

木香烯内酯的结构修饰及活性研究

娄朝晖^{1*}, 石新波²(1.河南科技大学第一附属医院, 河南 洛阳 471003; 2.栾川县食品药品监督管理局, 河南 栾川 471500)

中图分类号 R285;R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2521-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.09

摘要 目的:研究木香烯内酯的结构修饰与其抗肿瘤活性。方法:以Michael加成法分别在木香烯内酯的C13位引入4-甲基哌啶和3-羧基吡咯烷,用MTT法检测两种化合物抗肿瘤活性,倒置显微镜观察细胞的形态及数量。结果:本研究成功合成了两种新的化合物;体外试验证明,二者对人慢性髓性白血病细胞K562有明显抑制作用,可见K562细胞分散生长、数量明显减少,且呈剂量依赖性。结论:对木香烯内酯进行结构修饰是寻找新的抗肿瘤药物的有效途径,可为今后的进一步研究奠定理论基础。

关键词 木香;木香烯内酯;结构修饰;抗肿瘤活性

Structural Modification of Costunolide and Study on Its Activity

LOU Chao-xuan¹, SHI Xin-bo²(1.The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Henan Luoyang 471003, China; 2. Luanchuan County Institute for Food and Drug Control, Henan Luanchuan 471500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the structural modification of costunolide and its anti-tumor activity. METHODS: Tetramethylpiperidine and 3-pyrrolidinol were led into α -methyl-ene- γ -lactone part of costunolide with Michael addition. The anti-tumor activities of two derivatives were tested by MTT assay. The morphology and number of tumor cells were observed under inverted microscope. RESULTS: 2 kinds of compounds had been synthesized successfully, and they exerted strong inhibition effect on the proliferation of leukemia K562 cells in dose-dependant manner. Under the inverted microscope, K562 cells grew dispersedly, of which the count decreased significantly. CONCLUSIONS: Structural modification of costunolide is an effective path to develop new anti-tumor medicine. All of these works will be the basis of further study.

KEY WORDS *Aucklandia lappa*; Costunolide; Structural modification; Anti-tumor activity

木香是菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根, 味辛、苦, 性温, 归脾、胃、肝、大肠经。其芳香行散, 可升可降,

能温中行气止痛、健脾消食导滞, 主治胸痞胁痛、腕腹胀痛、痢疾后重、食积不化、呕吐泄泻、寒疝腹痛、水肿、脚气^[1-2]。现代

药。现代研究表明, 川芎嗪^[7]、阿魏酸等为川芎活血化瘀、治疗心脑血管疾病的主要部位; 而着眼于其芳香油的研究, 更多集中在解热^[8]和抗菌^[9]等方面。还有报道认为, 川芎挥发油反导致血清中总胆固醇与低密度脂蛋白水平升高^[10], 在由胶原蛋白-肾上腺素诱发小鼠血栓形成实验中也未见明显作用^[11]。

本研究结果表明, 通脉醒脑滴丸具有抗凝血作用, 能抑制体内血栓的形成, 对抗由高分子右旋糖酐引起的毛细血管收缩, 明显改善血液流态, 改善小鼠软脑膜微循环。提示川芎挥发油可能也是川芎活血化瘀、通络止痛的重要活性部位, 可用于治疗脑血管疾病。

参考文献

- [1] 邹节明, 潘佐静, 张家铨, 等. 中药脑脉泰防治急性脑微循环障碍的实验研究[J]. 新医学, 2003, 34(Z1): 15.
- [2] 王世军, 王军, 史仁华, 等. 开放式颅窗法研究软脑膜微循环方法的建立及应用[J]. 山东生物医学工程, 1997, 16(2): 36.
- [3] 刘剑刚, 李忠文, 徐红梅, 等. 华佗再造丸抗血栓作用及对实验性微循环障碍的影响[J]. 广东医学, 2000, 21(5): 368.

- [4] 刘国勋, 吴铁, 陈志东, 等. 小鼠体内血栓形成动物模型的建立及在抗血栓药物筛选中应用[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15(3): 281.

- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1122.

- [6] 苏定冯. 心血管药理学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 329.

- [7] 张莉, 高志军, 赵静. 丹参和川芎嗪联合应用对大鼠脑缺血再灌注氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3664.

- [8] 李祖伦, 杨金蓉, 胡荣, 等. 川芎挥发油解热作用及部分机理研究[J]. 中医药信息, 2003, 20(6): 31.

- [9] 潘嘉, 王家葵, 邹文俊, 等. 抑菌效应法测定川芎挥发油药动学参数[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(4): 18.

- [10] 季芳, 黄国兴. 阿魏酸和川芎挥发油对大鼠实验性高脂血症的不同影响[J]. 中国药师, 2007, 10(7): 634.

- [11] 朱林, 廖小燕, 何新霞. 阿魏酸、川芎挥发油对小鼠自主活动及血栓形成的影响[J]. 金华职业技术学院学报, 2005, 5(2): 15.

(收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2013-01-05)

*副主任药师。研究方向: 药学。电话: 0379-69823023

药理学研究证明,木香具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗溃疡、促进胃动力等作用,其主要活性成分为以木香烯内酯为代表的系列萜类化合物(见图1)。研究发现,木香烯内酯能明显抑制 A549 肿瘤细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)、诱导 DU145 人类前列腺肿瘤细胞凋亡、减少肝癌细胞的生存能力,并能作用于细胞有丝分裂期^[3-5]。

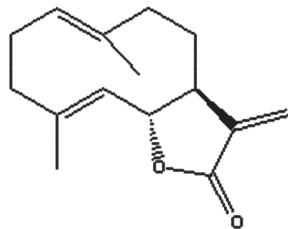


图1 木香烯内酯的化学结构
Fig 1 Structures of costunolide

目前,针对木香烯内酯的结构修饰包括氧化和成环衍生。有课题组利用不同的氧化剂对木香烯内酯进行氧化,实现了在环上衍生羟基基团,增加结构的亲水性;木香烯内酯在一些氧化剂作用下,能够实现 5 位碳与 10 位碳连接,内部结构重排成环,将原来的十元环变成两个六元环^[6]。另一研究方向是对木香烯内酯通过 13 位碳上的 Michael 加成,衍生获得乙二胺、2-巯基乙醇、甲氧基、一系列氨基酸等新化合物^[7]。国内对木香烯内酯的研究鲜见报道,为了进一步筛选具有更好抗肿瘤活性的化合物,笔者合成了一系列木香烯内酯的衍生物,并用 MTT 法检测其体外抗肿瘤活性,以为后期研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

RV10 型旋转蒸发器(德国 IKA 公司);SHB-3 型真空水泵(郑州长城仪器厂);BT124S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);515 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);QTRAP 5500 型质谱仪(美国 AB 公司);AVANCE II 300 型核磁共振仪(美国布鲁克-道尔顿公司);BCN-1360 型超净工作台(北京亚泰科隆实验科技开发中心);18ACI 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司);Versa max 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Coic XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂)。

1.2 试剂

木香烯内酯(成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度:98%);3-羟基吡咯烷、4-甲基哌啶(上海至鑫化工有限公司);GF₂₅₄ 薄层层析硅胶、300~400 目柱层析硅胶(青岛海洋化工厂);RPMI-1604 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);MTT(美国 Sigma 公司);二甲亚砜(分析纯,北京化工厂);其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人慢性髓性白血病癌细胞 K562(中国医学科学院药物研究所肿瘤药理学室)。

2 方法

2.1 木香衍生物的合成

木香烯内酯具有 α -亚甲基- γ -内酯结构,与具有 α -活泼氢原子的化合物发生共轭亲核加成,即 Michael 反应。研究表明,木香烯内酯在 C13 位上修饰系列氨基化合物如吡啶或吡咯烷环后对不同肿瘤细胞具有良好的选择性,表现出其在抗肿瘤方面的潜在研发价值^[6]。化合物的合成见图 2。

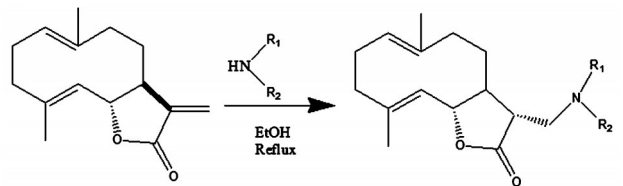


图2 化合物的合成

Fig 2 Synthetise of the compound

2.1.1 木香烯内酯与 4-甲基哌啶的加成 将木香烯内酯 0.15 g(0.64 mmol)充分溶于 25 ml 无水乙醇中,电磁搅拌下加入 4-甲基哌啶 0.064 g(0.64 mmol),回流 12 h 后以薄层色谱检测反应,反应完全则停止加热,回收溶剂后以二氯甲烷溶解拌样,硅胶柱色谱分离纯化,用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱,分段收集洗脱液,浓缩干燥后得化合物 1,为黄色固体 80 mg,收率 38%。IR:3 017 cm⁻¹, 2 928 cm⁻¹, 1 760 cm⁻¹, 1 207 cm⁻¹, 787 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.83~4.80 (m, 1H), 1.56 (m, 1H), 4.67~4.51 (m, 2H), 2.80~2.77 (m, 2H), 2.64~2.58 (m, 1H), 2.40~1.95 (m, 11H), 1.68 (s, 3H), 1.66~1.52 (3H), 1.41 (s, 3H), 1.25~1.61 (m, 4H), 0.91 (d, 3H, $J=6.3$ Hz); MS (ES+) m/z (relative intensity): 332 (M+H) (100), 354 (M+H+Na) (30)。化合物 1 见图 3A。

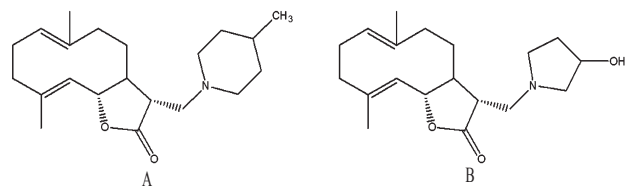


图3 化合物 1 和 2 的化学结构

A. 化合物 1; B. 化合物 2

Fig 3 Structures of compound 1 and 2

A. compound 1; B. compound 2

2.1.2 木香烯内酯与 3-羟基吡咯烷的加成 将木香烯内酯 0.15 g(0.64 mmol)充分溶于 25 ml 无水乙醇中,电磁搅拌下按 1:1 (m/m) 加入 3-羟基吡咯烷,回流 12 h 后以薄层色谱检测反应,反应完全则停止加热,回收溶剂后以二氯甲烷溶解拌样,硅胶柱色谱分离纯化,用二氯甲烷-甲醇梯度洗脱,分段收集洗脱液,浓缩干燥后得化合物 2,为浅黄色固体 72 mg,收率 34.9%。IR:3 358 cm⁻¹, 3 017 cm⁻¹, 2 928 cm⁻¹, 1 760 cm⁻¹, 1 207 cm⁻¹, 1 059 cm⁻¹, 787 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.83~4.80 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 1.88~2.11 (m, 2H), 2.64~2.58 (m, 1H), 2.40~1.95 (m, 11H), 1.68 (s, 3H), 1.66~1.52 (3H), 1.41 (s, 3H), 2.90~3.33 (m, 4H); MS (ES+) m/z (relative intensity): 320 (M+H) (100), 341 (M+H+Na) (30)。化合物 2 见图 3B。

2.2 活性研究

2.2.1 细胞培养液 取 RPMI-1640,按标示量加入 1 L 超纯水,搅拌至全部溶解后,滤过,除菌,滤液于 40 °C 冰箱中贮藏,使用前加入胎牛血清(FBS) 50 ml 和 8% NaHCO₃ 12 ml,轻轻摇匀即可。

2.2.2 细胞的继代培养 K562 细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,在 37 °C 通入 5% CO₂ 的培养箱中继代培养。

2.3 形态学研究

收集对数生长期的 K562 细胞,调整细胞密度至 2×10^5 ml⁻¹,接种于 96 孔板,200 μ l/孔,置于 CO₂ 培养箱中(37 °C、5%

CO₂、饱和湿度)培养4 h后,每孔加2 μl不同质量浓度的化合物1和2(0.5、5、50 μg/ml),每个质量浓度设3个平行孔,同时设阴性对照(加入与药等体积的溶剂)。加药后培养24 h,在光学显微镜下观察细胞形态变化,判断有无细胞凋亡或细胞坏死的形态学特征。

2.4 体外抗肿瘤活性测试^[7]

收集对数生长期的K562细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔板,200 μl/孔,置CO₂培养箱中(37 ℃、5% CO₂、饱和湿度)培养4 h后,每孔加2 μl不同质量浓度的化合物1和2(0.5、5、50 μg/ml),每个质量浓度设3个平行孔,同时设阴性对照(加入与药等体积的溶剂)。加药后培养24 h。每孔中加入20 μl MTT溶液,振荡混匀后继续置于37 ℃、5% CO₂培养箱中培养4 h。2 000 r/min离心10 min后吸弃孔内培养上清液。每孔加150 μl DMSO,振荡10 min,使Formazan颗粒充分溶解,用酶标仪测定每孔溶液的吸光度(OD)值,测定波长540 nm,参考波长450 nm。计算不同质量浓度化合物对细胞增殖的抑制率(IR%): $\text{IR}\% = (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{化合物}}) / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100\%$,并按Bliss法计算化合物的半数抑制浓度(IC₅₀)。

3 结果

3.1 两种化合物对细胞形态的影响

阴性对照组无明显形态学改变。经不同质量浓度的化合物1和2处理24 h后,绝大多数K562细胞的细胞质集中到膜内一角,其余膜内部分呈半透明空泡状,有的细胞已破碎,呈现出典型的细胞坏死性形态学特征。细胞形态学检测结果表明,化合物1、2对K562细胞均有很强的坏死性细胞毒活性。两种化合物对细胞形态的影响见图4。

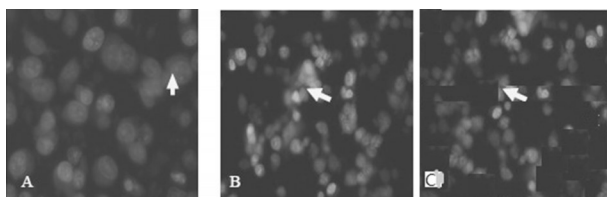


图4 两种化合物对细胞形态的影响

A. 阴性对照; B. 化合物1; C. 化合物2

Fig 4 Effects of 2 kinds of compounds on morphology of K562 cells

A. negative control; B. compound 1; C. compound 2

3.2 两种化合物对K562细胞增殖的抑制

化合物1在0.5~50 μg/ml范围内,对K562细胞的增殖抑制率与剂量有一定的依赖关系,其IC₅₀为8.2 μg/ml。化合物2表现出与化合物1相类似的性质,其IC₅₀为7.6 μg/ml。两种化合物对K562细胞增殖的抑制率见表1。

表1 两种化合物对K562细胞增殖的抑制率(%)

Tab 1 The proliferation inhibition of K562 cells treated with 2 kinds of compounds (%)

药物	50 μg/ml	5 μg/ml	0.5 μg/ml
阴性对照			
化合物1	93.7 ± 3.2	75.8 ± 14.2	26.3 ± 13.5
化合物2	69.5 ± 4.1	45.7 ± 15.6	16.9 ± 11.4

4 讨论

肿瘤是机体在各种致癌因素的作用下,局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控,导致其克隆性异常增生而形成的异常病变。目前,放疗、化疗都不能完全根除肿瘤细胞,同时还会损伤正常组织细胞。因此,寻找安全、有效的抗肿瘤药物具有重要意义。

大量研究证实,木香烯内酯具有广泛的抗肿瘤活性。其构效关系的研究表明,具有五元内酯环结构的化合物对肿瘤细胞具有一定选择性抑制作用,α-亚甲基-γ-内酯则是其发挥活性的重要位点,若α-亚甲基转变为α-甲基,其细胞毒活性会显著降低;若对13位上的双键采用Michael加成也能获得一系列新的化合物,且活性有显著改变^[8-9]。本研究合成3-羟基吡咯烷和4-羟基吡啶取代的两种化合物,采用现代波谱学方法阐明了它们的化学结构,并利用MTT法结合显微镜下检测细胞形态的方法初步评价了其对人慢性髓性白血病K562细胞的抗肿瘤活性。研究证实,化合物1和2对K562细胞的增殖有明显抑制作用,且增殖抑制率与剂量有一定的依赖关系。

综上所述,木香烯内酯对肿瘤细胞有确切的抑制作用,对其结构进行适当的修饰与改造,有望找到一种全新的抗肿瘤药物,这也为今后更深入的研究和开发利用打下了坚实的基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 57.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 478.
- [3] Hao LJ. Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the vascular endothelial growth factor[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2010, 23(22): 687.
- [4] Kim EJ. Apoptosis of DU145 human prostate cancer cells induced by dehydrocostus lactone isolated from the root of *Saussurea lappa*[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 12(46): 3 651.
- [5] Liu CY. Costunolide causes mitotic arrest and enhances radiosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 44(6): 56.
- [6] Srivastava SK, Abraham A, Bhat B, et al. Synthesis of 13-amino costunolide derivatives as anticancer agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(16): 4 195.
- [7] Matsuda H. Absolute stereo-structures and syntheses of Saussureamines A, B, C, D and E amino acid-sesquiterpene conjugates with gastroprotective effect, from the roots of *Saussurea lappa*[J]. *Tetrahedron*, 2000, 30(56): 7 763.
- [8] 吕庆杰, 马颖, 宋继谒, 等. MTT比色分析法检测卵巢癌药物敏感性[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33(6): 540.
- [9] Tang YP. Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Commersonia lappa* Root on proliferation of five kinds cultured cancer cells in vitro[J]. *China J Tradit Chin Med Pharmacy*, 2010, 22(25): 2 180.

(收稿日期: 2013-03-28 修回日期: 2013-05-13)