

6种鸢尾黄素曼尼希碱衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[△]

陈 帅*,袁崇均#,罗 森,余梦瑶,王 笏(四川省中医药科学院中药药学研究所,成都 610041)

中图分类号 R284.2;Q946.91 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2937-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.12

摘要 目的:对鸢尾黄素进行结构修饰,寻求新的具有抗肿瘤活性的化合物。方法:以鸢尾黄素为先导化合物,分别加入乙醇胺、甲胺、乙胺、二甲胺、二乙胺、正丙胺等胺类试剂和甲醛溶液,经曼尼希(Mannich)反应得到鸢尾黄素曼尼希碱衍生物,根据红外光谱、紫外光谱、质谱、核磁共振等确定其结构。采用溶解度试验法考察鸢尾黄素及其衍生物的水溶性;采用MTT法考察鸢尾黄素及其衍生物对人结肠癌细胞株HCT116、人肺癌细胞株A549、人肝癌细胞株HepG2的增殖抑制作用,并计算半数抑制浓度(IC₅₀);以H22肝癌荷瘤小鼠为模型,考察鸢尾黄素及其衍生物(剂量均为100 mg/kg)的体内抑瘤率。结果:共合成6个鸢尾黄素曼尼希碱衍生物,分别为8-(*N*-羟乙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮、8-(*N*-甲基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮、8-(*N,N*-二乙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮、8-(*N,N*-二甲基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮、8-(*N*-乙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮、8-(*N*-正丙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮(依次记为化合物1~6)。与鸢尾黄素比较,6个衍生物的水溶性明显提高,溶解度是鸢尾黄素的5~20倍;其中化合物1、3、5对HCT116细胞的IC₅₀分别为(34.82±3.27)、(16.21±4.13)、(33.12±3.25) μmol/L,均强于鸢尾黄素的IC₅₀[(45.23±5.74) μmol/L];对A549细胞的IC₅₀分别为(37.05±5.74)、(26.88±4.52)、(30.13±6.23) μmol/L,均强于鸢尾黄素的IC₅₀[(53.24±6.34) μmol/L];对HepG2细胞的IC₅₀分别为(23.74±1.45)、(18.96±2.34)、(30.95±2.87) μmol/L,均强于鸢尾黄素的IC₅₀[(48.98±2.58) μmol/L];对H22肝癌荷瘤小鼠的抑瘤率分别55.51%、57.20%、49.15%,且均高于鸢尾黄素的抑瘤率(33.05%),其余3个化合物相比鸢尾黄素的抗肿瘤活性无明显优势。结论:在本研究合成的6个鸢尾黄素曼尼希碱衍生物中,化合物1、3、5均具有强于鸢尾黄素的抗肿瘤活性。

关键词 鸢尾黄素;胺类;曼尼希碱衍生物;合成;人结肠癌细胞株HCT116;人肺癌细胞株A549;人肝癌细胞株HepG2;半数抑制浓度;小鼠;抑瘤率

Study on Synthesis and Anti-tumor Activity of 6 Kinds of Tectorigenin Mannich Base Derivatives

CHEN Shuai, YUAN Chongjun, LUO Sen, YU Mengyao, WANG Jia (Institute of Chinese Materia Medica, Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To conduct structural modification of tectorigenin to search for new compounds with anti-tumor activity. METHODS: Tectorigenin was used as a lead compound, and then added into amine reagents as ethanolamine, methylamine, ethylamine, dimethylamine, diethylamine, *n*-propylamine and formaldehyde solution. Tectorigenin Mannich base derivatives were synthesized by mannich reaction with as the lead compound. The structures of the derivatives were identified according to IR, UV, MS and NMR data. Solubility of tectorigenin and its derivatives were investigated by solubility test method. MTT assay was used to investigate the inhibitory effects of tectorigenin and its derivatives on the proliferation of human colon cancer cell line HCT116, human lung cancer cell line A549 and human hepatoma cell line HepG2, and half inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The inhibition rate of tectorigenin and its derivatives (100 mg/kg) on H22 hepatoma-bearing mice *in vivo* was studied. RESULTS: Totally of 6 kinds of tectorigenin mannich base derivatives were synthesized, such as 8-(*N*-hydroxyethyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone, 8-(*N*-methyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone, 8-(*N,N*-diethyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone, 8-(*N,N*-dimethyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone, 8-(*N*-ethyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone, 8-(*N*-propyl)-methyleamino-5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavone (compounds 1-6 in turn). Compared with tectorigenin, the water solubility of six derivatives was significantly improved, and the solubility was 5-20 times higher than that of tectorigenin. IC₅₀ of compounds 1, 3 and 5 to HCT116 cells were (34.82±3.27), (16.21±4.13), (33.12±3.25) μmol/L, which were stronger than that of tectorigenin [(45.23±5.74) μmol/L]; IC₅₀ of compounds 1, 3 and 5 to A549 cells were (37.05±5.74), (26.88±4.52), (30.13±6.23) μmol/L, which were stronger than that of tectorigenin [(53.24±6.34) μmol/L]; IC₅₀ of compounds 1, 3 and 5 to HepG2 cells were (23.74±1.45), (18.96±2.34), (30.95±2.87) μmol/L, which were stronger than that of tectorigenin [(48.98±2.58) μmol/L]. Compounds 1, 3 and 5 showed higher inhibition rates (55.51%, 57.20% and 49.15%) than

△ 基金项目:四川省应用基础研究计划项目(No.2016JY0009);四川省公益性科研院所基本科研业务专项(No.A-2017N-39)

* 副研究员。研究方向:中药化学。电话:028-85237395。E-mail:csdctm@126.com

通信作者:主任中药师。研究方向:天然活性成分研究与开发。电话:028-85237395。E-mail:86071401@qq.com

tectorigenin (33.05%) on H22 hepatoma-bearing mice, respectively. The other three compounds had no obvious advantage over tectorigenin in anti-tumor activity. CONCLUSIONS: In this study, compounds 1, 3 and 5 of six tectorigenin mannich base derivatives synthesized in this study have stronger antitumor activity than tectorigenin.

KEYWORDS Tectorigenin; Amine; Mannich base derivatives; Synthesis; Human colon cancer cell line HCT116; Human lung cancer cell line A549; Human hepatoma cell line HepG2; Half inhibitory concentration; Mice; Anti-tumor rate

鸢尾黄素(Tectorigenin)又名射干苷元、鸢尾苷元,主要存在于鸢尾科鸢尾属和射干属的植物根茎中^[1],为异黄酮类化合物^[2]。药理研究表明,鸢尾黄素具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗骨质疏松等药理活性^[3-16],黄文哲等^[11]研究表明鸢尾黄素对胃癌细胞和白血病细胞增殖有一定程度的抑制作用;汪新亮等^[12]研究表明鸢尾黄素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖具有明显的抑制作用;Thelen P 等^[13]用射干的提取物治疗裸鼠前列腺癌,结果表明其中的鸢尾黄素可调节癌基因的异常表达;Fang R 等^[14]研究表明鸢尾黄素具有细胞毒性,能抑制细胞分裂;Zheng M 等^[15]研究表明鸢尾黄素可通过抑制环氧酶2的诱导作用而抑制血管生长因子或辛酸刺激的腹膜巨噬细胞前列腺素E2(PGE2)的产生,即可通过抑制新生血管生成,进而对肿瘤的发生、发展起着抑制作用。潘静^[16]用MTT比色法观察从川射干提取的异黄酮类成分对人胃癌细胞株SGC7901的作用,结果显示鸢尾黄素对SGC7901细胞有抑制作用。但由于鸢尾黄素水溶性和脂溶性较差、肠道吸收较少,以及其C-5、C-7位羟基在体内易被糖基化的原因,显著降低了鸢尾黄素的活性,限制了其临床应用。因此,对鸢尾黄素进行结构修饰,可能会获得高效、低毒的新型抗肿瘤候选药物。

曼尼希反应(Mannich反应)是一类重要的有机反应^[17-19],是含有活泼氢的化合物与甲醛和胺缩合生成氨基化合物的有机化学反应。曼尼希碱衍生物通常具有抗肿瘤活性^[19-20],许多生物碱、核苷酸、甾族化合物、肽、抗生素和维生素均包含曼尼希碱活性片段。本文以鸢尾黄素为先导化合物,分别加入乙醇胺、甲胺、乙胺、二甲胺、二乙胺、正丙胺等胺类试剂和甲醛溶液,合成鸢尾黄素曼尼希碱衍生物,合成机制为鸢尾黄素A环8-位活性H与脂肪胺和甲醛反应,鸢尾黄素A环C-8位H被氨基取代,生成鸢尾黄素曼尼希碱衍生物。然后对该衍生物进行体外、体内抗肿瘤试验,考察衍生物的抗肿瘤活性,优选出有效的抗肿瘤化合物。鸢尾黄素曼尼希碱衍生物的合成路线见图1。

1 材料

1.1 仪器

RRLC-6410型液质联用仪(美国Agilent公司);AV II型核磁共振波谱(NMR)仪(德国Bruker公司);UV-2401PC型紫外分光光度仪和FTIR8300型红外检测仪(日本Shimadzu公司);WRS-2型微机熔点测定仪(上海易测仪器设备有限公司);CPA225D型电子天平(德国赛多利斯公司);超纯水系统(美国Millipore公司);

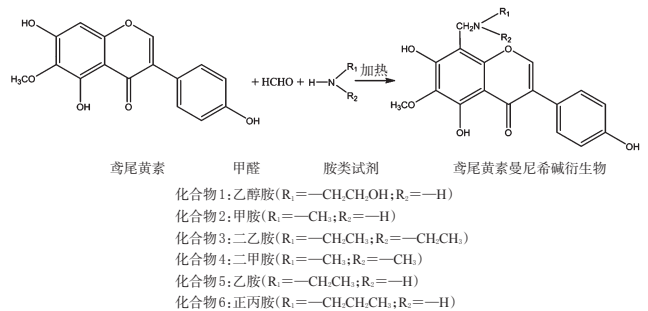


图1 鸢尾黄素曼尼希碱衍生物的合成路线

Fig 1 Synthetic route of Tectorigenin mannich base derivatives

MCO-15AC型CO₂培养箱(日本三洋公司);细胞培养瓶和96孔细胞培养板(美国Corning公司);酶联免疫检测仪(美国Thermo Fisher公司);微量移液器(法国Gilson公司)。

1.2 药品与试剂

鸢尾黄素(陕西绿清生物工程有限公司,批号:20160502,纯度:98.86%);乙醇胺、甲胺、乙胺、二甲胺、二乙胺、正丙胺(成都市科龙化工试剂厂,批号分别为:2015120401、2016010111、2016010201、2015120304、2016020301、2015080513,含量:均>98%);甲醛溶液(成都金山化学试剂有限公司,批号:20160316,含量:37%~40%);高糖DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为:1645800、F160126);MTT、二甲基亚砜(DMSO)、乙二胺四乙酸(EDTA)、胰蛋白酶(美国Sigma公司,批号分别为:S16520、071M7014V、67874TT、BCBQ8161V)。

1.3 细胞与动物

人结肠癌细胞株HCT116、人肺癌细胞株A549、人肝癌细胞株HepG2均购自中国科学院细胞保存库。小鼠,18~22g,♀♂各半,由四川省中医药科学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2018-19,饲养于四川省中医药科学院实验动物中心,实验动物使用许可证号:SCXK(川)2018-100。

2 方法与结果

2.1 鸢尾黄素曼尼希碱衍生物的合成

取9.0g鸢尾黄素(30mmol),加入无水乙醇50mL,水浴加热溶解,再加入3.0mL37%的甲醛溶液(40mmol)和不同的胺类试剂40mmol,混匀,水浴回流3h,取出放冷,冰箱放置过夜,析出沉淀,G3垂熔玻砂漏斗过滤,无水乙醇洗涤,60℃减压干燥,即得淡黄色粗品。

将粗品用80~100目硅胶拌样后装入硅胶色谱柱中,先后用不同比例的氯仿-甲醇(9:1、6:1、3:1、1:1、*V/V*)梯度洗脱,分段收集,根据薄层色谱(TLC)检测结果,合并相同流分,回收溶剂,重结晶,过滤,减压干燥,得到合成产物。当胺类试剂分别为乙醇胺、甲胺、二乙胺、二甲胺、乙胺、正丙胺时,合成产物分别为化合物1(3.56 g,收率31.7%)、化合物2(3.78 g,收率36.6%)、化合物3(3.65 g,收率31.3%)、化合物4(3.46 g,收率32.2%)、化合物5(4.59 g,收率42.7%)、化合物6(3.97 g,收率35.6%)。

2.2 化合物的结构鉴定

肉眼观察鸢尾黄素和化合物1~6的颜色和形状,采用WRS-2型微机熔点测定仪测定其熔点,UV测定采用UV-2401PC型紫外分光光度仪测定其最大紫外波长(λ_{\max}),FTIR8300型红外检测仪测定其红外最大频率(ν_{\max}),采用RLC-6410型液质联用仪分析其电喷雾质谱(ESI-MS)数据,采用AV II型NMR仪分析其氢谱碳谱($^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$)。结果如下:

2.2.1 鸢尾黄素 浅黄色针晶(EtOH);熔点:214~216 °C;紫外的 λ_{\max} :266 nm;红外的 ν_{\max} :3 410, 1 160, 1 520, 1 480, 1 250, 1 050 cm^{-1} ;ESI-MS(m/z):301 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :13.09(1H, s, 5-OH), 10.77(1H, s, 7-OH), 9.58(1H, s, 4'-OH), 8.34(1H, s, H-2), 7.37(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.82(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 6.44(1H, s, H-8), 3.74(3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :180.2(C-4), 157.7(C-4'), 157.3(C-7), 154.0(C-2), 153.4(C-9), 152.7(C-5), 131.3(C-6), 130.5(C-2', 6'), 121.6(C-1'), 121.1(C-3), 115.4(C-3', 5'), 104.4(C-10), 93.8(C-8), 59.7(OCH_3);上述理化性质和光谱数据与文献[2]中报道的一致,确定为鸢尾黄素。

2.2.2 化合物1 淡黄色细沙状晶(EtOH);熔点:189~191 °C;紫外的 λ_{\max} :273 nm;红外的 ν_{\max} :3 345, 1 654, 1 514, 1 452, 1 230, 1 059 cm^{-1} ;ESI-MS(m/z):374 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :13.08(1H, s, 5-OH), 8.06(1H, s, H-2), 7.34(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.81(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 4.11(2H, s, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.66(3H, s, OCH_3), 3.64(2H, t, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.93(2H, t, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :179.0(C-4), 169.7(C-4'), 157.6(C-7), 152.6(C-9), 152.3(C-2), 151.7(C-5), 133.7(C-6), 130.6(C-2', 6'), 122.7(C-1'), 121.6(C-3), 115.4(C-3', 5'), 100.0(C-10), 97.9(C-8), 59.3(OCH_3), 57.7($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 48.9($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 43.0($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$);根据以上数据确定该化合物为8-(*N*-羟乙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.2.3 化合物2 淡黄色结晶性粉末(EtOH);熔点:

187~189 °C;紫外的 λ_{\max} :273 nm;红外的 ν_{\max} :3 341, 1 628, 1 504, 1 227, 1 028 cm^{-1} ;ESI-MS(m/z):344 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :13.14(1H, s, 5-OH), 8.24(1H, s, H-2), 7.36(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.64(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 3.97(2H, s, CH_2NHCH_3), 3.68(3H, s, OCH_3), 3.26(3H, s, CH_2NHCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :181.7(C-4), 162.2(C-4'), 154.3(C-7), 152.2(C-9), 151.2(C-2), 150.7(C-5), 132.9(C-6), 130.2(C-2', 6'), 124.5(C-1'), 122.8(C-3), 116.3(C-3', 5'), 103.7(C-10), 98.4(C-8), 60.8(OCH_3), 45.6(CH_2NHCH_3), 36.2(CH_2NHCH_3);根据以上数据确定该化合物为8-(*N*-甲基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.2.4 化合物3 淡黄色沙状晶(EtOH);熔点:190~192 °C;紫外的 λ_{\max} :273 nm;红外的 ν_{\max} :3 372, 1 653, 1 516, 1 452, 1 232, 1 168, 1 099, 1 018 cm^{-1} ;ESI-MS(m/z):386 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :13.04(1H, s, 5-OH), 8.21(1H, s, H-2), 7.36(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.82(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 4.08[2H, s, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$], 3.71(3H, s, OCH_3), 2.85[4H, q, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$], 1.16[6H, t, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$]; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :182.6(C-4), 165.1(C-4'), 157.7(C-7), 152.9(C-9), 152.8(C-2), 151.5(C-5), 132.6(C-6), 130.7(C-2', 6'), 122.8(C-1'), 122.0(C-3), 115.5(C-3', 5'), 102.4(C-10), 98.1(C-8), 59.7(OCH_3), 49.0[$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$], 46.3[$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$], 10.5[$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$];根据以上数据确定该化合物为8-(*N,N*-二乙基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.2.5 化合物4 淡黄色沙状晶(EtOH);熔点:189~191 °C;紫外的 λ_{\max} :273 nm;红外的 ν_{\max} :3 364, 1 635, 1 527, 1 456, 1 212, 1 148 cm^{-1} ;ESI-MS;ESI-MS(m/z):358 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :12.87(1H, s, 5-OH), 8.34(1H, s, H-2), 7.25(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.63(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 3.86[2H, s, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 3.73(3H, s, OCH_3), 2.14[6H, s, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$]; $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :181.2(C-4), 161.2(C-4'), 154.7(C-7), 152.6(C-9), 152.1(C-2), 151.3(C-5), 132.2(C-6), 130.5(C-2', 6'), 124.7(C-1'), 123.2(C-3), 115.8(C-3', 5'), 103.2(C-10), 98.8(C-8), 60.8(OCH_3), 52.3[$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 42.8[$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$];根据以上数据确定该化合物为8-(*N,N*-二甲基)-亚甲基胺基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.2.6 化合物5 淡黄色结晶性粉末(EtOH);熔点:189~191 °C;紫外的 λ_{\max} :273 nm;红外的 ν_{\max} :3 368, 1 654, 1 514, 1 456, 1 233, 1 059, 1 022 cm^{-1} ;ESI-MS(m/z):358 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ :11.69(1H, s, 5-OH), 8.23(1H, s, H-2), 7.46(2H, d, $J=$

8.5 Hz, H-2', H-6'), 7.19(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 4.81(2H, s, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$), 4.25(3H, s, OCH_3), 3.57(2H, q, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$), 1.73(3H, t, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 182.6 (C-4), 156.3 (C-4'), 154.9 (C-7), 154.6 (C-9), 153.8 (C-2), 152.8 (C-5), 130.9 (C-6), 130.3 (C-2', 6'), 124.6 (C-1'), 122.4 (C-3), 115.8 (C-3', 5'), 105.8 (C-10), 98.5 (C-8), 60.9 (OCH_3), 44.0 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$), 40.0 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$), 9.65 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$); 根据以上数据确定该化合物为 8-(*N*-乙基)-亚甲基氨基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.2.7 化合物 6 淡黄色结晶性粉末(EtOH); 熔点: 188~190 °C; 紫外的 λ_{max} : 273 nm; 红外的 ν_{max} : 3 375, 1 658, 1 438, 1 222, 1 149, 1 045 cm^{-1} ; ESI-MS(m/z): 372 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 12.98(1H, s, 5-OH), 8.17(1H, s, H-2), 7.32(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'), 6.74(2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 3.87(2H, s, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.72(3H, s, OCH_3), 2.53(2H, t, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.46(2H, m, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.87(3H, t, $\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 181.4 (C-4), 162.2 (C-4'), 154.3 (C-7), 151.7 (C-9), 151.1 (C-2), 150.7 (C-5), 133.2 (C-6), 130.9 (C-2', 6'), 123.4 (C-1'), 122.6 (C-3), 115.8 (C-3', 5'), 102.3 (C-10), 99.8 (C-8), 60.8 (OCH_3), 51.3 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 44.6 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.6 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 11.3 ($\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 根据以上数据确定该化合物为 8-(*N*-正丙基)-亚甲基氨基-5,7,4'-三羟基-6-甲氧基异黄酮。

2.3 鸢尾黄素和化合物 1~6 的溶解度考察

按照 2015 年版《中国药典》一部凡例 21 的溶解度试验方法^[1]考察鸢尾黄素和化合物 1~6 的溶解度。称取研成细粉的 7 个化合物, 置于(25 ± 2) °C 的适量水中, 每隔 5 min 强力振摇 30 s, 观察 30 min 内的溶解情况, 并根据《中国药典》中对各种溶解性能的定义进行判断。鸢尾黄素和化合物 1~6 的溶解度测定结果见表 1。

表 1 鸢尾黄素和化合物 1~6 的溶解度测定结果

Tab 1 Determination results of solubility of tectorigenin and compounds 1-6

化合物	溶解度, mmol/L
化合物 1	6.2
化合物 2	4.6
化合物 3	2.8
化合物 4	3.8
化合物 5	3.6
化合物 6	1.4
鸢尾黄素	0.3

由表 1 可知, 与鸢尾黄素比较, 鸢尾黄素衍生物化合物 1~6 的溶解度明显提高, 其中化合物 1 的溶解度最大, 达到 6.2 mmol/L, 是鸢尾黄素的 20 倍。

2.4 鸢尾黄素和化合物 1~6 对 HCT116、A549、HepG2 细胞体外增殖的影响

2.4.1 细胞培养 分别取 HCT116、A549、HepG2 细胞以含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(含青霉素 100 u/mL, 链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$)培养于 37 °C、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱内, 每隔 2~3 d, 以 0.05% 胰蛋白酶-0.53 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

2.4.2 分组与给药 分别取对数生长期的 HCT116、A549、HepG2 细胞, 用胰酶消化, 吹散, 制备细胞混悬液, 调整细胞密度, 按 6×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 在 37 °C 下培养过夜。试验分为化合物 1~6 组(分别加入化合物 1~6 溶液至终浓度为 2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)、空白对照组(只加培养基)和鸢尾黄素组(阳性对照, 加入鸢尾黄素溶液终浓度为 2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度做 3 个重复, 放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。

2.4.3 检测方法 采用 MTT 比色法^[21-22], 在培养时间结束前 4 h, 将 96 孔板里的培养液吸出, 加入 100 μL 磷酸盐缓冲液和 10 μL 5 mg/mL MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 再加入 100 μL 10% 十二烷基磺酸钠溶液, 37 °C 孵育过夜。使用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长处的光密度(OD), 计算抑制率, 抑制率(%) = (空白对照组 OD 值 - 药物组 OD 值) / 空白对照组 OD 值 $\times 100\%$, 采用 Curve Expert 软件计算半数抑制浓度(IC_{50})。鸢尾黄素和化合物 1~6 对 3 种癌细胞株 IC_{50} 的测定结果见表 2。

表 2 鸢尾黄素和化合物 1~6 对 3 种癌细胞株 IC_{50} 的测定结果($n=3$)

Tab 2 Determination results of IC_{50} of tectorigenin and compounds 1-6 to 3 kinds of cancer cell lines($n=3$)

组别	IC_{50} , $\mu\text{mol/L}$		
	HCT116 细胞	A549 细胞	HepG2 细胞
化合物 1 组	34.82 ± 3.27	37.05 ± 5.51	23.74 ± 1.45
化合物 2 组	65.24 ± 4.42	94.32 ± 5.41	84.21 ± 4.24
化合物 3 组	16.21 ± 4.13	26.88 ± 4.52	18.96 ± 2.34
化合物 4 组	53.62 ± 2.31	101.13 ± 4.56	75.86 ± 3.74
化合物 5 组	33.12 ± 3.25	30.13 ± 6.23	30.95 ± 2.87
化合物 6 组	91.64 ± 6.58	113.71 ± 5.36	88.15 ± 10.66
鸢尾黄素组	45.23 ± 5.74	53.24 ± 6.34	48.98 ± 2.58

由表 2 可知, 鸢尾黄素衍生物化合物 1、3、5 对 HCT116、A549、HepG2 细胞的 IC_{50} 均低于鸢尾黄素, 其中化合物 3 对 HCT116、HepG2 细胞的 IC_{50} 均 $< 20 \mu\text{mol/L}$ 。

2.5 鸢尾黄素和化合物 1~6 对 H22 肝癌荷瘤小鼠的抑制作用研究

2.5.1 样品溶液的制备 将鸢尾黄素和化合物 1~6, 分别用溶剂(70% 生理盐水、25% DMSO、5% 聚山梨酯 80 混合溶液)溶解, 配制成 10 mg/mL 混悬液, -20 °C 保存备用。

2.5.2 分组、给药与检测 参考文献[23]的方法, 取小鼠腹腔接种 7 d 的 H22 细胞, 配制成 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 单细胞混悬液, 在无菌条件下接种于小鼠右侧腋下, 每只 2×10^6 个细胞。接种第 2 天, 将小鼠随机分为空白对照组、鸢尾黄

素组(阳性对照)和化合物1~6组,每组10只。分组当天腹腔注射相应样品溶液0.1 mL/10 g,给药剂量均为100 mg/kg(根据急性毒性和体外抑制率推算),空白对照组小鼠注射未加药物的溶剂,每天给药1次,连续2周后,脱颈处死小鼠,剥离瘤块称质量,计算抑瘤率,抑瘤率(%)=(空白对照组瘤质量-药物组瘤质量)/空白对照组瘤质量×100%。鸢尾黄素和化合物1~6对H22肝癌荷瘤小鼠抑瘤率的测定结果见表3。

表3 鸢尾黄素和化合物1~6对H22肝癌荷瘤小鼠抑瘤率的测定结果(n=10)

Tab 3 Anti-tumor rate of tectorigenin and its derivatives to H22 liver cancer-bearing mice(n=10)

组别	剂量,mg/kg	瘤质量($\bar{x}\pm s$),g	抑瘤率,%
化合物1组	100	1.05±0.59	55.51
化合物2组	100	1.52±0.47	35.60
化合物3组	100	1.01±0.25	57.20
化合物4组	100	1.64±0.36	30.51
化合物5组	100	1.20±0.50	49.15
化合物6组	100	1.54±0.41	34.75
空白对照组		2.36±0.53	0
鸢尾黄素组	100	1.58±0.48	33.05

由表3可知,鸢尾黄素衍生物化合物1、3、5对H22荷瘤小鼠的抑瘤率均高于鸢尾黄素,其中化合物3的抑瘤率最高,达到57.20%,相对于鸢尾黄素提高了73.07%。

3 讨论

曼尼希反应条件温和,所得产品易纯化,收率较高,制备步骤简单。本试验利用鸢尾黄素A环C-8位活泼H与脂肪胺和甲醛溶液进行曼尼希反应,共合成了6个曼尼希碱衍生物,其结构经红外、紫外、MS、NMR等数据确证。比较鸢尾黄素和化合物1~6的NMR谱发现,化合物1~6的 δ 3.86~4.81左右均出现了CH₂的单峰,即为曼尼希碱中与胺相连的亚甲基峰;而相对于鸢尾黄素 δ 6.44出现的8位H峰,化合物1~6均消失,且C-8向低场移动,这些光谱数据均表明鸢尾黄素的A环C-8位上发生取代,生成了新的衍生物。

本研究通过体内、体外试验考察了鸢尾黄素衍生物化合物1~6的抗肿瘤活性,结果表明,化合物1、3、5均具有强于鸢尾黄素的抗肿瘤活性,特别是化合物3的抗肿瘤活性最强,可作为潜在抗肿瘤化合物继续研发。本研究结果也为进一步研究鸢尾黄素的结构修饰及其构效关系打下了基础,笔者下一步将尝试引入更多种胺类化合物进行结构修饰,期待得到具有显著抗肿瘤活性的鸢尾黄素曼尼希碱衍生物。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:41-42,285.
 [2] 袁崇均,王笛,陈帅,等.川射干化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(3):444-446.
 [3] 李超,刘艾林,杜冠华.天然异黄酮类化合物的药理学研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(12):1415-1420.

[4] 张琳,张妮.川射干的化学及药理研究进展[J].陕西中医学院学报,2014,37(5):91-93.
 [5] 刘建英,金丽.射干化学成分及药理活性研究进展[J].药学服务与研究,2008,8(5):358-361.
 [6] 韩晓静.川射干异黄酮的相关药效学研究[D].武汉:湖北大学,2006.
 [7] 冯汉林,严启新.射干提取物抗雌激素缺乏大鼠骨质疏松的研究[J].现代药物与临床,2012,27(3):209-213.
 [8] 严启新.射干总黄酮抗骨质疏松的研究[D].广州:中山大学,2004.
 [9] 于颖.川射干异黄酮类化学成分神经保护作用[D].泰安:泰山医学院,2013.
 [10] 陈白灵.黄酮类化合物的药理活性研究新进展[J].海南医学,2012,23(9):119-121.
 [11] 黄文哲,赵小辰,王峥涛,等.异黄酮类化合物抗肿瘤细胞增殖作用[J].现代中药研究与实践,2003,17(1):50-51.
 [12] 汪新亮,吴基良,郑敏,等.葛花鸢尾异黄酮对SMMC-7721肝癌细胞增殖的抑制作用[J].中国新药杂志,2010,19(2):168-171.
 [13] THELEN P, SCHARF JG, BURFEIND P, et al. Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belam canda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2005,26(8):1360-1367.
 [14] FANG R, HOUGHTON PJ, HYLANDS PJ. Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008,118(2):257-263.
 [15] ZHENG M, BAO CY. The anti-angiogenesis and anti-tumor activity of isoflavones on *Belam canda chinensis* (L.) DC[J]. *World Phytomed*, 2004,19(6):260.
 [16] 潘静.川射干化学成分及体外抗肿瘤活性的研究[D].武汉:湖北中医学院,2009.
 [17] 孙逊,胡昌奇,黄晓东,等.黄芩苷元的Mannich反应[J].有机化学,2003,23(1):81-85.
 [18] 张萍,仲英,郑万金,等.染料木素的门尼希碱衍生物的合成[J].食品与药品,2009,11(5):24-27.
 [19] 任杰,潘莎莎,程虹,等.木犀草素Mannich碱衍生物的合成及其抗癌活性[J].中国新药杂志,2011,20(8):743-747.
 [20] 刘玉婷,吴倩倩,尹大伟,等. Mannich反应的最新研究进展及其应用[J].有机化学,2016,36(5):927-938.
 [21] 南敏伦,赫玉芳,司学玲,等.救必应酸酯类衍生物的合成、鉴定及其体外抗肿瘤活性研究[J].中国药房,2019,30(5):591-595.
 [22] 魏文青,赵满仓,刘晶,等.应用MTT法进行体外抗肿瘤药敏试验影响因素研究[J].华北国防医药,2008,20(6):25-27.
 [23] 郭圣奇,黄挺章,李远辉,等.薏苡茎水提取物对H22荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究[J].中国临床药理学杂志,2015,31(10):858-857.

(收稿日期:2019-07-30 修回日期:2019-09-08)

(编辑:邹丽娟)