

高良姜素含氮衍生物的合成及其抗肿瘤活性

罗焱¹, 尤朋涛¹, 杨敏², 刘焱文¹, 刘丹^{1*}¹湖北中医药大学中药资源与中药化学湖北省重点实验室; ²湖北中医药大学药学院, 武汉 430065

摘要: 高良姜素是一种天然来源的黄酮醇类化合物, 药理作用广泛, 但尚未有关于其结构修饰的研究报道。本文以高良姜素为原料, 设计、合成了 5 个高良姜素含氮衍生物, 并对其结构进行 ¹H NMR、¹³C NMR 及 MS 表征; 然后采用 MTT 法测试结构修饰产物的抗肿瘤活性, 结果表明化合物 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(吗啉甲基)-4H-色烯-4-酮(**2c**)和 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(哌嗪-1-甲基)-4H-色烯-4-酮(**2d**)对人前列腺癌 PC-3 细胞株的增殖抑制活性(IC₅₀: 11.37 和 13.57 μmol/L)显著优于高良姜素(IC₅₀: 41.66 μmol/L), 分别提高了 3.66 倍和 3.07 倍; 化合物 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(哌嗪-1-甲基)-4H-色烯-4-酮(**2d**)对人结肠癌 LOVO 细胞株的增殖抑制活性较高良姜素提高了 5.22 倍。该系列衍生物的抗肿瘤活性的增强可能与 8-位上含氮杂环的引入有关。

关键词: 高良姜素; 结构修饰; 含氮杂环化合物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.4.007

Synthesis and Antitumor Activities of Nitrogen-Containing Galangin Derivatives

LUO Yan¹, YOU Peng-tao¹, YANG Min², LIU Yan-wen¹, LIU Dan^{1*}¹Hubei Key Laboratory of Resource Science and Chemistry in Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine; ²Pharmacy faculty, Hubei university of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: Galangin, a naturally occurring bioflavonoid, has a variety of pharmacological effects. However, few literatures on its structural modification have been reported. In the present study, five nitrogen-containing galangin derivatives were designed and synthesized, the structures of the synthesized derivatives were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS, then the antitumor activities of these derivatives were assayed by MTT method. The results showed that the anti-proliferative activity against human prostatic carcinoma cell line PC-3 of 2-phenyl-3,5,7-trihydroxy-8-(morpholinomethyl)-4H-chromen-4-one **2c** (IC₅₀: 11.37 μmol/L) and 2-phenyl-3,5,7-trihydroxy-8-(piperazin-1-ylmethyl)-4H-chromen-4-one **2d** (IC₅₀: 13.57 μmol/L) were more potent than galangin (IC₅₀: 41.66 μmol/L) while the compound **2d** exhibited the highest anti-proliferative activity against human colon cancer cell line Lovo with about 5.22-fold more potent than galangin. The increase of the antitumor activities of these derivatives was possibly related to the introduction of N-containing heterocyclic ring into the 8-site of galangin.

Key words: galangin; structural modification; nitrogen heterocyclic compounds; antitumor activity

目前, 肿瘤仍是威胁人类健康的第一杀手, 抗肿瘤药物的研发一直是科学家和药物学家努力的方向。以天然来源的活性化合物为底物, 进行结构改造, 获得一些新化合物结合生物活性筛选, 是一种被证实行之有效的科研策略^[1,2]。

高良姜素(3,5,7-三羟基黄酮)是一种天然来源的黄酮醇类化合物, 是我国传统中药高良姜根茎中主要活性成分, 具有抗炎、清除自由基^[3]和抗突变

等作用^[4]。近年来, 关于其抗肿瘤活性的研究日益增多, 能够抑制前列腺癌^[5]、乳腺癌^[6]、肝癌^[7,8]、胃癌^[9]等多种肿瘤细胞的增殖。

目前, 尚未有关于其结构修饰的文献报道, 基于此, 本文以高良姜素为原料进行结构改造, 采用体外细胞毒活性评价实验对得到的化合物进行活性研究, 为进一步开发利用高良姜素提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Brucker ACF-300、500 型核磁共振波谱仪, DM-SO-d₆ 为溶剂, TMS 为内标; Agilent 1100-LC-MSD-

收稿日期: 2016-12-06 接受日期: 2017-02-13

基金项目: 国家自然科学基金(31400302); 湖北中医药大学“青苗计划”(2015ZX015)

* 通讯作者 Tel: 86-27-68889065; E-mail: tdcqdan@163.com

Trap/SL 型质谱仪 (ESI Mode); BIO-RAD Model680 型全自动酶标仪。薄层层析硅胶 GF₂₅₄ 和柱层析用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工有限公司产品; 显示剂为改良碘化铊钾试剂。高良姜素(纯度 > 98%), 购于中国食品药品检定研究院, 批号: 111699-200602; 其它试剂均为分析纯。活性测试中 DMEM、RPMI-1640 培养液和胎牛血清 FBS 购于美国 Gibco 公司, 其他未特别说明来源的试剂均购于美国 Sigma 公司。

1.2 受试细胞株

人前列腺癌细胞(PC-3)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人肺癌细胞(A549)、人肝癌细胞(HepG2)、人结肠癌细胞(LOVO)、小鼠黑色素瘤细胞(B16F10)由湖北中医药大学, 中药资源与中药化学湖北省重点实验室提供。

1.3 结构修饰路线

以高良姜素为底物, 按图 1 路线进行合成, 得到 5 个目标化合物, 目标化合物的结构经¹H NMR、¹³C NMR 和 MS 确定。

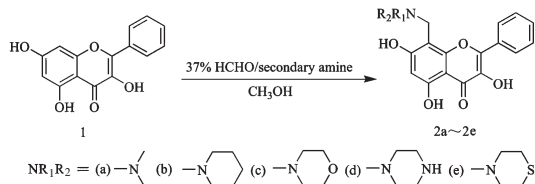


图 1 高良姜素含氮衍生物合成路线图

Fig. 1 The synthesis of nitrogen-containing galangin derivatives

1.4 化学合成

1.4.1 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(二甲胺甲基)-4H-色烯-4-酮(2a)

称取高良姜素 200.5 mg 于 100 mL 圆底烧瓶中, 用 16 mL 甲醇溶解, 滴加 1 mL DMSO, 37% 甲醛水溶液 128.1 mg, 二甲胺溶液 130.2 mg, 室温(25 °C) 搅拌反应 3 h, 有大量黄色固体析出, 静置、抽滤, 少量甲醇洗 3 次, 黄色粉末干燥称重得产物 151.5 mg, 产率 62.4%。

1.4.2 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(哌啶-1-甲基)-4H-色烯-4-酮(2b)

称取高良姜素 20.50 mg 于 10 mL 圆底烧瓶中, 用 2.8 mL 甲醇溶解, 滴加 37% 甲醛水溶液 6.5 μL, 哌啶溶液 8 μL, 室温(25 °C) 搅拌反应 3 h, 有大量黄色固体析出, 静置、抽滤, 少量甲醇洗 3 次, 黄色粉末干燥称重得产物 21.83 mg, 产率 78.3%。

1.4.3 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(吗啉甲基)-4H-色烯-4-酮(2c)

称取高良姜素 20.20 mg 于 10 mL 圆底烧瓶中, 用 4 mL 甲醇溶解, 滴加 37% 甲醛水溶液 6.5 μL, 吗啉溶液 8 μL, 55 °C 搅拌反应 4 h, 有黄色固体析出, 静置、抽滤, 少量甲醇洗 3 次, 黄色粉末干燥称重得产物 21.17 mg, 产率 76.7%。

1.4.4 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(哌嗪-1-甲基)-4H-色烯-4-酮(2d)

称取高良姜素 20.40 mg 于 10 mL 圆底烧瓶中, 用 4 mL 甲醇溶解, 滴加 37% 甲醛水溶液 6.5 μL, 加入无水哌嗪 9.02 mg, 55 °C 搅拌反应 3 h, 有黄色固体析出, 静置、抽滤, 少量甲醇洗 3 次, 黄色粉末干燥称重得产物 23.73 mg, 产率 85.3%。

1.4.5 2-苯基-3,5,7-三羟基-8-(硫代吗啉甲基)-4H-色烯-4-酮(2e)

称取高良姜素 20.50 mg 于 10 mL 圆底烧瓶中, 用 5 mL 甲醇溶解, 滴加 37% 甲醛水溶液 6.5 μL, 硫代吗啉 8 μL, 60 °C 搅拌反应 3 h, 有大量黄色固体析出, 静置、抽滤, 少量甲醇洗 3 次, 黄色粉末干燥称重得产物 22.91 mg, 产率 78.3%。

1.5 抗肿瘤活性筛选

选取处于对数生长期的肿瘤细胞株, 离心后收集, 用 RPMI-1640 或者 DMEM 培养液配成含有 10% FBS 的完全培养基, 用完全培养基将离心后的细胞稀释成 6×10^4 /mL 的浓度, 然后接种于 96 孔板中, 每孔接种 100 μL 细胞, 加入不同浓度的药品, 使得药物最终浓度为 5、10、20、40、80、160 μmol/L, 每个药物浓度设置三个复孔, 同时设置细胞对照组(con, 细胞、培养基、溶剂)、空白调零组(培养基、溶剂)以及药物对照组(培养基、药物)。在细胞培养箱中(37 °C, 5% CO₂) 孵育培养 48 h, 每孔加入 10 μL MTT(四甲基偶氮唑盐), 继续放在细胞培养箱中孵育 3~4 h, 吸走培养基, 每孔加入 100 mL DMSO, 酶标仪在 490 nm 处检测吸光度, 并计算半数抑制浓度 IC₅₀。

2 结果与讨论

2.1 理化常数及波谱数据

化合物 2a 黄色粉末; MS (ESI-MS) m/z : 326 [M-H]⁻, m/z 328 [M+H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3429, 2848, 1634, 1568, 1464, 770, 691; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ: 12.45(1H, brs, 5-OH), 8.17(2H, d,

$J = 7.5$ Hz, H-2', 6'), 7.57 (2H, m, H-3', 5'), 7.49 (1H, m, H-4'), 6.09 (1H, s, H-6), 3.94 (2H, s, Ar-CH₂), 2.41 (6H, s, N(CH₃)₂)。¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_c 144.7 (C-2), 136.9 (C-3), 175.8 (C-4), 159.8 (C-5), 98.9 (C-6), 167.5 (C-7), 99.2 (C-8), 153.9 (C-9), 101.9 (C-10), 131.3 (C-1'), 129.7 (C-4'), 128.5 (C-3', 5'), 127.3 (C-2', 6'), 52.9 (C-Ar-CH₂), 43.5 (C-CH₃)。

化合物 2b 黄色粉末; MS (ESI-MS) 366 [M-H]⁻, m/z 368 [M + H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3431, 2919, 1655, 1561, 1443, 769, 689; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.44 (1H, brs, 5-OH), 8.16 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H-2', 6'), 7.50 ~ 7.58 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.12 (1H, s, H-6), 3.95 (2H, s, Ar-CH₂), 2.64 (4H, s, NCH₂), 1.58 (4H, m, CH₂ × 2), 1.47 (2H, m, CH₂)。

化合物 2c 黄色粉末; m/z (ESI-MS) 368 [M-H]⁻, m/z 370 [M + H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3437, 2920, 1645, 1567, 1440, 770, 689; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.40 (1H, s, 5-OH), 8.21 (2H, m, H-2', 6'), 7.51 ~ 7.59 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.25 (1H, s, H-6), 3.82 (2H, s, Ar-CH₂), 3.59 (4H, m, OCH₂ × 2), 2.51 (4H, m, NCH₂ × 2)。

化合物 2d 黄色粉末; m/z (ESI-MS) 367 [M-H]⁻, m/z 369 [M + H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3435,

2849, 1663, 1559, 1447, 771, 689; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 12.38 (1H, s, 5-OH), 8.19 (2H, m, H-2', 6'), 7.48 ~ 7.55 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.22 (1H, s, H-6), 3.86 (2H, s, Ar-CH₂), 3.77 (4H, m, NCH₂ × 2), 2.62 (4H, m, NHCH₂ × 2)。

化合物 2e 黄色粉末; m/z (ESI-MS) 384.2 [M-H]⁻, m/z 386.2 [M + H]⁺; IR (KBr, cm⁻¹): 3439, 2921, 1649, 1564, 1445, 768, 688; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ : 8.23 (2H, m, H-2', 6'), 7.57 ~ 7.52 (3H, m, H-3', 4', 5'), 6.20 (1H, s, H-6), 3.79 (2H, s, Ar-CH₂), 2.79 ~ 2.78 (4H, m, SCH₂ × 2), 2.63 ~ 2.62 (4H, m, NCH₂ × 2)。

2.2 抗肿瘤活性筛选结果

高良姜素含氮衍生物抗肿瘤活性筛选结果见表 1, 结果可见, 化合物 **2a** 对六种被测细胞株的活性均低于底物高良姜素的活性; 化合物 **2b** 除了对 B16F10 细胞株的细胞毒活性优于高良姜素外, 对其他被测细胞株的活性均低; 化合物 **2c** 和 **2d** 对 PC-3 细胞具有显著的细胞毒活性, IC₅₀ 分别为 11.37 μ mol/L 和 13.57 μ mol/L; 化合物 **2d** 对人结肠癌 LOVO 的细胞毒活性最好, IC₅₀ 为 8.51 μ mol/L; 化合物 **2e** 对 B16F10 细胞株较敏感。结合结构进行分析, 当在高良姜素的 8-位引入直链二级胺如二甲胺时, 所得的产物抗肿瘤活性差, 而引入含氮杂环二级胺时, 有利于得到活性更好的结构修饰产物。

表 1 高良姜素含氮衍生物抗肿瘤活性筛选结果 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of anticancer activities of nitrogen-containing galangin derivatives ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Compounds	Cell lines IC ₅₀ (μ mol/L)					
	PC-3	MCF-7	A549	HepG2	LOVO	B16F10
2a	142.25 \pm 3.7	>200	>200	81.33 \pm 9.4	>200	>200
2b	>200	136.3 \pm 7.6	110.9 \pm 9.1	>200	106.9 \pm 11.1	46.85 *
2c	11.37 \pm 1.4 * *	>200	62.91 \pm 5.7 *	>200	41.4 \pm 5.7	144.30
2d	13.57 \pm 2.1 * *	>200	73.09 \pm 6.9	82.76 \pm 9.1	8.51 \pm 1.2 * * *	119.55
2e	44.31 \pm 5.2	>200	>200	>200	46.3 \pm 4.9	42.61 * *
galangin	41.66 \pm 3.8	20.68 \pm 3.4	74.4 \pm 8.9	41.66 \pm 2.7	44.4 \pm 5.7	67.67 \pm 9.3

注: 与 galangin 比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with galangin, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

3 结论

通过 Mannich 反应成功合成了 5 个含氮高良姜素衍生物, 均为新化合物。抗肿瘤活性筛选结果显示, 化合物 **2c** 和 **2d** 对人前列腺癌 PC-3 细胞株的增殖抑制活性 (IC₅₀: 11.37 和 13.57 μ mol/L) 显著优

于高良姜素 (IC₅₀: 41.66 μ mol/L), 分别提高了 3.66 倍和 3.07 倍; 化合物 **2d** 对人结肠癌 LOVO 细胞株的增殖抑制活性较高良姜素提高了 5.22 倍, 化合物 **2c, 2d** 活性的增强可能与高良姜素的 8-位含氮杂环的引入有关, 值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 Ahn YM, Vogeti L, Liu CJ, *et al.* Design, synthesis, and antiproliferative and CDK2-cyclin A inhibitory activity of novel flavopiridol analogues. *Bioorgan Med Chem*, 2007, 15: 702-713.
 - 2 Jain SK, Bharate SB, Vishwakarma RA. Cyclin-dependent kinase inhibition by flavoalkaloids. *Mini-Rev Med Chem*, 2012, 12: 632-649.
 - 3 Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 2002, 73 (Suppl 1): S21-S29.
 - 4 Sohn SJ, Huh IH, Au WW, *et al.* Antigenotoxicity of galangin against N-methyl-N-nitrosourea. *Mutat Res-Fund Mol M*, 1998, 402: 231-236.
 - 5 Szliszka E, Czuba ZP, Bronikowska J, *et al.* Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-Induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid-Based Compl Alt*, 2011, 2011 (7): 1-11.
 - 6 Murray TJ, Yang X, Sherr DH. Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A. *Breast Cancer Res*, 2006, 8 (2): 1-12.
 - 7 Wen M, Wu J, Luo H, *et al.* Galangin induces autophagy through upregulation of p53 in HepG2 cells. *Pharmacology*, 2012, 89: 247-255.
 - 8 Zhang HT, Wu J, Wen M, *et al.* Galangin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through the caspase 8/t-Bid mitochondrial pathway. *J Asian nat prod res*, 2012, 14: 626-633.
 - 9 Kim DA, Jeon YK, Nam MJ. Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 684-688.
-
- (上接第 562 页)
- 5 Mei QX (梅全喜), Zhang ZQ (张志群), Lin H (林慧), *et al.* Research progress of tumor treatment pharmacological action and clinical application of *solanumnigrum* L. *China Pharm* (中国药房), 2012, 23: 3735-3737.
 - 6 Liu SW (刘世巍), Ding JH (丁建海), Liu LH (刘立红), *et al.* Research progress of chemical composition and biological activity in *solanumnigrum* L. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 977-978.
 - 7 Chen L (陈来), Guo Q (郭权), Jin DZ (金德忠), *et al.* Comparison of structural effects of solasonine and solasodine inhibiting lung cancer cells. *Jiangxi J Tradit Chin Med* (江西中医药), 2015, 46: 63-65.
 - 8 Chen L (陈来), Li SS (李姗姗), Jin DZ (金德忠), *et al.* Study on the inhibition effect of solasonine from *solanumnigrum* L. on lung cancer cells. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 333-334.
 - 9 Huang WS (黄文斯), Wang Y (王颖), Zhu HT (朱海涛), *et al.* Solasonine-induced apoptosis in lung cancer cell line H446 and its mechanism. *Chin J Lung Cancer* (中国肺癌杂志), 2015, 18: 416-421.
 - 10 Green DR, Fitzgerald P. Just so stories about the evolution of apoptosis. *Current Biol*, 2016, 26: R620-627.
 - 11 Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars Cancer Biol*, 2015, 31: 84-88.
 - 12 Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol*, 2015, 89: 289-317.
 - 13 Wu F (吴芳), An YK (安永康), Zhu YQ (朱艳琴). Research progress of tumor cell apoptosis and endoplasmic reticulum stress. *Modern Oncol* (现代肿瘤医学), 2014, 22: 2228-2231.