

# 羟基丹参酮 IIA 的合成及体外抗肿瘤作用

张丽娟, 徐文清\*, 江城峰, 杨福军, 沈 秀

中国医学科学院放射医学研究所 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192

**摘要:** 对丹参酮 IIA 进行结构修饰, 合成了羟基丹参酮 IIA。采用 MTT 法考察了羟基丹参酮 IIA 对人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞, 人肝癌细胞株 HepG-2 细胞、人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用。结果表明: 羟基丹参酮 IIA 对三种肿瘤细胞增殖都有很好的抑制作用, 抑制作用呈剂量依赖性。羟基丹参酮 IIA 对 SGC-7901 细胞抑制作用最强, 其  $IC_{50}$  为 4.18  $\mu\text{M}$ ; 对 HeLa 细胞的抑制作用次之, 其  $IC_{50}$  为 6.08  $\mu\text{M}$ ; 对 HepG-2 细胞抑制作用较弱, 其  $IC_{50}$  为 10.20  $\mu\text{M}$ 。而丹参酮 IIA 对 SGC-7901 细胞、HeLa 细胞和 HepG-2 细胞的  $IC_{50}$  分别是 17.15  $\mu\text{M}$ 、27.28  $\mu\text{M}$  和 46.34  $\mu\text{M}$ 。羟基丹参酮 IIA 抑制肿瘤细胞增殖作用明显强于丹参酮 IIA ( $P < 0.05$ )。

**关键词:** 丹参酮 IIA; 羟基丹参酮 IIA; HeLa 细胞; HepG-2 细胞; SGC-7901 细胞

中图分类号: R962

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.005

## Synthesis and *in vitro* Anti-Tumor Effects of Hydroxytanshinone IIA

ZHANG Li-juan, XU Wen-qing\*, JIANG Cheng-feng, YANG Fu-jun, SHEN Xiu

Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

**Abstract:** Hydroxytanshinone IIA was synthesized with tanshinone IIA as lead compound. MTT assay was adopted to evaluate its inhibition effect against HeLa, HepG-2 and SGC-7901 cells. Results indicated that hydroxytanshinone IIA inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. The half inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of hydroxytanshinone IIA against SGC-7901, HeLa and HepG-2 cells were 4.18  $\mu\text{M}$ , 6.08  $\mu\text{M}$  and 10.20  $\mu\text{M}$ , respectively. But the  $IC_{50}$  of tanshinone IIA against SGC-7901, HeLa and HepG-2 cells were 17.15  $\mu\text{M}$ , 27.28  $\mu\text{M}$  and 46.34  $\mu\text{M}$ , respectively. The inhibition effect of hydroxytanshinone IIA to SGC-7901 cells was powerful. Compared with tanshinone IIA, hydroxytanshinone IIA significantly increased inhibition effect ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** tanshinone IIA; hydroxytanshinone IIA; HeLa cells; HepG-2 cells; SGC-7901 cells

丹参酮是丹参中脂溶性菲醌类成分, 主要由丹参酮 I、丹参酮 IIA、丹参酮 II B、隐丹参酮等组成<sup>[1]</sup>。不同的丹参酮单体在丹参中的含量差别很大, 丹参酮 IIA (TanIIA) 是丹参酮脂溶性的主要成分, 在丹参中的含量达到 0.1% ~ 0.5%。而羟基丹参酮 IIA (OH-TanIIA) 在丹参中含量很少, 主要存在于丹参酮 IIA 体内代谢产物中<sup>[2]</sup>。由于其在植物中含量较低, 造成提取、分离上的困难, 大大限制了对它的进一步研究。目前, 关于羟基丹参酮 IIA 生物活性的报道很少。本课题组前期开展了丹参酮 IIA 衍生物的合成及抗肿瘤作用的研究<sup>[3,4]</sup>, 本研究通过化学合成的方法制备了羟基丹参酮 IIA (图 1), 体

外实验表明羟基丹参酮 IIA 对多种肿瘤细胞具有较好的抑制作用。

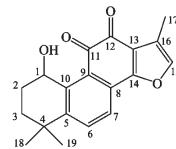


图 1 羟基丹参酮 IIA 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of hydroxytanshinone IIA

## 1 材料与仪器

### 1.1 试剂

丹参酮 IIA (西安鸿生生物技术有限公司, 批号: 100926, 纯度  $\geq 95.3\%$ ), *N*-溴代琥珀酰亚胺 (NBS, 阿法埃莎化学有限公司, 纯度  $\geq 98.0\%$ ), 过氧化苯甲酰 (阿法埃莎化学有限公司, 纯度  $\geq$

收稿日期: 2015-07-06 接受日期: 2015-09-21

基金项目: 国家自然科学基金 (81273005); 天津市应用基础与前沿技术研究重点项目 (14JCZDJC36400); 中国医学科学院放射医学研究所发展基金 (SF1528)

\* 通讯作者 Tel: 86-22-85683049; E-mail: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

97.0%)。DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;四甲基藕氮唑盐 (MTT) 购自上海生物工程公司;牛血清购自中国医学科学院血液病研究所。

## 1.2 细胞

人宫颈癌 HeLa 细胞,人肝癌 HepG-2 细胞株、人胃癌 SGC-7901 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。HeLa 细胞接种于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 U/mL), HepG-2 细胞和 SGC-7901 细胞接种于 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 U/mL);置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵箱中培养, 孵育 2~3 d 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 选对数生长期细胞进行实验。

## 1.3 仪器

VG ZAB-HS 高分辨有机磁质谱仪; Varian Mercury V × 300 型核磁共振仪(溶剂为 CDCl<sub>3</sub>, 内标为 TMS); 二氧化碳(CO<sub>2</sub>) 培养箱(美国 Thermo Electron Corporation); 超净工作台(苏州精华设备公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); BIO-RAD MODE 168 型酶标仪。

## 2 实验方法

### 2.1 化合物的合成

称取 147 mg 丹参酮 IIA 溶于 15 mL 新蒸四氯化碳中。加热至回流后加入 25 mg 过氧化苯甲酰, 待过氧化苯甲酰全部溶解后在 0.5 h 内分次加入 107 mg 的 NBS, 反应 3 h 后用 30 mL 水洗 3 次, 取四氯化碳层, 减压蒸馏得固体混合物。将固体混合物重新溶于 15 mL 二氯甲烷中, 放置在空气中挥发干溶剂, 放置 24 h, 通过硅胶柱分离, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯(V1/V2 = 5/1), 得深红色粉末状固体。产率: 62.3%。通过核磁和质谱鉴定结构。

### 2.2 MTT 法检测化合物对细胞增殖能力的影响

取对数生长期细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 计数并稀释成 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞密

度, 按 200 μL/孔接种于 96 孔培养板中。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 12 h, 细胞贴壁生长后在培养基中加入化合物; 化合物设置 7 个浓度, 每个浓度设 6 个复孔。培养 48 h 后, 加入 MTT 试液(5 mg/mL) 15 μL, 继续培养 4 h, 吸出培养液, 加入二甲基亚砜 150 μL/孔, 振荡 5 min, 酶标仪 492 nm 处测定吸收值。按以下公式计算抑制率: 细胞抑制率(%) = (1-试验组 A 值平均值/对照组 A 值平均值) × 100%。

### 2.3 数据统计分析

采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。MTT 法中每份标本平行测定 6 孔, 每个受试化合物对各受试细胞株平行试验三次; 组间比较采用 One-way ANOVA 检验。

## 3 实验结果

### 3.1 化合物的结构鉴定

深红色结晶(甲醇); mp. 184~185 °C; HR-ESI-MS (*m/z*): 311. 1233 (calculated for C<sub>19</sub> H<sub>18</sub> O<sub>4</sub>: 311. 1239) [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7. 69~7. 66 (2H, d, *J* = 7. 8 Hz, 6-H, 7-H), 7. 23 (1H, s, 15-H), 6. 86 (1H, s, 1-OH), 2. 26 (3H, s, 17-CH<sub>3</sub>), 2. 24~2. 17 (2H, m, 2-CH<sub>2</sub>), 1. 70~1. 65 (2H, m, 3-CH<sub>2</sub>), 1. 45 (3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 1. 25 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 182. 3 (C-11), 177. 1 (C-12), 163. 0 (C-14), 152. 0 (C-5), 142. 8 (C-15), 141. 5 (C-10), 128. 5 (C-6), 126. 2 (C-7), 125. 5 (C-8), 124. 8 (C-9), 124. 3 (C-13), 121. 6 (C-16), 67. 6 (C-1), 40. 8 (C-4), 32. 7 (C-3), 31. 8 (C-18), 30. 5 (C-19), 29. 4 (C-2), 8. 8 (C-17)。

### 3.2 生物活性

#### 3.2.1 羟基丹参酮 IIA 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用

实验结果表明, 羟基丹参酮 IIA 和丹参酮 IIA 对 HeLa 细胞都有一定的抑制作用, 且具有剂量依赖性。羟基丹参酮 IIA 抑制肿瘤增殖的效果好于丹参酮 IIA, 实验结果见表 1。

表 1 羟基丹参酮 IIA 对 HeLa 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 1 Inhibition effect of hydroxytanshinone IIA against HeLa cells ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

给药浓度 Concentration (μM)		吸光度 <sub>492</sub> OD <sub>492</sub>		抑制率 Inhibition rate (%)	
Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA
Control	Control	0. 519 ± 0. 029	0. 776 ± 0. 037	0	0

1.91	0.53	0.477 ± 0.021	0.757 ± 0.041	8.1	2.5
3.83	1.05	0.441 ± 0.033 **	0.703 ± 0.033 *	15.1	9.4
7.65	2.10	0.410 ± 0.011 **	0.628 ± 0.025 **	21.0	19.1
11.48	4.21	0.348 ± 0.016 **	0.485 ± 0.010 **	32.9	37.5
15.31	8.42	0.319 ± 0.012 **	0.330 ± 0.019 **	38.5	57.5
22.96	16.63	0.279 ± 0.020 **	0.206 ± 0.010 **	46.2	73.4
30.61	16.84	0.227 ± 0.009 **	0.130 ± 0.008 **	56.2	83.2

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01; vs control.

3.2.2 羟基丹参酮 IIA 对 HepG-2 细胞的增殖抑制作用

有较好抑制作用,抑制效果呈剂量依赖性。羟基丹参酮 IIA 对 HepG-2 细胞抑制作用大于丹参酮 IIA, 实验结果见表 2。

从实验结果看,羟基丹参酮 IIA 对 HepG-2 细胞

表 2 羟基丹参酮 IIA 对 HepG-2 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2 Inhibition effect of hydroxytanshinone IIA against HepG-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

给药浓度 Concentration (μM)		吸光度 <sub>492</sub> OD <sub>492</sub>		抑制率 Inhibition rate (%)	
Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA
Control	Control	0.472 ± 0.026	0.659 ± 0.036	0	0
2.87	0.58	0.412 ± 0.021 **	0.643 ± 0.025	12.8	2.5
5.74	1.17	0.394 ± 0.022 **	0.620 ± 0.029	16.5	5.8
11.48	2.34	0.360 ± 0.015 **	0.567 ± 0.017 **	23.7	13.8
17.22	4.68	0.328 ± 0.018 **	0.489 ± 0.016 **	30.6	25.8
22.96	9.34	0.296 ± 0.010 **	0.381 ± 0.022 **	37.2	42.2
28.70	14.03	0.272 ± 0.023 **	0.260 ± 0.008 **	42.3	60.5
45.92	18.71	0.207 ± 0.011 **	0.154 ± 0.011 **	56.2	76.6

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01; vs control.

3.2.3 羟基丹参酮 IIA 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用

3.2.4 羟基丹参酮 IIA 对不同肿瘤细胞的抑制活性

羟基丹参酮 IIA 对 SGC-7901 细胞有较强的增殖抑制作用,且具有剂量依赖性。实验结果见表 3。

采用 SPSS12.0 拟合各化合物的剂量-抑制率曲线,得到丹参酮 IIA 及羟基丹参酮 IIA 的 IC<sub>50</sub> 数据,

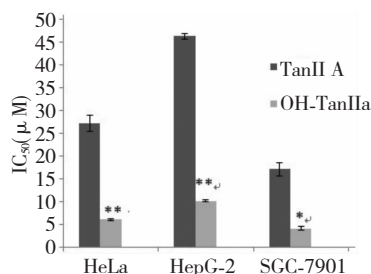
表 3 羟基丹参酮 IIA 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 3 Inhibition effect of hydroxytanshinone IIA against SGC-7901 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

给药浓度 Concentration (μM)		吸光度 <sub>492</sub> OD <sub>492</sub>		抑制率 Inhibition rate (%)	
Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA	Tan IIA	OH-Tan IIA
Control	Control	0.473 ± 0.014	0.716 ± 0.034	0	0
0.72	0.58	0.462 ± 0.018	0.682 ± 0.031	2.4	4.8
1.44	1.17	0.439 ± 0.029	0.658 ± 0.015 *	7.2	8.1
2.87	2.34	0.416 ± 0.016 **	0.604 ± 0.019 **	12.1	15.7
5.74	3.51	0.360 ± 0.012 **	0.472 ± 0.010 **	23.8	34.1
11.48	4.68	0.295 ± 0.010 **	0.258 ± 0.017 **	37.7	63.9
17.22	9.36	0.232 ± 0.009 **	0.019 ± 0.003 **	51.0	97.4

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01; vs control.

重复3次试验取均值,实验结果见图2。结果表明:羟基丹参酮IIA对SGC-7901细胞抑制作用最强,其 $IC_{50}$ 为4.18  $\mu$ M;对HeLa细胞的抑制作用次之,其 $IC_{50}$ 为6.08  $\mu$ M;对HepG-2细胞抑制作用较弱,其 $IC_{50}$ 为10.20  $\mu$ M。而丹参酮IIA对SGC-7901细胞、HeLa细胞和HepG-2细胞的 $IC_{50}$ 分别是17.15  $\mu$ M、27.28  $\mu$ M和46.34  $\mu$ M。羟基丹参酮IIA抑制肿瘤细胞增殖作用明显好于丹参酮IIA,经统计学处理有显著性差异( $P < 0.05$ )。



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; vs tanshinone IIA

图2 羟基丹参酮IIA对不同肿瘤细胞的抑制活性

Fig. 2 Inhibition effect of hydroxytanshinone IIA against different tumor cells

## 4 讨论与结论

丹参是临床最常用的活血化瘀中药,其功效在古代即有认识,《神农本草经》曾记载它能“破症除瘕”。现代医学认为丹参具有扩张冠状动脉,防止心肌缺血和心肌梗死等作用,以及治疗肝纤维化、肝硬化、心绞痛、宫颈癌等多种疾病<sup>[5,6]</sup>。丹参的主要活性成分为丹参酮(tanshinone),是一组脂溶性菲醌类成分;按其不同的化学结构分为丹参酮I、丹参酮IIA、丹参酮II B、隐丹参酮、二氢丹参酮、羟基丹参酮IIA等37种成分,总称为丹参酮。这一系列化合物具有抗炎、抗菌、抗组织纤维化、抗肿瘤、抗氧化、抗突变及抗血小板聚集等活性<sup>[7,8]</sup>。

丹参酮IIA是目前研究较多的化合物,研究表明,其对乳腺癌、骨肉瘤、胃癌、肺癌、肝癌等细胞增殖均有抑制作用<sup>[9-11]</sup>。但是,由于丹参酮IIA易溶于脂溶性溶剂、微溶于水使其生物利用度受到了一定影响。羟基丹参酮IIA是丹参酮IIA体内的I相代谢产物,羟基丹参酮IIA可能是其体内发挥生物活性的主要形式。因此本文采用了半合成的方法,以丹参酮IIA为先导物,合成了羟基丹参酮IIA,通过对SGC-7901细胞、HeLa细胞、HepG-2细胞增殖

抑制实验,发现羟基丹参酮IIA对三种肿瘤细胞都有很好的抑制作用,且抑制肿瘤效果大于丹参酮IIA( $P < 0.05$ )。

在制备羟基丹参酮IIA的过程中,丹参酮IIA溴化后生成的1-溴丹参酮IIA不稳定,它容易自动转化为几乎等量的1,2-去氢丹参酮IIA和羟基丹参酮IIA,该反应的机理是:1-溴丹参酮IIA的溴原子属于烯丙式溴,从能量的角度看,该溴原子容易自动脱除,形成碳正离子,该碳正离子中间体容易发生E1反应,生成更稳定的1,2-去氢丹参酮IIA,同时由于 $CH_2Cl_2$ 的挥发,使空气中的水凝结下来,进攻该碳正离子,即发生了 $S_N1$ 反应,形成羟基丹参酮IIA<sup>[12]</sup>。

羟基丹参酮IIA在丹参植物中含量较低,采用合成的方法制备羟基丹参酮IIA,可以解决从植物中获取困难的问题。实验发现羟基丹参酮IIA对多种肿瘤细胞有较好的抑制增殖作用,如果能够进一步通过动物体内实验验证其抗肿瘤效果,该化合物有可能开发成很有前途抗肿瘤药物。

## 参考文献

- Dong FC(董凤彩). Composition and pharmacological action of *Salvia miltiorrhizas* Bge. *China J Pharm Economics* (中国药物经济), 2015, 3: 99-100.
- Bi HC(毕惠嫦). The pharmacokinetic study of tanshinone IIA in rats and the involved mechanisms. Guangzhou: Sun Yat-sen University (中山大学), PhD. 2007.
- Jiang CF(江城锋), Li RF(李瑞峰), Xue D(薛丹), et al. Preparation of tanshinone IIA derivatives and their proliferation inhibitory activity against HeLa cells. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 385-388.
- Li GQ(李光强), Zhao J(赵洁), Shen X(沈秀), et al. Synthesis of tanshinone IIA derivatives and their radiosensitivity against Hela cells. *Herald Med* (医药导报), 2014, 33: 283-286.
- Wang X, Morris-Natschke SL, Lee KH, et al. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Med Res Rev*, 2007, 27: 133-148.
- Chen X, Guo J, Bao J, et al. The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review. *Med Res Rev*, 2014, 34: 768-794.
- Chen W, Lu Y, Chen G, et al. Molecular evidence of cryptotanshinone for treatment and prevention of human cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13: 979-987.

(下转第2089页)