

丁烯酸内酯二萜衍生物的制备及抗肿瘤活性研究

左笑菲, 杨帆, 张晓梅, 陈凌云*, 赵庆*

云南中医药大学中药学院, 昆明 650500

摘要: 采用姜科二萜类成分 coronarin E (1)、hedychenone (2) 和滇姜花素 A (3) 进行衍生化反应, 制备了三个具有丁烯酸内酯结构单元的二萜衍生物 4、5 和 7。将部分化合物进行体外细胞毒活性测试, 结果表明化合物 5 和 7 对五种肿瘤细胞株均有显著的细胞毒活性, 它们对肝癌细胞株 SMMC-7721、肺癌细胞株 A-549、乳腺癌细胞株 MCF-7 和结肠癌细胞株 SW480 的抑制活性均超过阳性对照顺铂。对化合物 4、5 和 7 进行小鼠体内抗肿瘤活性测试, 结果表明三个化合物均对小鼠体内肿瘤 H22 和 S₁₈₀ 均有很好的抑制作用, 其中化合物 4 对 H22 肿瘤的抑制活性最高, 其对 H22 肿瘤的抑制活性为 47.44%, 接近阳性对照异环磷酰胺。化合物 4 和 7 对 S₁₈₀ 肿瘤的抑制活性分别为 60.16% 和 45.20%, 均超过阳性对照异环磷酰胺。

关键词: 姜科; 二萜; 丁烯酸内酯; 抗肿瘤; 细胞毒

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)7-1200-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.7.015

Study on preparation of butenolide diterpene derivatives and their antitumor activity

ZUO Xiao-fei, YANG Fan, ZHANG Xiao-mei, CHEN Ling-yun*, ZHAO Qing*

¹ Faculty of Pharmacy, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

Abstract: Diterpenes were widely found in Zingiberaceae family, and some of them showed various bioactivities. Our previous researches on *Hedychium* genus resulted in obtaining series of diterpenes with significant cytotoxic or antitumor activities. Three butenolide diterpene derivatives 4, 5, and 7 were synthesized from three Zingiberaceae diterpenes, coronarin E (1), hedychenone (2) and yunnan coronarin A (3), respectively. Compound 1 underwent photooxygenation reaction in CH₂Cl₂ to obtain 4, in which tetraphenyl porphyrin was served as photosensitizer and in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine. Similarly, Compound 2 underwent photooxygenation to get 5. Compound 3 was benzoylated to obtain 6, which was further photooxygenated to get 7. Compounds 1, 2, 5, 6 and 7 were subjected to *in vitro* cytotoxicity bioassays, the result indicates that compounds 5 and 7 have significant cytotoxicity against five tumor cell lines, including human liver cancer cells SMMC-7721, human lung cancer cells A-549, human breast cancer cells MCF-7, human colon cancer cells SW480 and human leukemia cells HL-60, and their inhibitory activities against SMMC-7721, A-549, MCF-7 and SW480 cell lines were higher than that of cisplatin (positive control). Compounds 4, 5 and 7 were tested for *in vivo* antitumor activity in mice. As a result, the three compounds showed significant inhibitory effect on H22 and S₁₈₀ tumor in mice. Compounds 4 had the strongest inhibitory effect, and its inhibitory rate on H22 was 47.44%, which was close to that of ifosfamide (positive control). Inhibitory rates of 4 and 7 on S₁₈₀ were 60.16% and 45.20%, which were higher than that of ifosfamide.

Key words: Zingiberaceae; diterpene; butenolide; anticancer; cytotoxicity

二萜成分在姜科姜花属植物中广泛存在, 其中

部分二萜具有显著的细胞毒、抗肿瘤等生物活性^[1-3]。本课题组对该属植物二萜进行了系统的研究, 从滇姜花、圆瓣姜花和毛姜花^[4-7]中分离得到一些对多种肿瘤细胞具有显著体外细胞毒活性的二萜成分。对滇姜花的粗提物、二萜成分滇姜花素 A 和 hedychenone 进行了小鼠体内抗肿瘤活性测试, 结果

收稿日期: 2019-11-04 接受日期: 2020-05-28

基金项目: 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项 (2017FF116(-011)); 国家自然科学基金 (81460533, 81060262, 21662048)

* 通信作者 Tel: 86-013577065608; E-mail: tempzhao@126.com, 498507628@qq.com

表明它们均能显著性抑制小鼠体内移植性肿瘤 H22 的生长,其中滇姜花素 A 对 H22 肿瘤生长抑制率较高,为 54.27%^[4]。进一步的研究表明,化合物滇姜花素 C、7-hydroxy-hedychenone 对小鼠体内移植性肿瘤 H22 的生长也具有显著的抑制作用^[8]。前期工作还表明,具有丁烯酸内酯结构的二萜成分对多种肿瘤细胞大多具有较高的体外细胞毒活性。例如呋喃二萜 coronarin E 没有细胞毒活性;但如果将 coronarin E 氧化,得到的一个具有 γ -羟基丁烯酸内酯结构单元的二萜(4,图 1)对五种肿瘤细胞株具有不同程度的细胞毒活性^[6]。据此初步推测:具有呋喃型二萜成分呋喃环转化为具有丁烯酸内酯结构的衍生物,有可能提高其细胞毒活性。虽然呋喃二萜转化为丁烯酸内酯型二萜通常可以提高其体外细胞毒活性,但其体内抗肿瘤活性是否也同时提高,需要进一步探讨。因此,我们的后续工作以二萜 coronarin E、hedychenone 和滇姜花素 A^[9]为原料进行结构改造,制备了三个具有 γ -羟基丁烯酸内酯结构的衍生物,并对这三个产物进行了对小鼠体内移植性肿瘤 H22 和 S₁₈₀ 的抗肿瘤活性测试。

1 材料与方法

1.1 材料

核磁共振氢谱、碳谱由 BrukerAM-400 超导型核磁共振仪测定。柱色谱硅胶(300~400目)和硅胶 H(青岛海洋化工厂)。薄层色谱硅胶 G 板(青岛海洋化工厂),薄层显色的常规方法为:5% 硫酸-乙醇溶液在 150 °C 下烘烤显色明显。

二萜成分 coronarin E(1)、hedychenone(2)、滇姜花素 A(3)均由云南中医药大学赵庆课题组提供。

H22 细胞株(江阴齐式生物科技有限公司)。S₁₈₀ 细胞株(昆明动物研究所细胞库)。清洁级 ICR 小鼠共 100 只,雌雄各半,体重 18~21 g,由昆明医科大学实验动物中心提供(编号 SCXK(滇)K2015-0002)。白血病细胞株 HL-60、肝癌细胞株 SMMC-7721、肺癌细胞株 A-549、乳腺癌细胞株 MCF-7 和结肠癌细胞株 SW480 均由中国科学院昆明植物研究所分析测试中心提供。

1.2 三个二萜成分的结构改造

1.2.1 Coronarin E(1)的光敏氧化反应制备化合物 4

Coronarin E(1)光敏氧化制备化合物 4 参见文献^[10]:取 1.00 g coronarin E(1),溶于 250 mL 干燥的二氯甲烷中,加入 5 mL *N,N*-二异丙基乙胺,加入

20 mg 四苯基卟啉(TPP),通入氧气并搅拌,在 -45 °C 及 LED 灯照射下反应 6 h,TLC 检测原料反应完全。蒸干溶剂,残余物经硅胶柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯(4:1)洗脱,得到化合物 4^[10](0.81 g,白色粉末,产率 73%),其化学结构如图 1 所示。

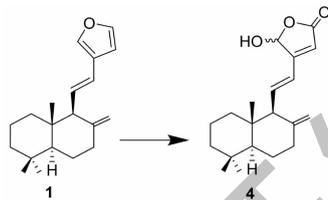


图 1 化合物 1 的光敏氧化

Fig. 1 Photosensitized oxidation of compound 1

1.2.2 Hedychenone(2)的光敏氧化反应制备化合物 5

取 hedychenone(2)1.00 g,溶于 250 mL 干燥的二氯甲烷中,加入 5 mL *N,N*-二异丙基乙胺,加入 20 mg 四苯基卟啉(TPP),通入氧气并搅拌,在 -45 °C 及 LED 灯照射下反应 6 h,TLC 检测原料反应完全。蒸干溶剂,残余物经硅胶柱色谱分离,石油醚-乙酸乙酯 2:1 洗脱,得到化合物 5(0.74 g,白色粉末,产率为 67%)。化合物 5 的¹H NMR 和¹³C NMR 数据与姜科植物草果药(*Hedychium spicatum*)中发现的二萜成分 spicatanol^[11]一致,由此确定化合物 5 为 spicatanol。

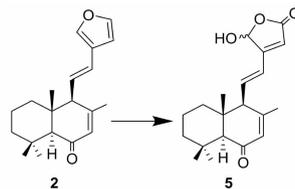


图 2 化合物 2 的光敏氧化

Fig. 2 Photosensitized oxidation of compound 2

1.2.3 滇姜花素 A(3)的酰化与光敏氧化反应制备化合物 7

称取滇姜花素 A(3)2.30 g,溶解于 15 g 吡啶,缓慢加入苯甲酰氯 10 g,在 100 °C 下加热 3 h,在常温下再静置两天。将反应液倾入 200 mL 5% 碳酸钠溶液中,搅拌 2 h。用乙酸乙酯萃取两次(200 mL × 2),萃取液合并后,用 10% 磷酸二氢钠水溶液洗涤三次(50 mL × 3)。乙酸乙酯层用无水 Na₂SO₄ 干燥 24 h,浓缩回收。用硅胶柱色谱分离,石油醚:乙酸乙酯(60:1→10:1)洗脱。得化合物 6(1.40 g,产率

40%)。

称取化合物 **6** 1.00 g, 溶于 250 mL 无水二氯甲烷中, 加入 5 mL *N,N*-二异丙基乙胺, 10 mg 四苯基吡啶(TPP), 通入氧气并搅拌。在 45 °C 及 LED 灯照射下反应 7 h, TLC 检测原料反应完全。反应液浓缩回收, 残余物用二氯甲烷溶解, 经硅胶柱色谱分离, 石油醚-乙酸乙酯(2:1)洗脱, 得到化合物 **7** (0.47 g, 产率 31.5%)。 **7** 为白色无定形粉末, 无明确熔点。根据反应机理, **7** 的结构式应如图 3 所示, 该结构与高分辨质谱确定的分子式 $C_{27}H_{32}O_5$ 相吻合, 也与 NMR 数据相符。 **7** 与文献报道的二萜溴姜花素 C^[12] 结构相似, 差别仅在于: **7** 的 C-6 位为 β -羟基取代, 而溴姜花素 C 的 C-6 位为 β -苯甲酰氧基取代。因此, **7** 的二萜结构单元 ¹H NMR、¹³C NMR 数据与溴姜花素 C 很相似, 将二者的 NMR 数据对比, 即可对 **7** 的二萜结构单元的 NMR 数据进行归属。再采用软件 Chemdraw 对 **7** 的苯甲酰氧基部分的 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 进行预测, 根据预测的结果与实测结果对照, 可对分子中的甲酰氧基结构单元的 NMR 数据进行归属。

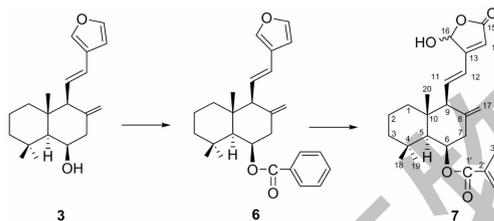


图 3 化合物 **7** 的制备

Fig. 3 Preparation of compound **7**

1.3 化合物 **1**、**2**、**5**、**6** 和 **7** 的体外细胞毒活性测试

采用 MTT 法^[13,14], 测定化合物 **1**、**2**、**5**、**6** 和 **7** 对五个肿瘤细胞株的体外细胞毒活性。阳性对照采用顺铂。

1.4 小鼠体内抗肿瘤实验

清洁级 ICR 小鼠共 100 只, 雌雄各半, 体重 18 ~ 21 g。每次实验采用 50 只小鼠, 将小鼠随机分为 5 组, 分别为阴性对照组、阳性对照组、化合物 **4** 组、化合物 **5** 组和化合物 **7** 组, 每组 10 只小鼠, 雌雄各半。小鼠在适应性喂养 2 天后, 于左前肢皮下接种新鲜的 H22 (或者 S₁₈₀) 肿瘤细胞悬液 (0.1 mL/鼠, 1×10^6 细胞)。在接种肿瘤细胞后的第 2 日开始按分组给药。阴性对照组腹腔注射给予 DMSO, 阳性对照组给予异环磷酰胺, 其它各组给予相应的待测

物。每天给药 1 次, 于给药的第 7 天将动物脱臼处死, 完整剥离肿瘤并在电子称称肿瘤重量及肿瘤剥离后的动物体重。比较分析各组肿瘤重量及瘤重抑制率。

瘤重抑制率 = (阴性对照组肿瘤平均重量(g) - 样品组肿瘤平均重量(g)) / 阴性对照组平均肿瘤重量(g) × 100%

2 结果与分析

2.1 新化合物的波谱数据

化合物 **7** HR-ESI-MS: m/z 475.188 4 [M + K]⁺ (calcd for $C_{27}H_{32}O_5K^+$, 475.188 7); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.04 (3H, s, H-18), 1.25 (3H, s, H-19), 1.38 (3H, s, H-20), 4.60/4.69 (1H, H-17a), 5.77 (1H, s, H-17b), 4.62 (1H, s, H-6), 5.88 (1H, s, H-16), 6.29/6.68 (1H, s, H-14), 6.36 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-12), 6.68 ~ 6.74 (1H, m, H-11), 7.43 ~ 7.47 (2H, m, H-4'), 7.55 ~ 7.58 (1H, m, H-5'), 8.02 ~ 8.05 (2H, m, H-3'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.2 (t, C-1), 19.1 (t, C-2), 43.3/43.4 (t, C-3), 34.4 (s, C-4), 55.8 (d, C-5), 71.1 (d, C-6), 44.0 (t, C-7), 144.2 (s, C-8), 62.3 (d, C-9), 40.5/40.4 (s, C-10), 142.9 (d, C-11), 115.9 (d, C-12), 144.0 (s, C-13), 142.8 (d, C-14), 171.2 (s, C-15), 97.6/97.7 (d, C-16), 111.7/112.1 (t, C-17), 33.4 (q, C-18), 23.6 (q, C-19), 18.1/18.2 (q, C-20), 166.2 (s, C-1'), 130.5 (s, C-2'), 129.6 (d, C-3'), 128.5 (d, C-4'), 133.0 (d, C-5')。

2.2 化合物 **1**、**2**、**5**、**6** 和 **7** 对五种肿瘤细胞株的细胞毒活性

采用 MTT 法^[13,14] 测定化合物 **1**、**2**、**5**、**6** 和 **7** 对五种人肿瘤细胞株的细胞毒活性, 测试结果见表 1。化合物 **5** 和 **7** 对五种肿瘤细胞株均具有显著的细胞毒活性, 这两个化合物对肝癌细胞株 SMMC-7721、肺癌细胞株 A-549、乳腺癌细胞株 MCF-7 和结肠癌细胞株 SW480 的抑制活性均超过阳性对照顺铂。此外, 我们的前期研究工作已表明, 化合物 **4** 对五种肿瘤细胞株亦具有不同程度的细胞毒活性^[6]。

2.3 化合物 **4**、**5** 及 **7** 对小鼠体内 H22 肿瘤细胞生长的抑制活性

体内抗肿瘤实验结果见表 2 和图 4。小鼠的体重, 瘤重均数采用 *t* 检验进行统计分析。

2.4 化合物 **4**、**5** 及 **7** 对小鼠体内 S₁₈₀ 肿瘤细胞生长的抑制活性

体内抗肿瘤实验研究结果见表 3 和图 5。小鼠

的体重,瘤重均数采用 t 检验进行统计分析。

表1 化合物 1、2、5、6 和 7 对五种人肿瘤细胞的半抑制浓度 IC_{50}

Table 1 The IC_{50} values of compounds 1, 2, 5, 6 and 7 on five human cancer cell lines (μM)

化合物 Compound	细胞株 Strain				
	白血病	肝癌	肺癌	乳腺癌	结肠癌
	HL-60	SMMC-7721	A-549	MCF-7	SW480
1	>40	>40	>40	>40	>40
2	>40	>40	>40	>40	>40
5	4.74	4.97	3.15	8.00	8.60
6	>40	>40	>40	>40	>40
7	3.48	2.19	2.19	6.19	4.91
顺铂 ^a Cisplatin ^a	1.05	6.76	6.01	15.38	16.31

注:^a 阳性对照。

Note:^a Positive control.

表2 小鼠体内抗 H22 肿瘤实验研究结果

Table 2 Results of the *in vivo* anticancer activity against H22 tumor in mice

组别 Group	动物数 Mice No.	给药剂量 Dose (mg/kg)	小鼠重量 Mouse body weight (g)	肿瘤重量 Tumor weight (g)	抑制率 Inhibition ratio (%)
阴性对照 Negative control	10	25	19.40 ± 0.49	1.22 ± 0.45	0
异环磷酰胺 Ifosfamide	10	25	19.25 ± 0.64	0.59 ± 0.20 **	51.69
7	10	25	19.35 ± 0.79	0.79 ± 0.28 *	35.45
4	10	25	19.23 ± 0.85	0.64 ± 0.13 **	47.44
5	10	25	19.49 ± 0.73	0.84 ± 0.17 *	30.91

注:与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, * $P < 0.05$; Compared with the negative control group, ** $P < 0.01$.



图4 化合物 4、5、7 和异环磷酰胺对 H22 荷瘤鼠肿瘤的影响

Fig. 4 Effects of the compounds 4, 5, 7, and Ifosfamide on H22 tumor in tumor-bearing mice

对小鼠体内移植性肿瘤 H22 和 S_{180} 抑制活性研究表明, 化合物 4、5 及 7 均显示了明显的体内抑瘤活性, 其中 4 对 H22 体内抑瘤活性较强, 抑制

率接近阳性对照药物异环磷酰胺。化合物 4、7 对小鼠肉瘤细胞 S_{180} 的体内抑瘤活性较强, 抑制率均超过阳性对照药物异环磷酰胺。

表 3 小鼠体内抗 S₁₈₀ 肿瘤实验研究结果Table 3 Results of the *in vivo* anticancer activity against S₁₈₀ tumor in mice

组别 Group	动物数 Mice No	给药剂量 Dose (mg/kg)	小鼠重量 Mouse body weight (g)	肿瘤重量 Tumor weight (g)	抑制率 Inhibition ratio (%)
阴性对照 Negative control	10	25	19.04 ± 1.01	0.94 ± 0.28	0
异环磷酰胺 Ifosfamide	10	25	19.23 ± 0.98	0.53 ± 0.21 **	43.47
7	10	25	18.96 ± 0.65	0.52 ± 0.28 **	45.20
4	10	25	19.08 ± 0.38	0.38 ± 0.16 ***	60.16
5	10	25	19.69 ± 0.63	0.66 ± 0.18 **	30.08

注:与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; 与阴性对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the negative control group, ** $P < 0.01$; Compared with the negative control group, *** $P < 0.001$.

图 5 化合物 4、5、7 和异环磷酰胺对 S₁₈₀ 荷瘤鼠肿瘤的影响Fig. 5 Effects of the compounds 4, 5, 7 and Ifosfamide on S₁₈₀ tumor in tumor-bearing mice

3 讨论

采用三个姜科二萜成分 **1**、**2** 和 **3** 经结构改造, 得到的三个具有 γ -羟基丁烯酸内酯结构的衍生物 **4**、**5** 和 **7**, 它们不仅对五种人类肿瘤细胞株有很好的体外细胞毒活性, 而且对小鼠体内移植性肿瘤 H22 和 S₁₈₀ 的生长均具有显著的抑制作用。呋喃型二萜 **1** 和 **2** 均未显示细胞毒活性, 而它们在氧化后得到的 γ -羟基丁烯酸内酯型二萜 **4**^[6] 和 **5** 均具有显著的细胞毒活性。在前期工作中, 二萜 coronarin E (**1**) 对小鼠体内移植性肿瘤 H22 未显示抗肿瘤活性^[8]; 但是其氧化后得到的化合物 **4**, 对小鼠体内移植性肿瘤 H22 和 S₁₈₀ 生长的抑制作用较强。化合物 **5** 和 **7** 的抗肿瘤活性也较强。这说明, 将姜科的二萜类成分改造为具有 γ -羟基丁烯酸内酯结构的衍生物, 有可能提高其抗肿瘤活性。从具有丁烯酸内酯结构单元的二萜成分中寻找有苗头的抗肿瘤活性成分或先

导化合物, 可作为未来抗肿瘤药物的一个研究方向。

参考文献

- 1 Ningombam S, Takehiro T, Abdelsamed IE, et al. Kaemgalangol A; unusual seco-isopimarane diterpenoid from aromatic ginger *Kaempferia galanga* [J]. *Fitoterapia*, 2018, 129:47-53.
- 2 Zou QY, Wu HF, Tang YL, et al. A new labdane diterpene from the rhizomes of *Alpinia officinarum* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(1):1-6.
- 3 Kiem PV, Thuy NTK, Anh HLT, et al. Chemical constituents of the rhizomes of *Hedychium coronarium* and their inhibitory effect on the pro-inflammatory cytokines production LPS-stimulated in bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21:7460-7465.
- 4 Zhao Q, He XQ, Hao XJ, et al. Anticancer effect of diterpenes from *Hedychium yunnanense* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2010, 22:395-397.