

# 白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物的合成及抗肿瘤活性研究

戴一<sup>1,2\*</sup>, 曹殿洁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>安徽新华学院药学院, 合肥 230088; <sup>2</sup>中国科学技术大学化学系, 合肥 230036

**摘要:**白藜芦醇为天然芪类成分, 具有多样生物活性。一氧化氮作为气体信使分子, 高浓度时可以抑制肿瘤生长, 逆转肿瘤多药耐药性, 呋咱氮氧化物即为一类较稳定的一氧化氮供体。本实验合成白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物, 并通过 MTT 法测定其抗肿瘤活性。结果白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物抗肿瘤活性比单纯的白藜芦醇、呋咱氮氧化物及白藜芦醇与呋咱氮氧化物的混合物具有更好的抗癌活性, 结果表明白藜芦醇与呋咱氮氧化物的偶联物表现出显著的协同效应。

**关键词:**白藜芦醇; 呋咱氮氧化物; 一氧化氮供体; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0502-04

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.021

## Synthesis and anti-tumor activity of conjugate of resveratrol and furoxans

DAI Yi<sup>1,2\*</sup>, CAO Dian-jie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology College, Anhui Xinhua University, Hefei 230088, China; <sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei, 230026, China

**Abstract:** Resveratrol, one of naturally occurring stilbenoids, has various biological activities while nitric oxide, a gaseous molecular messenger, can inhibit tumor growth and reverse multidrug resistance of cancer cell at high concentration. As an important class of NO donors, Furoxans are thermally stable compounds. The present investigation synthesized conjugate of resveratrol and furoxans, and tested anti-tumor activity of these compounds by MTT assay. The results showed anti-tumor activity of conjugate of resveratrol and furoxans was more potent than those of resveratrol, furoxans or mixture of resveratrol and furoxans. It is evident that conjugate of resveratrol and furoxans has significant synergistic effects.

**Key words:** resveratrol; furoxans; NO donor; anti-tumor activity

白藜芦醇为一多羟基芪类化合物, 存在于多种植物中如葡萄、花生及中药虎杖等<sup>[1]</sup>。白藜芦醇具有多种药理活性如心脏保护<sup>[2]</sup>、神经保护<sup>[3,4]</sup>及抗抑郁作用<sup>[5]</sup>等。近年来, 白藜芦醇作为抗癌成分引起了广泛地关注。白藜芦醇通过作用多靶点如 P53、Bax/Bcl-2、Caspase-9、PARP、Cyclins、cdks、MAPK、PI3K/AKT、JAK、NF- $\kappa$ B、AP-1、MMP-2、VEGF 等抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡及阻滞肿瘤转移等<sup>[6,7]</sup>。一氧化氮(NO)是一气体信使分子, 生物活性多样<sup>[8]</sup>, 高剂量 NO(微摩尔浓度)可以抑制肿瘤生长<sup>[9]</sup>及逆转肿瘤的多药耐药性<sup>[10]</sup>。鉴于 NO 为活泼性气体且不易操作, 因此 NO 的使用多为

一些能在体内产生 NO 的化合物即 NO 供体, 呋咱氮氧化物即是一类 NO 供体, 且对酸碱比较稳定, 在体内巯基化合物的作用下释放出 NO。多药联合是抗肿瘤的有效方法<sup>[11]</sup>。本实验设计合成了白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物, 并进一步采用 MTT 法评价了设计化合物的抗肿瘤活性, 为白藜芦醇与 NO 供体的一体化研究开发提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

BruckerACF-300 型核磁共振仪(美国布鲁克科技有限公司), API3000 质谱仪(美国 PE 公司), bio-rad mode 680 酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司), 白藜芦醇(纯度大约 98%)即化合物 1, 购于大连美仑生物技术有限公司。DEME 培养基购于 hyclone 公司, 胎牛血清 FBS 购于 lonsera 公司, MTT 购置于碧云天公司, 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2018-03-05 接受日期: 2018-07-02

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2016A301); 安徽新华学院自然科学基金(2014zr016); 安徽新华学院制药工程教学团队建设(2017jxtdx08)

\* 通信作者 E-mail: daiyiii@163.com

## 1.2 受试细胞株

人肝癌 HepG2 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞及人肺癌 A549 细胞来自于 ATCC(美国)。

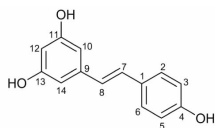


图1 白藜芦醇(化合物1)结构

Fig. 1 The structure of resveratrol(compound 1)

## 1.3 结构修饰路线

以肉桂醇为底物,首先合成呋咱氮氧化物2,再与丁二酸酐反应引入羧基制得化合物3,化合物3在 EDCI, DMAP 条件下与白藜芦醇酚羟基成酯制备出白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物(化合物4),见图2。产物经 NMR、MS 确认结构。

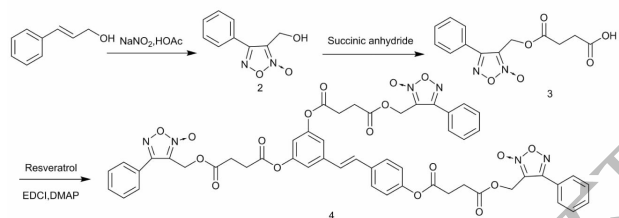


图2 白藜芦醇呋咱氮氧化物偶联物合成路线图

Fig. 2 The synthesis of conjugate of resveratrol and furoxans.

## 1.4 化学合成

### 1.4.1 化合物2的合成<sup>[12]</sup>

取肉桂醇(5.37 g, 40 mmol)溶于8 mL 冰乙酸中,往其中滴加120 mmol NaNO<sub>2</sub>饱和水溶液10 mL,温度不超过70 ℃,滴加完毕,室温继续搅拌1 h,加水100 mL,用乙醚萃取3次,乙醚层合并,用饱和食盐水洗涤3次,无水硫酸钠干燥,过滤,硅胶柱层析,以石油醚:乙酸乙酯(4:1)洗脱,得浅黄色固体产物,收率为67%。

### 1.4.2 化合物3的合成

取化合物2(384 mg, 2 mmol)溶于20 mL 二氯甲烷中,加丁二酸酐(300 mg, 3 mmol), DMAP(22.9 mg, 0.2 mmol),室温反应,TLC 跟踪,反应完毕,稀盐酸洗涤,冰水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩至干,得灰白色固体,收率为86%。

### 1.4.3 化合物4的合成

取白藜芦醇(228 mg, 1 mmol),化合物3(1.168 g, 4 mmol), EDCI(1.712 g, 9 mmol), DMAP(741 mg, 6 mmol)溶于20 mL 丙酮中,室温搅拌反应,TLC

跟踪,反应完毕,减压旋蒸除去溶剂,以乙酸乙酯溶解,分别以稀盐酸、饱和碳酸氢钠溶液及饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,TLC 分析(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=1:1,主斑点 R<sub>f</sub>=0.3),过滤,粗产物过硅胶柱,以石油醚:乙酸乙酯=2:1洗脱,得白色固体,收率为64%。

## 1.5 白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物体外 NO 释放<sup>[13]</sup>

### 1.5.1 NO 标准曲线绘制

取96孔板,各孔中分别加入稀释好的不同浓度 NaNO<sub>2</sub> 标准溶液(250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 μM) 50 μL,复孔3个,再分别加入 Griess 试剂(含1.0%磺胺,5.0%磷酸,0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐水溶液)孵育10 min 后于540 nm 测定吸光度,绘制标准曲线,计算回归方程。

### 1.5.2 白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物体外 NO 释放

化合物2、3、4分别溶于PBS(50 mM, pH7.4)/DMSO(1:1)混合溶液均制成500 μM 浓度,加入L-半胱氨酸(5 mM)溶液后于37 ℃避光孵育24 h。取样点样品按照1.5.1法置96孔板后加入 Griess 试剂(含1.0%磺胺,5.0%磷酸,0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐水溶液)孵育10 min 后于540 nm 测定吸光度,计算24 h NO 的释放浓度。

## 1.6 白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物抗肿瘤活性研究

取对数生长期细胞培养于96孔板中,每孔加培养基100 μL(约含3000个细胞),于37 ℃,5% CO<sub>2</sub>的全湿条件下培养,培养12 h后给不同浓度的待测化合物,平行3个孔,阴性对照组加给药组等体积的培养基,以 DEME 培养基作为空白对照组,给药后继续培养48 h,弃去培养液,每孔加5 mg/mL 的 MTT 溶液20 μL,继续孵育4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,震荡10 min,酶标仪570 nm 测定吸光度 OD 值,计算抑制率及 IC<sub>50</sub> 值。

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物表征

化合物2 浅黄色固体,TLC 分析 R<sub>f</sub> 约0.6(展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1); <sup>1</sup>H NMR(300 MHz, Chloroform-d) δ 7.91 ~ 7.79 (m, 2H), 7.66 ~ 7.50 (m, 3H), 4.77 (s, 2H), 2.64 (brs, 1H), 与文献一致<sup>[11]</sup>。

**化合物 3** 为白色固体, TLC 分析  $R_f$  约 0.2 (展开剂为石油醚: 乙酸乙酯 = 2: 1);  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  7.79 ~ 7.66 (m, 2H), 7.67 ~ 7.47 (m, 3H), 5.19 (s, 2H), 2.77 ~ 2.60 (m, 4H), 与化合物 **2** 比较分析, 结构正确。

**化合物 4** 白色固体, TLC 分析  $R_f$  约 0.3 (展开剂为石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 1); mp. 119 ~ 121  $^{\circ}\text{C}$ ; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 231 (4.06), 274 (3.78), 299 (3.80), 311 (3.79) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3010, 2821, 1751, 1684, 1523, 1495, 1397, 1335, 1187, 1050, 913, 868, 790, 659  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.97-7.87 (6H, m, Ph-H(6)), 7.79 ~ 7.60 (11H, m, Ph-H(9, H-2, 6)), 7.46 ~ 7.17 (6H, m, H-3, 5, 8, 10, 12, 14), 6.93 (1H, d, H-7), 5.38 (6H, s, O-CH $_2$ -), 3.08 ~ 2.95 (6H, m, -CH $_2$ -CH $_2$ -), 2.94 ~ 2.83 (6H, m, -CH $_2$ -CH $_2$ -);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  171.4 (CO), 170.4 (CO), 157.3 (C = N-O), 151.6 (C-11, 13), 150.8 (C-4), 139.7 (C-9), 134.6 (C-1), 131.3 (Ph-C), 129.7 (C-2, 6), 129.4 (Ph-C), 127.8 (Ph-C), 127.7 (C-7), 127.0 (C-8), 126.3 (Ph-C), 122.0 (C-3, 5), 117.0 (C-10, 14), 114.6 (C-12), 111.7 (C = N = O), 54.5 (-CH $_2$ -O), 28.8 (-CH $_2$ -CH $_2$ -), 28.6 (-CH $_2$ -CH $_2$ -);  $m/z$  (ESI-MS) 1068.9 [M + H $_2$ O] $^+$ , 1073.7 [M + Na] $^+$ , 综合分析为预期化合物 **4**。

## 2.2 白藜芦醇与呔咱氮氧化物偶联物体外 NO 释放

### 2.2.1 NO 标准曲线绘制

采用 Griess 法测定不同浓度 NaNO $_2$  标准溶液吸光度, 绘制标准曲线, 计算回归方程为  $y = 0.0043x + 0.0465$ ,  $r = 0.9995$ 。表明 NaNO $_2$  在 250 ~ 3.91  $\mu\text{M}$  浓度范围内线性关系良好。

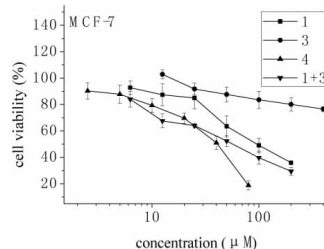
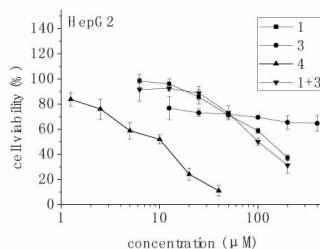
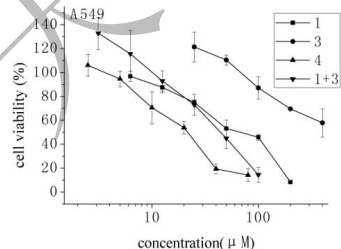


图 4 白藜芦醇呔咱氮氧化物偶联物及相关化合物 MTT 实验结果

Fig. 4 The results of MTT for conjugate of resveratrol and furoxans and related compounds

### 2.2.2 白藜芦醇与呔咱氮氧化物偶联物体外 NO 释放

考察白藜芦醇偶联物 **4** 及中间体化合物 **2**、**3** 的 NO 的释放情况, 结果见图 3, 在过量半胱氨酸存在下, 24 h 内化合物 **4** 释放较高浓度的 NO, 达到 70.7  $\mu\text{M}$ , 为化合物 **3** 释放的近 3 倍, 为其抗癌活性的发挥奠定了基础。

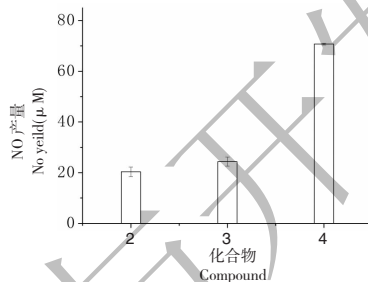


图 3 白藜芦醇呔咱氮氧化物偶联物及相关中间体的 NO 释放研究

Fig. 3 The releasing of NO of conjugate of resveratrol and furoxans and related intermediates

## 2.3 白藜芦醇与呔咱氮氧化物偶联物抗肿瘤活性研究

对化合物 **1**、**3** 和 **4** 及由化合物 **1** 和 **3** 按 1: 3 摩尔比组成的混合物进行 MTT 抗癌活性实验, 结果如图 4 所示。对 A549 细胞、HepG2 细胞及 MCF-7 细胞, 化合物 **4** 均表现出较强的肿瘤抑制活性, IC $_{50}$  值分别为 21.65、10.44 和 41.40  $\mu\text{M}$ , 相比于母体化合物 **1** (对同样细胞 IC $_{50}$  值分别为 67.48、133.15 和 95.01  $\mu\text{M}$ )、化合物 **1** + **3** 混合物 (对同样细胞 IC $_{50}$  值分别为 43.94、100.93 和 57.74  $\mu\text{M}$ ) 及化合物 **3** (对同样细胞 IC $_{50}$  值大于 400  $\mu\text{M}$ ) 活性显著提高, 可见, 白藜芦醇与呔咱氮氧化物进行偶联, 具有较强的协同效果。因此白藜芦醇进行 NO 供体修饰是发现先导化合物的一条有效途径。

### 3 结论

白藜芦醇为一多功能植物成分,尤其是在抗癌活性领域研究较为活跃;NO 为一重要的气体信使分子,与肿瘤的发生发展密不可分,而高浓度 NO 可以抑制肿瘤的生长,本实验通过把白藜芦醇与 NO 供体呋喃氮氧化物进行共价结合制备了化合物 4,该偶联物对三种肿瘤细胞 A549、HepG2 及 MCF-7 均表现出较强肿瘤抑制活性,IC<sub>50</sub> 值分别为 21.65、10.44 和 41.40 μM,相比于母体化合物肿瘤抑制活性有了明显的提高,为白藜芦醇的 NO 供体化开发提供了参考。

### 参考文献

- 1 Hu Y, Wang S, Wu X, et al. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149: 601-612.
- 2 Lamont KT, Somers S, Lacerda L, et al. Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanisms involved in resveratrol-and melatonin induced cardioprotection[J]. *J Pineal Res*, 2011, 50: 374-380.
- 3 Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, et al. Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2012, 51: 515-525.
- 4 Tang HB. Neuroprotective role of resveratrol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats is associated with activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 212-216.

- 5 Hurley LL, Akinfiresoye L, Kalejaiye O, et al. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 268: 1-7.
- 6 Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2011, 1215: 1-8.
- 7 Liu BL, Zhang X, Zhang W, et al. New enlightenment of French paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6: 1833-1836.
- 8 Carpenter AW, Schoenfisch MH. Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 3742-3752.
- 9 Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 711-721.
- 10 Riganti C, Miraglia E, Viarisio D, et al. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 516-525.
- 11 Kiberstis PA, Travis J. Stocking oncology's medicine cabinet[J]. *Science*, 2017, 355: 1142-1143.
- 12 Gasco AM, Fruttero R, Sorba G, et al. Unsymmetrically substituted furoxans, XIII. Phenylfuroxancarbaldehydes and related compounds[J]. *Eur J Org Chem*, 1991, 1991: 1211-1213.
- 13 Schiefer IT, VandeVrede L, Fa M, et al. Furoxans(1,2,5-oxadiazole-N-oxides) as novel NO mimetic neuroprotective and procognitive agents[J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 3076-3087.

(上接第 449 页)

- 15 Wang HP, Xie ZP, Kuang Y, et al. Nitrogen containing chemical constituents from marine *Streptomyces* sp. B170167 and their cytotoxic activity[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1557-1561.
- 16 Kim KH, Martin Y, Otis E, et al. Inhibition of iodine-125 labeled ristocetin binding to *Micrococcus luteus* cells by the peptides related to bacterial cell wall mucopeptide precursors: quantitative structure-activity relationships[J]. *J Med Chem*, 1989, 32(1): 84-93.
- 17 Gong DL, Wang XJ, Xiang ZD, et al. Diphenyl etheric metab-

olites from *Streptomyces* sp. neu 50[J]. *J Antibiot*, 2011, 64: 465-467.

- 18 Dao PTA, Quan TL, Mai TT. Antioxidant constituents from the stem of *Tetragium erusbescense* Planch. (Vitaceae)[J]. *Nat Prod Sci*, 2014, 20: 22-28.
- 19 Xie Q, Wang WJ, Li GQ. Chemical constituents from the leaves of *Hunteria zeylanica*[J]. *J Jinan Univ: Nat Sci*(暨南大学学报: 自科版), 2013, 34: 121-124.
- 20 Sun HL, Ding G, Song B, et al. Investigation of liposoluble constituents from *Pothos chinensis* (Raf.) Merr [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50: 1186-1189.