抽滤,无水乙醇重结晶,干燥。得淡黄色片状固体 1.55 g,收率 50%。

2.2 MTT 法测 PR1 体外抗肿瘤活性

以 MTT 法测定 PR1 对人肾癌细胞 OS-RC-2、786-O、人慢性粒细胞白血病急变细胞 K562 耐药细胞 KA 的半数抑制浓度(IC₅₀, μmol/L),以姜黄素为对照药。将细胞培养于含 10% (体积分数)小牛血清的 RPMI 1640 培养中,在 37 °C,置于体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。将一定数量处于对数生长期的细胞,按一定密度接种在 96 孔板中,实验组分别加入 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50 μm 共七个浓度药物的培养液,对照组加入等体积的培养液,每组设三个平行孔,37 °C 培养 48 h,加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL/孔,继续培养 4 h 后,离心弃上清,加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,充分裂解后,用全自动酶标仪检测 570 nm 处的吸光度(OD₅₇₀)值。根据吸光度计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = $[\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{实验}}] / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

以同一药物的不同浓度对肿瘤细胞生长抑制率作图,得到剂量反应曲线,根据线性回归方程求出该

药物对细胞生长抑制率为 50% 的浓度即半数抑制浓度 IC₅₀。

2.3 PR1 对人结肠癌 HT29 裸鼠移植瘤的作用

收集处于对数生长期的 HT29 细胞,调整细胞数为 1×10^7 左右,以每只 0.2 mL 接种于裸小鼠腋窝皮下。待瘤生长至合适大小,无菌获取肿瘤组织,选择生长状况良好的瘤组织用组织匀浆器制成细胞悬液,按 1:4 的比例加入无菌生理盐水,混匀后接种于实验组裸小鼠腋窝皮下,每只 0.2 mL。待肿瘤生长 2~3 周至 100~200 mm³ 后将动物随机分组,每组 7 只,PR1 50 mg/kg 灌胃,一日两次;空白对照组给予等体积生理盐水,一日两次;阳性对照组给予 CTX 30 mg/kg,腹腔注射,隔日 1 次;连续给药 3 周左右,称体重,处死裸鼠,剥离瘤块称重,并计算肿瘤生长抑制率。

抑瘤率% = $(1 - \text{实验组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$

3 实验结果

3.1 PR1 的结构鉴定

淡黄色片状固体;mp. 85~88 °C;¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ:7.60 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-1, H-7), 7.12 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-13), 7.08 (2H, s, H-9), 6.90 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 6.49 (2H, d, J = 15.6 Hz, H-2, H-6), 5.82 (1H, s, H-4), 4.13 (t,

4H, $J = 6.4$ Hz, H-14), 3.90 (6H, s, H-19), 3.72 (8H, t, $J = 4.8$ Hz, H-18), 2.54 (4H, t, $J = 7.2$ Hz, H-16), 2.48 (8H, t, $J = 4.4$ Hz, H-17), 2.05 (4H, m, H-15); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 183.3 (s, C-3, C-5), 150.5 (s, C-11), 149.5 (s, C-10), 140.4 (s, C-1, C-7), 128.1 (s, C-8), 122.6 (s, C-2, C-6), 122.0 (s, C-13), 112.6 (s, C-12), 110.3 (s, C-9), 101.3 (s, C-4), 67.2 (s, C-14), 66.9 (s, C-18), 56.

0 (s, C-16), 55.4 (s, C-19), 53.7 (s, C-17), 26.2 (s, C-15); EI-MS m/z 623.4 $[\text{M} + 1]^+$, 312.2 $[\text{M} + 2]^{2+}$ 。

3.2 PR1 体外抗肿瘤活性

以姜黄素为对照, PR1 对人肾癌细胞 OS-RC-2、786-O、人慢性粒细胞白血病急变细胞 K562 耐药细胞 KA 的 IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$) 见表 1。

表 1 PR1 和姜黄素对肿瘤细胞的 IC_{50} 值

Table 1 IC_{50} values of PR1 and curcumin on three tumor cell lines

化合物 Compound	半数抑制浓度 Half-inhibitory concentration (IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$)		
	786-O	RC-OS-2	KA
姜黄素 Curcumin	17.64	32.62	16.51
双(3-吗啉丙氧基)姜黄素 PR1	11.45	21.35	19.25

3.3 PR1 体内抗肿瘤活性

PR1 对 BALB/C-nu 小鼠 HT29 皮下移植瘤的抑制作用明显, 100 mg/kg · d 灌胃的抑制率为

55.7%, 差别具有显著性 ($P < 0.01$), 对小鼠的体重无明显影响 (结果见表 2、图 2)。

表 2 PR1 对裸鼠移植瘤 HT29 的抑制作用

Table 2 PR1 inhibit the growth of HT29 xenograft in nude mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	只数 n	体重 Body weight (g)		瘤重 tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibitory rate (%)
			开始 Begin	结束 End		
空白对照 control	-	7	20.1 ± 1.5	24.7 ± 1.0	0.74 ± 0.21	
PR1	50, bid	7	20.4 ± 1.3	25.5 ± 1.2	0.33 ± 0.19	55.7**
环磷酰胺 CTX	30, qod	7	19.7 ± 1.5	24.5 ± 1.6	0.08 ± 0.07	89.4**

注: 与空白对照组比较, * : $P < 0.01$, bid (一天两次), qod (两天一次)。

Note: compared with control, * : $P < 0.01$, bid (twice per day), qod (once per two days)。

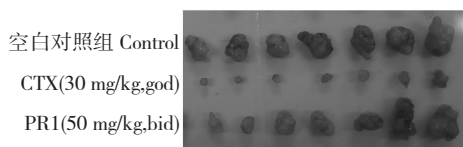


图 2 PR1 对裸鼠移植瘤 HT29 的抑制作用

Fig. 2 PR1 inhibit the growth of HT29 xenograft in nude mice

4 讨论

4.1 目标化合物结构解析

图 3 氢谱中 $\delta 7.60$ 为 C1、C7, $\delta 6.49$ 为 C2、C6 上烯氢的信号, 偶合常数 16 Hz, 说明为反式烯烃; $\delta 7.12$ 为 C1、C7 上苯环 2 位上氢的信号, $\delta 7.08$ 为 C1、C7 上苯环 6 位上氢的信号, $\delta 6.90$ 为 C1、C7 上苯环 5 位上氢的信号, 双峰并且偶合常数为 8 Hz, 说明为苯环 5、6 位氢邻位偶合信号; $\delta 5.82$ 为 C4 位活泼亚甲基上氢的信号, 1H 单峰说明为为烯醇式结

构。 $\delta 4.12$ 为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ 上氢的信号。 $\delta 2.54$ 为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ 上氢的信号。 $\delta 2.05$ 为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ 上氢的信号。 $\delta 3.90$ 为二个苯环上甲氧基的信号。 $\delta 3.73$ 为吗啉环上 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 上氢的信号。 $\delta 2.48$ 为吗啉环上 $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 上氢的信号。 碳谱中 $\delta 183.3$ 为羰基碳, 位移值 δ 在 101.3 ~ 150.5 之间为 SP^2 杂化碳, 双键、芳香环, 位移值 δ 在 26.2 ~ 67.2 之间为 SP^3 杂化碳, 共有 16 个不等价的碳, 与 PR1 结构相符。 质谱正模式下分子离子峰 623.4 为基峰, 312.2 为 $[\text{M} + 2]^{2+}$ 双电荷峰。 核磁、质谱均与目标化合物 PR1 结构相符。 PR1 经 Reaxys 和 Scifinder 数据库检索为新化合物。

4.2 PR1 合成

PR1 合成工艺开始参考文献^[6]吉非替尼的合成方法, 将姜黄素、3-氯丙基吗啉、碳酸钾、DMF 加热 85 °C 反应 10 h, 结果有三个副产物与目标产物一

起,纯化困难。作者用碘化钾催化该烷基化反应,结果 85 °C 反应 1 h 后通过简单的重结晶操作即得到相当纯的目标产物。

4.3 PR1 抗肿瘤活性

PR1 体外对人肾癌细胞 OS-RC-2、786-O 抑制增殖活性均比姜黄素强,而对 K562 耐药细胞 KA 的抑制增殖活性比姜黄素稍弱。由于姜黄素的酚羟基是活性药效基团,在酚羟基处引入含氮碱性支链封闭了这一药效团,但同时也增强了水溶性,所以 PR1 体外活性的提高不够明显。PR1 体内抑瘤率较高,这可能与姜黄素酚羟基被修饰后阻断了体内葡萄糖醛酸代谢提高了生物利用度有关^[1]。PR1 的药代动力学性质还尚待考察。从研究姜黄素代谢途径和产物入手,改造容易代谢的基团,提高类药性,可为姜黄素的结构改造提供新的思路。

致谢:感谢沈阳药科大学董金华研究员对合成的指导,感谢福建省教育厅 2012 出国留学奖学金资助。

参考文献

- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 2007, 4: 807-818.
 - Anand P, Thomas SG, et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76: 1590-1611.
 - Mosley CA, Liotta DC, Snyder JP. Highly active anticancer curcumin analogues. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 77-103.
 - Esatbeyoglu T, Huebbe P, Erns IMI, et al. Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 52: 5308-5332.
 - Li JJ, Johnson DS, Sliskovic DR, et al. Contemporary Drug Synthesis (当代新药合成). Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2005. 34-36.
 - Diao YY (刁圆圆), Zhang QW (张庆文). Synthesis of Gefitinib. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2008, 39: 401-403.
-
- (上接第 612 页)
- Chen H (陈欢), Yao Y (姚遥), et al. Chemical constituents from *Cynanchum amplexicaule* Sieb. et Zucc. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2008, 18: 51-53.
 - Li Y (李燕), Wang CL (王春兰), et al. Phenolic components and flavanones from *Dendrobium candidum*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 45: 975-979.
 - Gao HY (高慧媛), Sui AL (隋安丽), et al. Chemical constituents of *Dioscorea bulbifera* L. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20: 178-180.
 - Zhang X (张雪), Gao H (高昊), Wang NL (王乃利), et al. Phenolic components from *Dendrobium nobile*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37: 652-655.
 - Jiang YY (姜艳艳), Duan YY (段以以), Liu Y (刘洋), et al. Isolation and structure identification of chemical constituent of Yuanzhi (*Radix Polygalae*). *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2011, 34: 122-125.
 - Liu M (刘明), Xu W (徐伟), Liang N (梁娜), et al. Study on chemical constituents of roots of *Polygala tenuifolia*. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2010, 12: 18-21.
 - Lin YP (林玉萍), Zong YL (宗亚丽), et al. Chemical constituents of the aerial parts of *Seseli yunnanense* Franch. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 798-800.
 - Wei HL (魏荷琳), Zhou SX (周思祥), Jiang Y (姜勇), et al. Chemical constituents from leaves of *Evodia lepta*. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2013, 38: 1193-1197.
 - Zhou CC (周晨晨), Liu CT (刘春婷), Huang XX (黄肖霄), et al. Isolation and identification of aromatic compounds from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. *Chin J Med Chem*. (中国药物化学杂志), 2013, 23: 213-217.
 - Zhou HY (周惠燕), Zhang H (章辉), et al. Chemical constituents from leaves of *Phyllostachys pubescens* I. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 1933-1934.
 - Li H (李华), Yang MH (杨美华), Si JY (斯建勇), et al. Chemical constituents from roots of *Flemingia philippinensis*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40: 512-516.
 - Deng Y (邓余), He JB (何江波), et al. Studies on the chemical constituents of *Cynanchum auriculatum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 729-732.
 - Wang JF (王俊锋), Yang Y (杨扬), et al. Chemical constituents from seeds of *Hydnocarpus anthelminthica*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 2394-2397.
 - Li YR (李艳茸), Li C (李春), et al. Chemical constituents from whole plants of *Aconitum tanguticum* (Ⅲ). *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 1163-1167.
 - Wang Y (王壹), Jiang HJ (蒋金和), et al. Studies on the chemical constituents of *Euphorbia hirta*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2012, 40: 4060-4062.