

华萝藦 C_{21} 甾体成分及其逆转肿瘤细胞多药耐药的作用

黎欢, 吴斯东, 胡英杰, 周娟, 沈小玲*

广州中医药大学热带医学研究所中药新药发现实验室, 广州 510405

摘要: 华萝藦化学成分的分离鉴定及其逆转 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp) 过表达肿瘤细胞多药耐药 (multi-drug resistance, MDR) 的活性筛选。华萝藦地上部分粗粉经乙醇回流提取并制成石油醚、乙酸乙酯和正丁醇可溶部位, 取正丁醇部位经正相、反相硅胶柱层析分离化学成分, 采用 NMR 和 MS 等波谱学技术鉴定化合物结构, 运用 Pgp 过表达的人宫颈癌细胞 HeLa/Tax、肝癌细胞株 HepG2/Dox、白血病细胞株 K562/Dox 和口腔上皮癌细胞株 KB V1 为模型, 评价其逆转细胞对 Pgp 转运底物类抗肿瘤药物长春碱、多柔比星和紫杉醇耐药的作用。结果显示, 华萝藦正丁醇部位中首次鉴定出具有通光散苷元乙母核结构类型的 4 个酯类化合物 Tenacissoside H (1)、Marsdenoside B (2)、Tenacissoside A (3) 和 Marsdenoside H (4); 化合物 1 和 2 在 5 μM 的无细胞毒浓度下能显著逆转 MDR 细胞对长春碱、多柔比星和紫杉醇的耐药, 化合物 3 和 4 在相同浓度下无此作用或作用较弱。本文首次报道了华萝藦中的 C_{21} 甾体酯类化合物具有逆转 Pgp 过表达肿瘤细胞 MDR 的作用。

关键词: 华萝藦; C_{21} 甾体; 肿瘤多药耐药; tenacissoside H; marsdenoside B

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.006

Steroids from *Metaplexis hemsleyana* and Their Activity in Reversing Multidrug Resistance of Cancer Cells

LI Huan, WU Si-dong, HU Ying-jie, ZHOU Juan, SHEN Xiao-ling*

Laboratory of New Herbal Drug Discovery, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: The aim of this study was to screen active constituents that reverse multidrug resistance (MDR) in P-glycoprotein (Pgp) overexpressing cancer cells from plant *Metaplexis hemsleyana* Oliv. (Asclepiadaceae). The aerial parts of *M. hemsleyana* were extracted with hot ethanol. After removal of ethanol, the concentrated ethanol extract was successively extracted with petrol ether (PE), ethyl acetate (EtOAc) and n-butanol (BuOH) to yield PE, EtOAc and BuOH fractions. Chemical constituents from the BuOH fraction were isolated through silica gel and ODS chromatographic columns. The chemical structures of isolated compounds were identified by comprehensive spectroscopic analysis on their NMR and MS data. Activity of the four compounds in reversing resistance of MDR cancer cells to vinblastine, doxorubicin and paclitaxel was evaluated in Pgp-overexpressing human epidermoid carcinoma cell KB V1, leukemia cell K562/Dox, hepatoma cell HepG2/Dox and cervical carcinoma cell HeLa/Tax. Four compounds were obtained from the BuOH fraction and their structures were identified as tenacissoside H (1), marsdenoside B (2), tenacissoside A (3) and marsdenoside H (4). Compounds 1 and 2 at 5 μM , a non-cytotoxic concentration, significantly reversed the resistance to vinblastine, doxorubicin and paclitaxel in all four MDR cells. At the same concentration, compounds 3 and 4 had no or only weak reversal effect on drug resistance. This is the first report that tenacigenin B derivatives were found from *M. hemsleyana* and tenacissoside H and marsdenoside B showed activity in reversing MDR in Pgp overexpressing human cancer cells.

Key words: *Metaplexis hemsleyana* Oliv.; C_{21} steroid; cancer multidrug resistance; tenacissoside H; marsdenoside B

肿瘤细胞本身具有的耐药性或者接触抗癌化学药物后产生的耐药性, 特别是多药耐药性 (Multidrug

resistance, MDR) 是引起肿瘤化疗失败的主要原因。肿瘤化疗增敏剂 (Chemosensitizer) 可以改变肿瘤细胞内某些与耐药基因和相关蛋白的表达或功能, 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[1]。一些中药或植物提取物或单体成分由于能够逆转 P-糖蛋白 (P-

收稿日期: 2017-01-19

接受日期: 2017-03-22

基金项目: 广东省高校创新强校工程创新团队项目 (E1-KFD01 5141K05)

* 通信作者 Tel: 86-20-36585456; E-mail: xlshen66@126.com

glycoprotein, Pgp) 介导的肿瘤 MDR, 具有发展成为肿瘤化疗增效剂或增敏剂的可能性^[2]。华萝藦 (*Metaplexis hemsleyana* Oliv.) 是萝藦科萝藦属植物, 又名羊奶菜, 主要分布于云南、贵州、广西等地, 有补肾强壮作用, 治肾亏遗精、缺奶、脱力劳伤等^[3]。本研究组曾从该植物中分得 C_{21} 甾体苷类成分^[4,5], 并发现同科近缘植物通光散中的通光散苷元乙 (Tenacigenin B) 类型的 C_{21} 甾体酯类衍生物具有逆转 Pgp 介导的肿瘤细胞 MDR 作用, 以及在体内具有显著加强紫杉醇等药物抑瘤活性的作用^[6-8]。鉴于这两种植物都含有多氧孕甾烷类 C_{21} 甾体酯类衍生物, 为进一步寻找高效低毒的天然来源的肿瘤化疗增敏剂, 我们对华萝藦开展了进一步的化学成分及是否具有肿瘤化疗增效作用的药理实验。本文报告对华萝藦正丁醇部位中得到的 4 个 C_{21} 甾体酯类衍生物的分鉴定结果, 及其对 Pgp 过表达肿瘤细胞 MDR 作用的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

紫杉醇 (paclitaxel, TAX)、多柔比星 (doxorubicin, DOX)、长春碱 (vinblastine, VBL)、异搏定 (verapamil, VRP)、(美国 Sigma 公司); RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基 (Biological Industries, Iserel); 胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶消化液 (美国 Gibco 公司); CCK-8 细胞计数试剂盒 (日本同仁株式会社)。乙醇等其它化学试剂均为国产分析纯。柱层析硅胶 (200 ~ 300 目) 及薄层色谱硅胶 H (10 ~ 40 μm), 青岛海洋化工有限公司; 薄层层析硅胶 G 板 (10 × 20 cm), 德国 Merck 公司; MSC1。TLC 显示剂为 6% 高氯酸-3% 香草醛-50% 乙醇溶液。植物样品采自云南省红河州建水县, 经中国科学院深圳仙湖植物园李秉韬教授鉴定为萝藦科萝藦属植物华萝藦 (*Metaplexis hemsleyana* Oliv.), 标本保存于广州中医药大学热带医学研究所新药发现实验室。

1.2 主要仪器

DRX-400 型超导核磁共振仪测定核磁共振谱 (NMR, 德国 Bruker 公司); 高效液相色谱仪 (检测器为 PDA-100, UVD-170U, 美国 Dionex 公司); 快速中压柱层析系统 (利穗科技有限公司)。HF-212 型 CO_2 细胞培养箱 (上海力申科学仪器有限公司); 净化生物超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司); MK3 型酶标仪 (美国 Thermo fisher 公司)。

1.3 提取分离与结构鉴定

华萝藦地上部分干粉 (10.0 kg), 加 80% 乙醇回流提取 6 次, 每次 2 h, 收集乙醇提取液, 减压浓缩至无醇味, 加水混合, 加石油醚脱脂, 水相依次加乙酸乙酯和正丁醇萃取, 分取有机相, 减压浓缩, 真空干燥, 分别得乙酸乙酯部位 300 g (得率 3.0%) 和正丁醇部位 140 g (得率 1.4%)。取正丁醇部位浸膏 (140 g), 加甲醇溶解, 与适量硅胶 (200 ~ 300 目) 拌匀, 室温下晾干, 上硅胶柱 (200 ~ 300 目), 用氯仿—甲醇 (100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 80:20 和 50:50) 梯度洗脱, 每流份收集 500 mL 洗脱液, 收集 80 个馏分, 根据 TLC 检测结果合并相近组分, 得 7 个部分即 H1 (馏分 1-15, 下同)、H2 (16-27)、H3 (28-40)、H4 (41-45)、H5 (46-60)、H6 (61-64) 和 H7 (64-80)。取 H6 进行硅胶柱层析, 氯仿—甲醇 (95:5) 洗脱, 每瓶 30 mL, 收集 150 个馏分; 馏分 1-50 经 ODS 反相柱层析, 甲醇—水 (70:30) 洗脱, 得化合物 1 (10 mg)。H2 进行硅胶柱层析, 石油醚—乙酸乙酯 (100:0 ~ 60:40) 洗脱, 每瓶 100 mL, 收集 70 个馏分, 其中石油醚—乙酸乙酯 (90:10) 洗脱物经 ODS 反相柱层析, 甲醇—水 (60:40) 洗脱, 得到的主成分经葡聚糖凝胶柱 (甲醇洗脱) 纯化, 得化合物 2 (50 mg)。H3 进行硅胶柱层析, 氯仿—甲醇 (95:5) 洗脱, 每瓶 30 mL, 共收集 100 个馏分, 第 60-80 馏分经 ODS 反相柱层析, 甲醇—水 (60:40) 洗脱, 先后得到两个成分, 分别经葡聚糖凝胶柱 (甲醇洗脱) 纯化, 得化合物 3 (55 mg) 和化合物 4 (60 mg)。测定并分析各成分的核磁共振谱、质谱等波谱学数据, 并与文献报道的有关化合物的相应数据对照, 鉴定化学结构。

1.4 细胞培养与细胞增殖实验

1.4.1 细胞培养

人口腔上皮癌细胞株 KB-3-1 及其 Pgp 过表达 MDR 亚株 KB V1 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养, 人白血病细胞株 K562、肝癌细胞株 HepG2、宫颈癌细胞株 HeLa 其 Pgp 过表达 MDR 亚株 K562/Dox、HepG2/Dox、HeLa/Tax 采用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。为了维持 MDR 亚株的耐药性, 分别在 KB V1 培养液中添加 0.2 μM VBL, 在 K562/Dox 培养液中添加 0.2 μM DOX, 在 HepG2/Dox 培养液中添加 1.2 μM DOX, 在 HeLa/Tax 培养液中添加 0.1 μM TAX。所有细胞置于饱和湿度, 含 5% 二氧化碳的 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 细胞融合度达 80% ~ 90% 时传代。在用于实验前, MDR 细胞需

在不含药的培养液中培养至少一周^[9]。

1.4.2 药物对细胞增殖的影响

分别胰酶消化收集敏感的 KB-3-1、K562、HepG2、HeLa 细胞及 Pgp-MDR 的 KBV1、K562/Dox、HepG2/Dox 和 HeLa/Tax 细胞,用培养液配成密度 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,按 50 μ L/孔接种于 96 孔板。将细胞板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培育 24 h,加入 50 μ L/孔含不同浓度华萝摩单体成分或抗肿瘤药物的新鲜培养液,每 3 孔为一个检测浓度。实验同时设无细胞的培养液空白孔及无药物的细胞对照孔。药物与细胞作用 46 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8,继续培养 2 h。在 450 nm 测定各孔吸收值,该值和活细胞数量成正比。药物对细胞增殖的抑制能力以其抑制 50% 细胞增殖时的浓度 IC_{50} 表示。所有试验至少重复三次,最后结果以“平均值 \pm 标准差 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)”表示。按公式 耐药倍数 = $IC_{50}(\text{MDR细胞}) / IC_{50}(\text{敏感细胞})$ 计算 Pgp-MDR 细胞对抗肿瘤药物 VBL、DOX 和 TAX 的耐药倍数,分析细胞的耐药性。

1.4.3 华萝摩单体成分对 Pgp 介导的肿瘤细胞 MDR 的影响

按 1.4.2 所述接种 KBV1、K562/Dox、HepG2/Dox 和 HeLa/Tax 细胞,孵育 24 h。加入 50 μ L/孔含有不同浓度抗肿瘤药物的新鲜培养液,每个浓度 3 个复孔。同时每孔加入固定浓度的华萝摩单体成分 (5 μ M) 或 VRP (10 μ M, 阳性对照)。继续培养 46 h 后,CCK-8 法测定抗肿瘤药物的 IC_{50} 。计算华萝摩单体成分或 VRP 对 Pgp-MDR 细胞耐药的逆转倍数 R:

$R = \text{抗肿瘤药物单独作用时的 } IC_{50} / \text{在固定浓度的华萝摩单体成分存在下抗肿瘤药物的 } IC_{50}$

$R \geq 1.5$ 说明该化合物有逆转肿瘤细胞 MDR 的作用,R 值越大说明逆转 MDR 的作用越强。

2 实验结果

2.1 化合物的结构鉴定

化合物 1 白色无定形粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Keller-Kiliani 反应均呈阳性。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 0.85 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-4'), 1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-5'), 1.02 (3H, s, H-19), 1.05 (3H, s, H-18), 1.23 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-Allo-6), 1.35 (3H, d, $J = 4.8$ Hz, H-Ole-6), 1.94 (3H, s, H-2''), 2.18 (3H, s, H-21), 2.90 (1H, br d, $J = 7.6$ Hz, H-17 β), 3.35 (3H, s, H-Ole-

3-OCH₃), 3.64 (3H, s, H-Allo-3-OCH₃), 4.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-Ole-1), 4.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-Allo-1), 4.92 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-12 α), 5.33 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-11 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 37.6 (t, C-1), 28.9 (t, C-2), 76.1 (d, C-3), 34.6 (t, C-4), 43.9 (d, C-5), 26.5 (t, C-6), 31.7 (t, C-7), 66.7 (s, C-8), 51.0 (d, C-9), 39.0 (s, C-10), 68.4 (d, C-11), 75.1 (d, C-12), 45.8 (s, C-13), 71.4 (s, C-14), 26.4 (t, C-15), 24.8 (t, C-16), 60.2 (d, C-17), 16.8 (q, C-18), 12.7 (q, C-19), 210.6 (s, C-20), 29.7 (q, C-21), 175.5 (s, C-1'), 41.3 (d, C-2'), 26.2 (t, C-3'), 11.7 (q, C-4'), 15.3 (q, C-5'), 170.7 (s, C-1''), 20.9 (q, C-2''), 96.8 (d, C-1 Ole), 36.1 (t, C-2 Ole), 78.8 (d, C-3 Ole), 79.1 (d, C-4 Ole), 71.3 (d, C-5 Ole), 18.6 (q, C-6 Ole), 55.6 (q, C-3 Ole-OCH₃), 99.1 (d, C-1 Allo), 71.8 (d, C-2 Allo), 81.0 (d, C-3 Allo), 72.8 (d, C-4 Allo), 71.3 (C-5 Allo), 17.9 (q, C-6 Allo), 61.9 (q, C-3 Allo-OCH₃); HRMS m/z : 795.4522 [M + H]⁺ (calcd for C₄₂H₆₇O₁₄⁺, 795.4528), ESIMS m/z : 817.5 [M + Na]⁺。NMR 数据与文献报道的 Tenacissoside H [11 α -O-2-methylbutanoyl-12 β -O-acetyltenacigenin B 3-O-6-deoxy-3-O-methyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-oleandropyranoside] 一致^[10]; 测定的 DEPT、2D-NMR 谱数据支持结构鉴定。

化合物 2 白色无定形粉末 (甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Keller-Kiliani 反应均呈阳性。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 1.033 (3H, s, H-18), 1.084 (3H, s, H-19), 1.229 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-Allo-6), 1.335 (3H, d, $J = 4.8$ Hz, H-Ole-6), 1.648 (3H, br s, H-5'), 1.680 (3H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4'), 2.007 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-9), 2.188 (3H, s, H-21), 2.906 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-17 β), 3.155 (1H, dd, $J = 9.6, 3.2$ Hz, H-Ole-4), 3.344 (3H, s, H-Ole-3), 3.454 (1H, dd, $J = 8.2, 2.8$ Hz, H-Allo-2), 3.633 (3H, s, H-Allo-3), 4.548 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-Ole-1), 4.767 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-Allo-1), 5.023 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-12 α), 5.434 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-11 β), 6.654 (1H, m, H-3'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 37.3 (t, C-1), 29.1 (t, C-2), 76.7 (d, C-3), 34.7 (t, C-4), 43.9 (d, C-5), 26.8 (t, C-6), 31.8 (t, C-7), 66.8 (s, C-8), 51.2 (d, C-9), 39.0 (s, C-10), 68.7 (d, C-11), 74.7

(d, C-12), 46.0 (s, C-13), 71.4 (s, C-14), 26.7 (t, C-15), 25.0 (t, C-16), 59.7 (d, C-17), 16.6 (q, C-18), 12.6 (q, C-19), 211.0 (s, C-20), 30.2 (q, C-21), 167.3 (s, C-1'), 127.8 (s, C-2'), 137.8 (d, C-3'), 11.8 (q, C-4'), 14.4 (q, C-5'), 167.4 (s, C-1''), 128.6 (s, C-2''), 138.1 (d, C-3''), 11.7 (q, C-4''), 14.4 (q, C-5''), 96.9 (d, C-1 Ole), 36.0 (t, C-2 Ole), 78.7 (d, C-3 Ole), 79.0 (d, C-4 Ole), 71.3 (d, C-5 Ole), 18.6 (q, C-6 Ole), 55.6 (q, C-3 Ole-OCH₃), 99.1 (d, C-1 Allo), 71.7 (d, C-2 Allo), 81.0 (d, C-3 Allo), 72.8 (d, C-4 Allo), 71.2 (d, C-5 Allo), 17.8 (q, C-6 Allo), 61.9 (d, C-3 Allo-OCH₃); HR-ESI-MS m/z : 833.4679 [M + H]⁺ (calcd for C₄₅H₆₉O₁₄⁺, 833.4672); ESI-MS m/z : 856.9 [M + Na]⁺。NMR 数据与文献报道的 Marsdenoside [11 α -12 β -di-*O*-tigloyl-tenacigenin B 3-*O*-6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-oleandropyranoside] 一致^[11]。

化合物 3 白色无定形粉末(甲醇), Liebermann-Burchard 反应和 Keller-Kiliani 反应均呈阳性。¹H NMR [(CD₃)₂CO, 400 MHz] δ : 1.036 (3H, s, H-18), 1.059 (3H, s, H-19), 1.244 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-Allo-6), 1.275 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-Ole-6), 1.748 (3H, br s, H-5'), 1.756 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-4'), 1.802 (3H, s, H-2''), 2.106 (3H, s, H-21), 2.906 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-17 β), 3.355 (3H, s, H-Ole-3-OCH₃), 3.527 (3H, s, H-Allo-3-OCH₃), 4.548 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1 Ole), 4.767 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1 Allo), 5.015 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-12 α), 5.366 (1H, t, J = 10.0 Hz, H-11 β), 6.737 (1H, m, H-3'); ¹³C NMR [(CD₃)₂CO, 100 MHz] δ : 38.1 (t, C-1), 29.9 (t, C-2), 76.5 (d, C-3), 35.6 (t, C-4), 44.5 (d, C-5), 27.6 (t, C-6), 32.5 (t, C-7), 67.0 (s, C-8), 52.2 (d, C-9), 39.7 (s, C-10), 69.3 (d, C-11), 75.2 (d, C-12), 46.5 (s, C-13), 71.7 (s, C-14), 27.4 (t, C-15), 25.5 (t, C-16), 60.1 (d, C-17), 13.0 (q, C-18), 16.9 (q, C-19), 210.5 (s, C-20), 30.4 (q, C-21), 167.3 (s, C-1'), 129.5 (s, C-2'), 138.3 (d, C-3'), 12.1 (q, C-4'), 14.4 (q, C-5'), 170.8 (s, C-1''), 20.5 (q, C-2''), 97.9 (d, C-1 Ole), 37.7 (t, C-2 Ole), 80.1 (d, C-3 Ole), 82.7 (d, C-4 Ole), 71.8 (d, C-5 Ole), 18.0 (q, C-6 Ole), 57.0 (d, C-3 Ole-OCH₃), 101.5 (d, C-1 Allo), 72.3 (d, C-2

All), 82.9 (d, C-3 Allo), 83.5 (d, C-4 Allo), 69.5 (d, C-5 Allo), 19.0 (q, C-6 All), 61.6 (q, C-3 Allo-OCH₃), 105.8 (d, C-1 Glc), 77.6 (d, C-2 Glc), 80.1 (d, C-3 Glc), 72.0 (d, C-4 Glc), 72.3 (d, C-5 Glc), 63.0 (t, C-6 Glc); ESI-MS m/z : 977.6 [M + Na]⁺。NMR 数据与文献报道的 Tenacissoside A [11 α -*O*-tigloyl-12 β -*O*-acetyltenacigenin B 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-oleandropyranoside] 相一致^[12]。

化合物 4 白色无定形粉末(甲醇), Liebermann 反应和 Keller-Kiliani 反应均呈阳性。¹H NMR [(CD₃)₂CO, 400 MHz] δ : 0.887 (3H, t, J = 7.6 Hz, H-4'), 1.033 (3H, s, H-18), 1.041 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-5'), 1.049 (3H, s, H-19), 1.248 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-6 Allo), 1.285 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-6 Ole), 1.949 (3H, s, H-2''), 2.040 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-9), 2.115 (3H, s, H-21), 2.906 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-17 β), 3.359 (3H, s, H-Ole-3-OCH₃), 3.531 (3H, s, H-Allo-3-OCH₃), 4.648 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1 Ole), 4.690 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1 Allo), 5.011 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-12 α), 5.326 (1H, t, J = 10.0 Hz, H-11 β); ¹³C NMR [(CD₃)₂CO, 100 MHz] δ : 38.5 (t, C-1), 29.8 (t, C-2), 76.3 (d, C-3), 35.6 (t, C-4), 44.5 (d, C-5), 27.6 (t, C-6), 32.5 (t, C-7), 67.0 (s, C-8), 52.2 (d, C-9), 39.8 (s, C-10), 69.0 (d, C-11), 75.2 (d, C-12), 46.5 (s, C-13), 72.0 (t, C-14), 27.3 (t, C-15), 25.4 (t, C-16), 60.4 (d, C-17), 17.0 (q, C-18), 13.1 (q, C-19), 210.2 (s, C-20), 29.9 (q, C-21), 175.6 (s, C-1'), 41.9 (d, C-2'), 26.9 (t, C-3'), 11.9 (q, C-4'), 15.7 (q, C-5'), 171.0 (s, C-1''), 20.9 (q, C-2''), 97.8 (d, C-1 Ole), 37.6 (t, C-2 Ole), 80.2 (d, C-3 Ole), 82.9 (d, C-4 Ole), 72.0 (d, C-5 Ole), 18.1 (q, C-6 Ole), 57.0 (q, C-3 Ole-OCH₃), 101.5 (d, C-1 Allo), 71.9 (d, C-2 Allo), 82.7 (d, C-3 Allo), 83.6 (d, C-4 Allo), 69.6 (d, C-5 Allo), 19.0 (q, C-6 Allo), 61.6 (d, C-3 Allo-OCH₃), 105.9 (d, C-1 Glc), 78.0 (d, C-2 Glc), 77.6 (d, C-3 Glc), 71.7 (d, C-4 Glc), 72.4 (d, C-5 Glc), 63.1 (t, C-6 Glc); ESI-MS m/z : 979.3 [M + Na]⁺。NMR 数据与文献报道的 Marsdenoside H [11 α -*O*-2-methylbutyryl-12 β -*O*-acetyltenacigenin B 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6-deoxy-3-*O*-methyl- β -D-allopyranosyl-(1-4)- β -D-oleandropyranoside] 相一致^[11]; 测定的

DEPT、2D-NMR 谱数据支持结构鉴定。

2.2 华萝藤 C₂₁ 甾体对肿瘤细胞 Pgp-MDR 的逆转作用评价结果

2.2.1 Pgp-MDR 细胞对长春碱、多柔比星和紫杉醇具有耐药性

如表 1 所示, Pgp 转运底物类药物长春碱(VBL)、多柔比星(DOX)和紫杉醇(TAX)对药物敏感的 KB-3-1、HepG2、K562 和 HeLa 细胞的增殖抑制

作用较强(IC₅₀数值较小),而对 Pgp 介导 MDR(Pgp-MDR)细胞亚株 KB V1、HepG2/Dox、K562/Dox 和 HeLa/Tax 的增殖抑制作用明显减弱(IC₅₀数值较大),说明 Pgp 过表达的肿瘤细胞对不同的 Pgp 转运底物类药物都具有抗药性,即细胞具有多药抗性(MDR)。本实验中,四株 Pgp-MDR 细胞对不同药物的抗性(耐药倍数)各不相同,最低表现为 HeLa/Tax 对 DOX 的 4 倍,最高表现为 KB V1 对 TAX 的 848 倍。

表 1 Pgp-MDR 细胞对 Pgp 转运底物类药物的耐药性($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Resistance of Pgp-MDR cancer cells to Pgp substrate-like drug($n=3, \bar{x} \pm s$)

	VBL		DOX		TAX	
	IC ₅₀ (μM)	F	IC ₅₀ (μM)	F	IC ₅₀ (μM)	F
KB-3-1	$(0.68 \pm 0.09) \times 10^{-3}$		0.08 ± 0.02		$(6.71 \pm 2.14) \times 10^{-3}$	
KBV1	0.51 ± 0.03	750	5.38 ± 0.059	67	5.69 ± 0.28	848
HepG2	$(0.59 \pm 0.11) \times 10^{-3}$		$(0.23 \pm 0.01) \times 10^{-3}$		$(7.01 \pm 2.79) \times 10^{-3}$	
HepG2/Dox	0.39 ± 0.08	661	61.39 ± 3.83	267	5.56 ± 1.04	793
K562	$(1.06 \pm 0.28) \times 10^{-3}$		0.34 ± 0.07		$(23.65 \pm 0.38) \times 10^{-3}$	
K562/Dox	0.18 ± 0.13	170	33.18 ± 2.18	97	1.91 ± 0.30	81
HeLa	$(2.02 \pm 0.19) \times 10^{-3}$		0.20 ± 0.11		$4.98 \pm 0.62 (\times 10^{-3})$	
HeLa/Tax	1.02 ± 0.11	505	0.80 ± 0.25	4	0.61 ± 0.20	122

注:耐药倍数 F = IC₅₀(Pgp-MDR细胞) / IC₅₀(敏感细胞)。

Note: F (Fold of drug resistance) = IC₅₀(Pgp-MDR cell) / IC₅₀(sensitive cell)。

2.2.2 化合物 1 和 2 逆转了 Pgp-MDR 细胞对长春碱、多柔比星和紫杉醇的耐药性

化合物 1~4 单独作用时对细胞的增殖抑制作用很弱(IC₅₀ < 100 μM, 数据未列出);本实验检测了化合物 1~4 在 5 μM 浓度下对上述四株 Pgp-MDR 肿瘤细胞抗药性的逆转作用,以 VRP(10 μM) 作为阳性药对照。分别测试了 VBL、DOX 和 TAX 单独、以及在 5 μM 的 1~4 或 10 μM 的 VRP 存在下对细胞增殖的 IC₅₀,并计算化合物对 MDR 的耐药逆转倍数 R。结果见表 2~4。阳性对照 VRP 在全部四个细胞株上都表现了良好的逆转 VBL、DOX 和 TAX

抗药性的作用。化合物 1 和 2 在全部四个细胞株上都表现出逆转 VBL、DOX 和 TAX 抗药性的作用。尤其在 HeLa/Tax 细胞上,1 和 2 分别逆转 VBL 耐药性分别达 39.8 倍和 52.3 倍,逆转 TAX 耐药性达 4.5 倍和 17.8 倍,并完全逆转了 DOX 抗药性。与 1 相比,化合物 2 逆转 MDR 的作用更强。化合物 3 和 4 在全部 4 个 MDR 细胞株上对 VBL、DOX 和 TAX 抗药的逆转能力都比较弱,其中,仅 3 在 K562/Dox 细胞上显示出较弱的耐药逆转作用(DOX, R = 1.5; TAX, R = 1.7)。

表 2 化合物 1-4 在 5 μM 浓度下对肿瘤细胞的长春碱耐药逆转作用($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of 5 μM 1-4 on the resistance of Pgp-MDR cancer cells to vinblastine(VBL) ($n=3, \bar{x} \pm s$)

	+ 1		+ 2		+ 3		+ 4		+ VRP	
	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R
KBV1	0.22 ± 0.08	2.3	0.04 ± 0.01	12.8	0.59 ± 0.04	0.9	0.50 ± 0.05	1.0	0.11 ± 0.06	4.6
HepG2/Dox	0.26 ± 0.04	1.5	0.13 ± 0.04	2.9	0.39 ± 0.05	1.0	0.34 ± 0.08	1.1	0.09 ± 0.07	5.6
K562/Dox	0.05 ± 0.02	3.6	0.03 ± 0.05	6.0	0.21 ± 0.10	0.9	0.17 ± 0.15	1.0	0.02 ± 0.01	9.4
HeLa/Tax	0.02 ± 0.00	39.8	0.02 ± 0.00	52.3	1.00 ± 0.04	1.0	1.18 ± 0.20	0.9	0.08 ± 0.04	6.4

注:待测化合物对 VBL 的耐药逆转倍数 R = IC₅₀(VBL) / IC₅₀(VBL + 待测化合物), IC₅₀(VBL) 见表 1。

Note: R (Fold of vinblastine resistance reversed) = IC₅₀(VBL) / IC₅₀(VBL + tested compound), for IC₅₀(VBL), see Table 1.

表 3 化合物 1-4 在 5 μM 浓度下对肿瘤细胞的多柔比星耐药逆转作用 (n=3, $\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of 5 μM 1 - 4 on the resistance of Pgp-MDR cancer cells to doxorubicin(DOX) (n=3, $\bar{x} \pm s$)

	+ 1		+ 2		+ 3		+ 4		+ VRP	
	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R
KBV1	1.38 ± 0.07	3.9	0.28 ± 0.01	19.2	4.86 ± 0.32	1.1	4.97 ± 0.45	1.1	0.87 ± 0.23	6.7
HepG2/DOX	27.63 ± 15.23	2.2	3.80 ± 0.85	16.2	45.33 ± 3.54	1.4	56.61 ± 19.22	1.1	7.12 ± 1.47	8.6
K562/DOX	7.57 ± 1.65	4.4	2.20 ± 1.04	15.1	22.12 ± 1.53	1.5	27.90 ± 0.59	1.2	3.55 ± 0.87	9.4
HeLa/Tax	0.11 ± 0.09	7.3	0.10 ± 0.10	8.0	1.18 ± 0.23	0.9	1.32 ± 0.45	0.8	0.13 ± 0.06	6.1

注: 待测化合物对 DOX 的耐药逆转倍数 R = IC₅₀(DOX) / IC₅₀(DOX + 待测化合物); IC₅₀(DOX) 见表 1。

Note: R (Fold of doxorubicin resistance reversed) = IC₅₀(DOX) / IC₅₀(DOX + tested compound), for IC₅₀(DOX), see Table 1.

表 4 化合物 1-4 在 5 μM 浓度下对肿瘤细胞的紫杉醇耐药逆转作用 (n=3, $\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of 5 μM 1 - 4 on the resistance of Pgp-MDR cancer cells to paclitaxel(TAX) (n=3, $\bar{x} \pm s$)

	+ 1		+ 2		+ 3		+ 4		+ VRP	
	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R	IC ₅₀ (μM)	R
KBV1	3.33 ± 2.36	1.7	0.50 ± 0.20	11.4	5.75 ± 0.53	1.0	4.46 ± 0.82	1.3	1.25 ± 0.34	4.6
HepG2/DOX	3.10 ± 0.03	1.8	0.89 ± 0.31	6.2	4.23 ± 0.15	1.3	4.13 ± 1.57	1.3	0.74 ± 0.29	7.5
K562/DOX	0.79 ± 0.41	2.4	0.19 ± 0.12	10.0	1.10 ± 0.60	1.7	1.99 ± 0.68	1.0	0.07 ± 0.04	23.9
HeLa/Tax	0.13 ± 0.07	4.5	0.034 ± 0.020	17.8	0.47 ± 0.28	1.3	0.64 ± 0.18	1.0	0.007 ± 0.003	97.5

注: 待测化合物对 TAX 的耐药逆转倍数 R = IC₅₀(TAX) / IC₅₀(TAX + 待测化合物); IC₅₀(TAX) 见表 1。

Note: R (Fold of paclitaxel resistance reversed) = IC₅₀(TAX) / IC₅₀(TAX + tested compound), for IC₅₀(TAX), see Table 1.

3 讨论与结论

本实验从华萝藦中分离鉴定了具有通光散苷元乙(Tenacigenin B)结构类型的四种 C₂₁甙体酯类化合物 Tenacissoside H(1)、Marsdenoside B(2)、Tenacissoside A(3)和 Marsdenoside H(4),表明华萝藦与通光散在所含化学成分结构上具有一定的近似程度。

Pgp 通过水解 ATP 提供能量把细胞内的有毒成分转运至细胞外,可以减轻有毒成分对细胞的伤害。因而正常组织表达的 Pgp 起着机体护卫的作用。但 Pgp 在肿瘤细胞的过度表达,使细胞对不同结构的 Pgp 底物类抗肿瘤药物如长春碱、多柔比星和紫杉醇等都产生耐药,是癌症化疗失败的主要原因之一。逆转 MDR,使细胞对肿瘤化疗药物重新变得敏感,有助于癌症治疗取得好的疗效。我们的研究发现了草药华萝藦中存在的 C₂₁甙体去氧糖苷 1 和 2 能够有效逆转 Pgp 过表达的 MDR 细胞对长春碱、阿霉素和紫杉醇的耐药性。化合物 3 和 4 在同样条件下则表现为无作用或作用较弱。化合物 1~4 都属于 C₂₁甙体去氧糖苷,具有相同的甙体母核结构,且母核上 C-11 和 C-12 位都被酯基取代,符合通光散苷元乙酯类衍生物活性结构的基本特点^[6-8]。但从糖链组成的角度看,1 和 2 具有相同的去氧双糖链结

构,3 和 4 则具有相同的三糖链结构,并且是在两种去氧糖构成的糖链外端,增加了一个葡萄糖残基。由此推测,C-11 和 C-12 位酯基取代有助于维持通光散苷元乙酯类化合物的多药耐药逆转活性^[6-8];但在去氧糖糖链外端增加葡萄糖则有可能削弱肿瘤化疗增敏活性。换言之,中草药活性提取物或有效部位中各种成分对某一药效指标的贡献有可能存在明显差异。对有效成分的甄别是新药研发的科学基础之一。

参考文献

- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1):48-58.
- Shen XL(沈小玲), Hu YJ(胡英杰), Yu ZL(禹志领), et al. Chinese herbal Medicines as reversal agents for P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumors. *Chin J Nat Med(中国天然药物)*, 2009, 7:465-475.
- Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (中国科学院昆明植物研究所). *Flora of Yunnan*. Beijing: Science Press, 1983. Vol 3, 612.
- Shen YM(沈月毛), Hu YJ(胡英杰), Zhou QL(周茜兰), et al. Studies on the constituents of *Metaplexis hemsleyana* (1). *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 1992, 23:622-624.

(下转第 790 页)