

## 由色胺酮合成卤代 Phaitanthrin A 及其对 DNA 的切割作用

顾运琼<sup>1,2</sup>, 申文英<sup>1</sup>, 郭雪梅<sup>1</sup>, 黄国保<sup>1</sup>, 罗志辉<sup>1</sup>, 谭明雄<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>玉林师范学院广西农产资源化学与深度利用重点实验室(培育基地), 玉林 537000;<sup>2</sup>广西师范大学药用资源化学与药物分子工程省部共建国家重点实验室, 桂林 541004

**摘要:** 色胺酮(Tryptanthrin)和 Phaitanthrin A 是药用植物马蓝(*Strobilanthes cusia*)、蓼蓝(*Polygonum tinctorium* L.)、菘蓝(*Isatis tinctoria* L.)的生物碱有效成分。本文以卤代色胺酮:8-溴色胺酮(**1**)和 8-碘色胺酮(**2**)为底物,在溶剂热条件下,一步合成 8-Br-Phaitanthrin A(**3**)和 8-I-Phaitanthrin A(**4**),通过<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 及 X-射线单晶衍射方法确定化合物**3,4**的结构和手性构型。光谱法和凝胶电泳法研究表明,两个卤代 Phaitanthrin A 均对 DNA 具有较强的切割作用。

**关键词:** 色胺酮; Phaitanthrin A; DNA 切割

中图分类号: R73-74

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.3.012

## Synthesis and DNA-Cleavage Activities of Halogenated-Phaitanthrin A Based on Tryptanthrin

GU Yun-qiong<sup>1,2</sup>, SHEN Wen-ying<sup>1</sup>, GUO Xue-mei<sup>1</sup>, HUANG Guo-bao<sup>1</sup>, LUO Zhi-hui<sup>1</sup>, TAN Ming-xiong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Guangxi Key Laboratory for Agricultural Resources Chemistry and Efficient Utilization(Cultivation Base),

Yulin Normal University, Yulin 537000, China, <sup>2</sup>The State Key Laboratory for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

**Abstract:** Tryptanthrin and phaitanthrin A are active alkaloids derived from *Strobilanthes cusia*, *Polygonum tinctorium* L., and *Isatis tinctoria* L. In this study, halogenated tryptanthrin of 8-bromo-tryptanthrin (**1**) and 8-iodine tryptanthrin (**2**) were used as substrate to synthesize 8-Br-Phaitanthrin A(**3**) and 8-I-Phaitanthrin A(**4**) under solvothermal conditions. The structures and chiral configuration of the synthesized compounds were determined by <sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR and X-ray diffraction. Spectroscopy and gel electrophoresis had shown that compounds **3** and **4** had a strong cleavage action towards DNA.

**Key words:** tryptanthrin; phaitanthrin A; DNA cleavage

色胺酮(Tryptanthrin, 图1)和 Phaitanthrin A 是药用植物马蓝(*Strobilanthes cusia*)、蓼蓝(*Polygonum tinctorium* Lour.)、菘蓝(*Isatis tinctoria* L.)的生物碱有效成分<sup>[1,2]</sup>。近年来,关于色胺酮的结构改造主要集中在其母核的 2、3、8、9 位引入侧链取代基, Scovill 等<sup>[3]</sup>在色胺酮母环的 8 位引入硝基、三氟甲氧基等取代基, Sharm 等<sup>[4]</sup>合成的色胺酮类似物对肿瘤细胞株 MCF-7、NCI-H460、SF-268 显示出中等强度的抑制活性;我们课题组合成的溴代和碘代色胺酮对 BEL-7404、NCI-H460、T-24 和 HepG2 肿瘤细

胞株表现出较强的抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>,考虑到卤代色胺酮及其衍生物 Phaitanthrin A 的生物活性<sup>[6,7]</sup>,结构上色胺酮吡啶环的 6 位-羰基易于与丙酮发生加成反应,通过卤代色胺酮与丙酮加成设计合成溴代和碘代 Phaitanthrin A 衍生物。

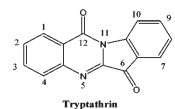


图1 色胺酮的结构图

Fig. 1 Structures of tryptanthrin

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

Smart ApexII X-射线单晶衍射仪(X-ray, 德国

收稿日期: 2016-09-05 接受日期: 2017-01-16

基金项目: 国家自然科学基金(21261025); 广西师范大学药用资源化学与药物分子工程省部共建国家重点实验室开发课题(CMEMR2011-09, CMEMR2014-B08); 广西高校科学技术重点项目(ZD2014108); 广西高校农产品深加工与安全技术高水平创新团队及卓越学者计划

\* 通讯作者 E-mail: mxtan5a@yahoo.com

Bruker 公司); PerkinElmer 傅立叶红外光谱仪 (KBr 压片, 美国珀金埃尔默仪器有限公司); Cary 5000 紫外光谱仪 (安捷伦科技有限公司); FluoroMax-4 荧光光谱仪 (法国 HORIBA Jobin Yvon 公司); Quantum-ST5 凝胶成像分析系统 (法国 Vilber 公司)。H21T-DNA (5'-GGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3', 南宁市拓普帮生物科技有限公司; 所用试剂均为分析纯试剂, 色胺酮实验室自制。

## 1.2 色胺酮衍生物的合成

### 1.2.1 卤代色胺酮的合成

称量色胺酮原料 (0.100 g, 0.4 mmol), NBS (0.540 g, 0.3 mmol), 将色胺酮放入 150 mL 的圆底烧瓶中, 加入 30 mL 三氟乙酸, 摇匀, 使色胺酮溶解其中, 再缓慢加入 12 mL 的浓硫酸, 45 °C 水浴加热 (图 2)。将 0.540 g 的 NBS 分 8 次加入到反应体系中, 每小时加一次, 加完 NBS 后继续反应 40 h。待反应结束后用旋转蒸发仪去除反应体系中的三氟乙酸, 将烧瓶残留物倒入冰水中有黄色的悬浮物, 加入固体 NaOH 中和溶液中的浓硫酸, 使溶液 pH 呈中性, 最后用砂芯漏斗进行抽滤, 再用温水洗涤 4 次, 滤干后将黄色固体放入到 45 °C 的烘箱中烘干, 得 8-溴色胺酮 (**1**)。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3964.0, 1722.0, 1674.0, 1592.0, 1458.0, 1352.0, 1310.0, 1184.0, 1102.0, 752.0  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.51 ~ 8.60 (m, 1H), 8.42-8.19 (m, 1H), 8.12 ~ 8.04 (m, 1H), 7.96 ~ 7.89 (m, 2H), 7.69 ~ 7.73 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.3, 157.9, 146.6, 144.9, 143.8, 140.7, 138.5, 135.3, 132.3, 130.9, 130.6, 128.3, 127.6, 125.0, 123.6, 120.7; ESI-MS  $m/z$ : 328.8  $[\text{M} + \text{H}]^{+ [5]}$ 。

用 NIS 代替 NBS, 得 8-碘色胺酮 (**2**)。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3939.0, 1727.04, 1677.8, 1593.6, 1458.0, 1313.9, 1177.9, 844.7, 769.0  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.41 ~ 8.46 (m, 2H), 8.23 (s, 1H), 8.03 ~ 8.11 (m, 2H), 7.90 ~ 7.95 (m, 2H), 7.90 ~ 7.95 (m, 1H), 7.72 ~ 7.88 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  181.1, 157.93, 146.5, 146.5, 145.5, 143.5, 135.3, 134.6, 130.9, 130.5, 127.6, 123.6,

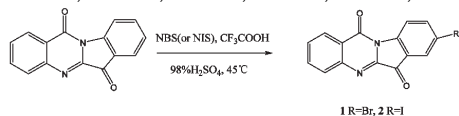


图 2 8-卤代色胺酮的合成

Fig. 2 Synthesis of 8-halogenated tryptanthrin

119.7, 91.0; ESI-MS  $m/z$ : 374.7  $[\text{M} + \text{H}]^{+ [5]}$ 。

### 1.2.2 水热法合成卤代 Phaitanthrin A

合成路线如图 3 所示。准确称量 8-溴色胺酮 (0.05 mmol, 0.0176 g), 加入长 20 cm, 直径 1.5 cm, 厚 0.1 cm 一端密封的玻璃管中, 滴加 3 mL N,N-二甲基甲酰胺和 0.8 mL 的甲醇, 玻璃管用冰水冷冻, 再将开口端熔融密封, 混合均匀后置于 110 °C 的烘箱中, 3 d 后取出玻璃管, 管内有金属光泽的棕黄色块状晶体生成 (**3**), 把晶体从管中取出, 过滤, 少量水洗涤, 石油醚洗涤, 真空干燥, 产率 85.4%。用 8-碘色胺酮代替 8-溴色胺酮, 得到金属光泽的深棕黄色块状晶体 (**4**), 产率 80.1%。

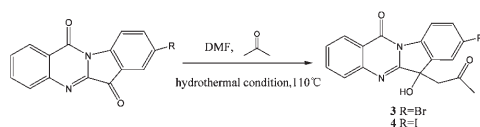


图 3 卤代 Phaitanthrin A 的合成

Fig. 3 Synthesis of halogenated Phaitanthrin A

## 2 结果与讨论

### 2.1 卤代 Phaitanthrin A 的合成

通过红外光谱、核磁共振谱、X-射线单晶衍射分析法确定化合物 **3** 为 8-溴-Phaitanthrin A。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3387.0, 1370.1, 1667.6, 1509.8, 1458.2, 1337.4, 1298.6, 1180.4, 840.8, 770.60  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta$  8.33 (dd,  $J = 14.3, 8.1$  Hz, 2H), 7.89 (dd,  $J = 14.3, 6.9$  Hz, 2H), 7.74 (dd,  $J = 23.0, 8.1$  Hz, 2H), 7.63 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 3.77 (dd,  $J = 19.7, 18.3$  Hz, 2H), 2.01 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):  $\delta$  206.0, 160.8, 158.8, 147.0, 138.5, 136.6, 135.0, 132.5, 127.6, 127.6, 127.0, 126.5, 121.2, 118.8, 117.8, 74.4, 51.6, 29.9。晶体结构见图 4。

化合物 **4** 为 8-碘-Phaitanthrin A。IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3441.9, 1733.1, 1677.2, 1590.3, 1457.2, 1342.6, 1177.7, 844.7, 769.3  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.26 (dd,  $J = 9.9, 7.7$  Hz, 2H), 7.97 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 7.88 (t,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 7.76 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.63 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.76 (dd,  $J = 19.0, 18.3$  Hz, 2H), 2.00 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  206.0, 160.6, 158.82, 147.1, 139.0, 138.3, 136.5, 135.0, 132.5, 127.6, 126.5, 121.2, 118.0, 91.3, 74.3, 51.6, 30.0。

晶体结构见图 4。

从 X-射线晶体结构和<sup>1</sup>HNMR 可以看到,6-羰基的碳原子与丙酮加成后变成了手性碳原子,化合物 **3** 为 R 型,化合物 **4** 为 S 型,晶体结构见图 4。

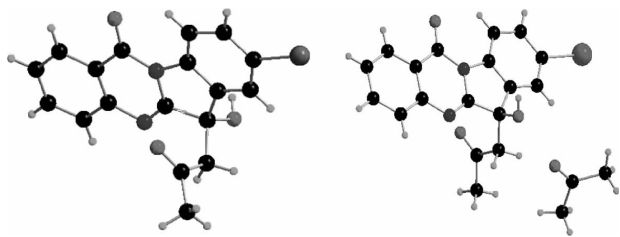
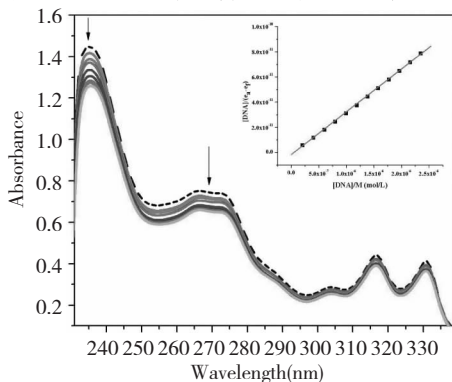


图 4 化合物 3(左)和 4(右)的晶体结构图

Fig. 4 Crystal structures of compounds 3(Left) and 4(Right)

## 2.2 化合物 3,4 对 DNA 的切割作用研究

紫外可见吸收光谱、荧光竞争光谱和凝胶电泳是研究化合物与 DNA 切割作用的重要表征手段。化合物 **3**、**4** 与 G 四链体 DNA HTG21 作用的紫外可见吸收光谱分析如图 5 所示,化合物 **3**(图 5 左)和 **4**



(图 5 右)在 235 nm 处出现一个最大吸收峰,在 270 nm 有弱的吸收峰。当加入浓度为  $2 \times 10^{-3}$  M 的 G 四链体 DNA 后,235 nm 和 270 nm 的吸收峰发生减色效应,且随着往化合物的不断加入减色效应加强并逐渐饱和,化合物 **3** 减色率为 13.0%、12.2%;化合物 **4** 为 16.3% 和 21.4%。表明化合物 **3**、**4** 与 DNA 之间的有较强的相互作用。根据以下方程(1)计算化合物与 DNA 的键合常数  $K_b$  [8]。

$$C_{DNA}/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = C_{DNA}/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_f - \varepsilon_b) \quad (1)$$

式中: $C_{DNA}$  表示 DNA 的浓度; $\varepsilon_f$ 、 $\varepsilon_a$  和  $\varepsilon_b$  分别表示在未加 DNA、在 DNA 各种浓度下、在与 DNA 键合饱和时的摩尔吸光系数。根据方程式计算得到化合物 **3** 和 **4** 的结合常数分别是  $K_b = 2.11 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ,  $K_b = 1.52 \times 10^7 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ (图 5 左右两图的插入图),定量表明化合物 **3** 和 **4** 对 DNA 具有较强的插入键合能力,化合物 **3** 对 DNA 的插入键合能力比 **4** 稍强。

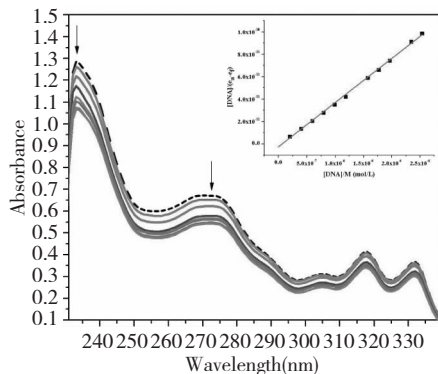


图 5 化合物 3(左)和 4(右)与 H21T-DNA 作用的紫外光谱图(虚线:未加 DNA,实线:加 DNA,每次 50  $\mu\text{L}$ )

Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of compound 3(Left) and 4(Right) bound H21T-DNA(Dash line; without DNA; Solid line; with DNA, 50  $\mu\text{L}$  per time)

图 6(3 为左图,4 为右图)为化合物 **3**、**4** 与 DNA 相互作用的荧光竞争滴定光谱,凝胶红 GelRed 是一种有效的荧光探针,灵敏性高、低毒性和稳定,是常见荧光探针 EB 的较好替代染料。在竞争性键合实验的缓冲溶液体系中,HTG21 DNA 与 GelRed 的浓度比为 10:1,往浓度为  $2 \times 10^{-3}$  M 的化合物 **3**、**4** 溶液中,逐渐滴加 GelRed-DNA,在 610 nm 处有较强的发射峰,是 GelRed 的发射峰并发生猝灭,说明化合物 **3** 和 **4** 与 GelRed-DNA 之间存在竞争性键合作用,其作用方式与 GelRed 类似的插入作用为主。根据 Stern-Volmer [9] 静态猝灭方程

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

其中, $F_0$  和  $F$  分别是不加和加入猝灭剂后 Gel-

Red-DNA 的荧光强度, $[Q]$  为猝灭剂的浓度。求得化合物的荧光猝灭常数  $K_{sv}$  分别为  $1.2 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$  和  $1.11 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ,表明化合物 **3**、**4** 与 G4-H21T-DNA 存在较强的结合能力 [10]。

图 7 表示了 pBR322 质粒 DNA 随化合物 **3** 和 **4** 浓度逐渐增加被切割的构型变化情况,在 DNA 与化合物 **3** 的反应体系中,当化合物 **3** 浓度增加到 40  $\mu\text{mol/L}$  时,DNA 的超螺旋构型(Form I)大部分被切割为缺口型(Form II)和少量的线型(Form III);而在 DNA 与化合物 **4** 的反应体系,当化合物 **4** 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  DNA 时,DNA 的超螺旋构型(Form I)几乎全部被切割为缺口型(Form II),没有出现线型

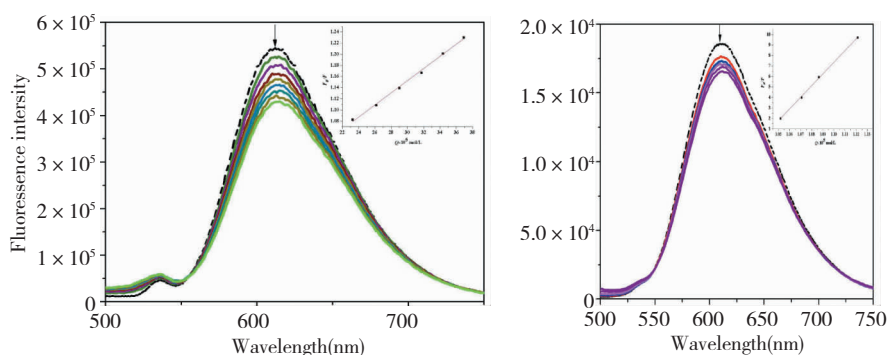


图6 化合物3(左)和4(右)与GelRed-H21T-DNA体系的荧光竞争光谱图( $\lambda_{\text{激发}} = 453 \text{ nm}$ )

Fig. 6 The fluorescence spectra of compounds **3**(Leaf) and **4**(Right) in the GelRed-H21T-DNA system

DNA(Form III)。实验结构说明化合物**3**、**4**均对

DNA有较强的切割作用。

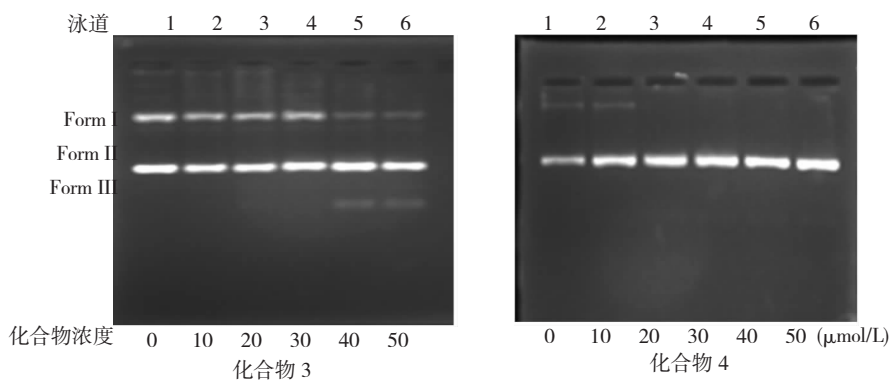


图7 不同浓度化合物**3**和**4**对pBR322质粒DNA的切割作用

Fig. 7 Cleavage of pBR322 DNA in different concentrations of **3** and **4**

### 3 结论

由色胺酮首次利用水热法合成8-Br-Phaitanthrin A,8-I-Phaitanthrin A,合成方法简单,产物纯度高,分散性好、粒度易控制。紫外、荧光光谱及凝胶电泳方法研究表明化合物对DNA具有切割作用,研究结果对丰富色胺酮衍生物的合成以及以DNA为靶点的抗肿瘤药物的筛选有指导意义。

#### 参考文献

- Jiao CW, Lin WC, Wu YT, *et al.* Isolation, structure elucidation, and synthesis of cytotoxic tryptanthrin analogues from *Phaius mishmensis*. *J Nat Prod*, 2008, 71: 1275-1279.
- Liu YF, Wang XL, Chen MH, *et al.* Three pairs of alkaloid enantiomers from the root of *Isatis indigotica*. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6: 141-147.
- Miao S(缪珊), Sun JY(孙纪元), Xie YH(谢艳华), *et al.* Research progress of tryptanthrin. *Chin Pharm Bull(中国药理学通报)*, 2008, 24: 152-155.

- Sharma VM, Prasanna P, Seshu KVA, *et al.* Novel indolo [2, 1-b] quinazoline analogues as cytostatic agents; synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12: 2303-2307.
- Gu YQ(顾远琼), Zhong YN(钟益宁), Shen WY(申文英), *et al.* Synthesis, cytotoxicity and G-quadruplex DNA binding effect of tryptanthrin halogenated derivatives. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2016, 28: 1300-1304.
- Bandekar PP, Roopnarine KA, Parekh VJ, *et al.* Antimicrobial activity of tryptanthrins in *Escherichia coli*. *J Med Chem*, 2010, 53: 3558-3565.
- Kang GW, Luo ZL, Liu CX, *et al.* Amino acid salts catalyzed asymmetric aldol reaction of tryptanthrin: A straightforward synthesis of phaitanthrin A and its derivatives. *Organ Lett*, 2013, 15: 4738-4741.
- Kumar CV, Asuncion EH. DNA binding studies and site selective fluorescence sensitization of an anthryl probe. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 8547-8553.

(下转第510页)