



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.05.05

文章编号: 2095-1264(2024)05-0548-06

穿心莲内酯改构化合物 J6 的制备 及抗肿瘤作用研究*

吕 梦, 朱雪萍, 陈佳凡, 尤雅萍, 崔翰明, 褚瑜光, 师 帅, 胡元会*

(中国中医科学院广安门医院, 北京, 100053)

摘要: **目的** 提供一种穿心莲内酯(AG)改构化合物 J6 的制备方法,并验证其抗肿瘤作用。**方法** 将 AG 与丙酸酐以 ≤ 72 mg:5 mL 的比例混合,在 120~180 °C 条件下反应,将 AG 第 3、14 和 19 位的羟基修饰成丙酰基,得到 AG 改构化合物 J6,通过 ^{13}C NMR、 ^1H NMR 得到结构表征;通过 CCK8 实验检测 J6 对胃癌 MKN45 细胞、肾癌 786O 细胞、黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响,并与 AG 对细胞增殖的作用进行对比。**结果** CCK8 结果显示,AG 改构化合物 J6 能以时间及浓度依赖性抑制胃癌、肾癌、黑色素瘤细胞增殖,与 AG 相比,其抑制肿瘤的作用更显著。**结论** 本研究合成了一种 AG 改构化合物 J6,可在更低的剂量范围内对胃癌 MKN45 细胞、肾癌 786O 细胞、黑色素瘤 A375 细胞发挥更高效的生长抑制作用,为抗肿瘤药物的研发提供了新思路。

关键词: 穿心莲内酯;合成;抗肿瘤

中图分类号: R73-34; R914 **文献标识码:** A

Preparation and antitumor effects of andrographolide-modified compound J6*

LÜ Meng, ZHU Xueping, CHEN Jiafan, YOU Yaping, CUI Hanming, CHU Yuguang, SHI Shuai, HU Yuanhui*

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing, 100053, China)

Abstract: Objective To provide a preparation method for andrographolide-modified compound J6 and to verify its anti-tumor effects. **Methods** Andrographolide was mixed with propionic anhydride in a ratio of ≤ 72 mg : 5 mL. At 120~180 °C, andrographolide hydroxyl groups at positions 3, 14 and 19 were modified into propionyl groups to obtain andrographolide-modified compound J6, which was structurally characterized by ^{13}C NMR and ^1H NMR. CCK8 assay was used to detect the effects of J6 on the proliferation of gastric cancer MKN45 cells, renal cancer 786O cells and melanoma A375 cells, and the effects of J6 on cell proliferation was compared with that of andrographolide. **Results** The results of CCK8 showed that andrographolide-modified compound J6 inhibited the proliferation of gastric cancer, renal cancer and melanoma cells in a time- and concentration-dependent manner. Compared with andrographolide, J6 showed a more significant inhibitory effect on tumor. **Conclusion** In this study, an andrographolide-modified compound J6 was synthesized. J6 can exert more efficient inhibition on the growth of gastric cancer MKN45 cells, kidney cancer 786O cells and melanoma A375 cells in a lower dose range, providing a new idea for the development of antitumor drugs.

Key words: Andrographolide; Synthesis; Antitumor

*基金项目:“优势病种-医院制剂-新药”研发专项(ZZ15-XY-LCO-02);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A03801)。

作者简介:吕梦,女,博士研究生,研究方向为中医药防治心血管疾病。

*通信作者:胡元会,男,教授,主任医师。研究方向为中医药防治心血管疾病。

0 前言

穿心莲是爵床科植物穿心莲干燥地上部分,归心、肺、大肠、膀胱经,性寒,味苦,具有清热解毒、凉血、消肿的功效^[1]。穿心莲内酯(andrographolide, AG)为白色方棱形结晶,是中药穿心莲的主要活性成分^[2]。由于AG为二萜类内酯化合物,存在水溶性差、体内稳定性差等缺点,导致其体内生物利用度低,临床使用受到一定限制^[3-5]。基于AG本身的性质缺陷及其相对活泼的结构特性,近年来研究者进行了大量结构修饰和活性筛选工作,以期发现更有效的候选化合物。

AG的抗炎、抗凋亡、抗氧化和提高免疫力等药理作用已被广泛证实^[6-7]。近年来研究发现,AG具有抗肿瘤作用,可促进肝癌、结肠癌等多种肿瘤细胞凋亡^[8-9]。目前,关于AG衍生物的研究也在持续开展。已有研究发现,对AG第3、14和19位进行乙酰基修饰后获得的化合物可抑制肿瘤细胞活性^[10],但对于AG丙酰基改构化合物的具体作用尚缺乏实验验证。本研究通过构建AG改构化合物J6,探索其对黑色素瘤、肾癌、胃癌细胞株的抑制作用,从而为抗肿瘤药物的研发提供新见解。

1 材料与方法

1.1 细胞系

胃癌MKN45细胞、肾癌7860细胞、黑色素瘤A375细胞购自协和医学院细胞资源中心(细胞系资源国家基础设施,NSTI总部)。

1.2 仪器与试剂

超导核磁共振仪(Bruker, AV-300);超高分辨质谱仪(Bruker, Solarix7.0);二氧化碳培养箱(Thermo Fisher, 3111);多功能酶标仪(Thermo Fisher, Varioskan LUX)。RPMI-1640细胞培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:PM150110);胎牛血清(Gibco公司,货号:16010159);胰酶消化液(碧云天生物技术有限公司,货号:C0201);二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司,货号:D8370);CCK8细胞增殖检测试剂盒(日本同仁化学研究所,货号:CK04)。

1.3 化合物制备

向反应瓶中加入AG(72.0 mg, 0.205 mmol)和丙酸酐(5 mL),加热至145 °C并持续反应3 h。冷却至室温后,加入EtOAc(100 mL)稀释,然后加入饱和

NaHCO₃溶液(100 mL)进行淬灭,水洗,再用EtOAc提取(100 mL×3)。合并的有机相依次用盐水(100 mL)洗涤、无水Na₂SO₄干燥,过滤,有机滤液经减压浓缩的粗品再通过硅胶柱色谱(PE:EA=50:1→20:1)分离,得到92 mg白色固体,即新的AG改构化合物(3S,E)-4-(2-((1R,5R,6R,8aS)-5,8a-二甲基-2-亚甲基-6-(丙酰氧基)-5-((丙酰氧基)甲基)十氢化萘-1-基)亚乙基)-5-oxotetrahydrofuran-3-yl丙酯,并随机命名为J6(图1)。

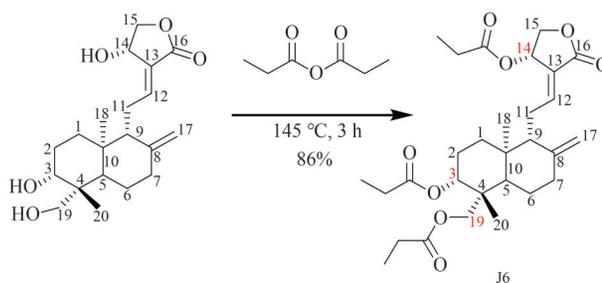


图1 AG改构化合物J6的合成

Fig. 1 Synthesis of the AG-modified compound J6

将得到的AG改构化合物J6进行质谱和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)检测,得到结构表征:Hi-Res MS (ESI): *m/z* found [M+Na]⁺ for C₂₉H₄₂O₈Na 541.276 7 (calcd. 541.277 2)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.99 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 5.92 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.89 (s, 1H), 4.63~4.52 (m, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.32 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 4.26~4.13 (m, 2H), 2.49~2.36 (m, 5H), 2.35~2.78 (m, 4H), 1.99~1.82 (m, 3H), 1.82~1.68 (m, 3H), 1.41~1.25 (m, 3H), 1.22~1.08 (m, 9H), 1.01 (s, 3H), 0.74 (s, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.47, 174.13, 174.11, 169.23, 150.37, 146.67, 124.16, 109.13, 79.54, 71.81, 67.81, 64.72, 55.90, 55.36, 41.50, 39.03, 37.97, 37.10, 28.03, 27.91, 27.58, 25.27, 24.77, 24.36, 22.75, 14.61, 9.37, 9.26, 9.20。

¹H NMR谱图给出以下特征信号:在δ6.99~4.87范围内出现的3个氢信号为烯烃氢,δ4.63~2.78范围内出现的6个氢信号为环上的氢,δ1.99~0.74范围内出现的6个氢信号为剩余甲基和乙基的氢。¹³C NMR图谱给出29个碳信号峰,包括4个羰基碳、4个烯烃碳、δ174.47~169.23为C=O碳信号。

1.4 细胞培养

将MKN45细胞、7860细胞、A375细胞加入含

10% 胎牛血清的 1640 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养。

1.5 CCK8 检测

采用 CCK8 实验检测 AG 改构化合物 J6 对胃癌 MKN45 细胞活力的影响。具体操作如下:将 MKN45 细胞以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔板,分别加入不同浓度梯度(1、5、10、25、50、100、200 μmol·L⁻¹)的 AG 或 J6,并参照文献^[11-12],设置抗胃癌阳性药物环磷酰胺组(3.583、17.920、35.830 mmol·L⁻¹),对照组不加药物,另设不加细胞和药物的空白组。细胞铺板 24 h 后加药干预,并分别于 24、48 及 72 h 后加入 CCK8 试剂,检测细胞存活率,计算细胞凋亡的半抑制浓度(IC₅₀)。

采用 CCK8 实验检测 J6 对肾癌 7860 细胞活力的影响,具体实验步骤同前,参照文献^[13-14],设置抗肾癌阳性药物氟尿嘧啶组(38.4、192.0 μmol·L⁻¹)。细胞铺板 24 h 后加药干预,并分别于 24、48 及 72 h 后加入 CCK8 试剂,检测细胞存活率,计算 IC₅₀。

采用 CCK8 实验检测 J6 对黑色素瘤 A375 细胞活力的影响,具体实验步骤同前,参照文献^[15],设置黑色素瘤阳性药物紫杉醇组(5、10 μmol·L⁻¹)。

细胞铺板 24 h 后加药干预,并分别于 24、48 及 72 h 后加入 CCK8 试剂,检测细胞存活率,计算 IC₅₀。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用“均值±标准差”表示,使用单因素方差分析,组间比较使用最小显著性差异法(least+significant difference, LSD);对于符合正态分布的数据,方差不齐组间比较使用 Dunnett T3 法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AG 和 J6 对胃癌 MKN45 细胞增殖的影响

AG 对胃癌 MKN45 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 47.160、15.520、12.520 μmol·L⁻¹; J6 对胃癌 MKN45 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 12.330、9.717、6.967 μmol·L⁻¹;与空白对照组比较,10、25、50、100、200 μmol·L⁻¹ 的 J6 可显著抑制胃癌 MKN45 细胞增殖($P < 0.05$),表明 J6 能以浓度及时间依赖性抑制胃癌 MKN45 细胞增殖,发挥抗肿瘤作用(图 2-图 3)。

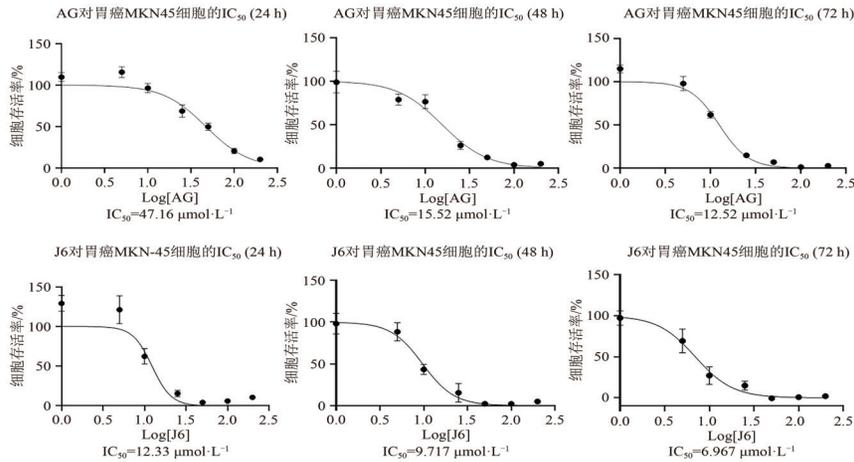


图 2 AG 和 J6 对胃癌 MKN45 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of AG and J6 on the proliferation of gastric cancer MKN45 cells

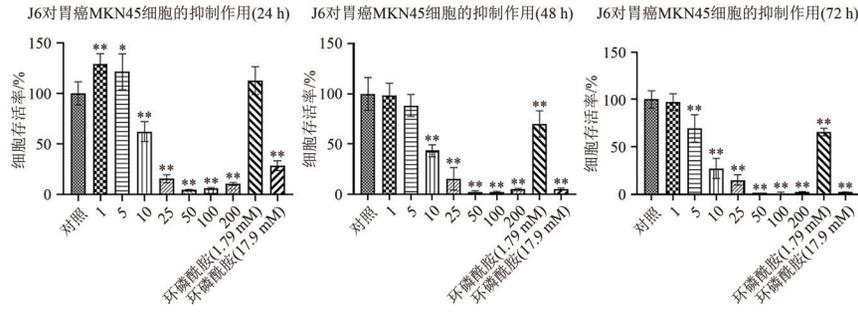
2.2 AG 和 J6 对肾癌 7860 细胞增殖的影响

AG 对肾癌 7860 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 22.370、11.110、6.397 μmol·L⁻¹; J6 对肾癌 7860 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 6.705、6.298、6.783 μmol·L⁻¹;与空白对照组相比,5、10、25、50、100、200 μmol·L⁻¹ 的 J6 可显著抑制肾癌 7860 细胞增殖,差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明 J6 可以浓度及时间依赖性抑制肾癌 7860 细胞增殖,发挥抗肿瘤作用

(图 4-图 5)。

2.4 AG 和 J6 对黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响

AG 对黑色素瘤 A375 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 18.600、14.110、12.060 μmol·L⁻¹; J6 对黑色素瘤 A375 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为 7.778、2.513、4.328 μmol·L⁻¹;与空白对照组相比,5、10、25、50、100、200 μmol·L⁻¹ 的 J6 可显著抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖,差异具有统计学意义($P < 0.01$),表明 J6



注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

图3 J6对胃癌MKN45细胞24、48、72 h增殖的影响

Fig. 3 Effects of J6 on the proliferation of gastric cancer MKN45 cells at 24, 48, and 72 h

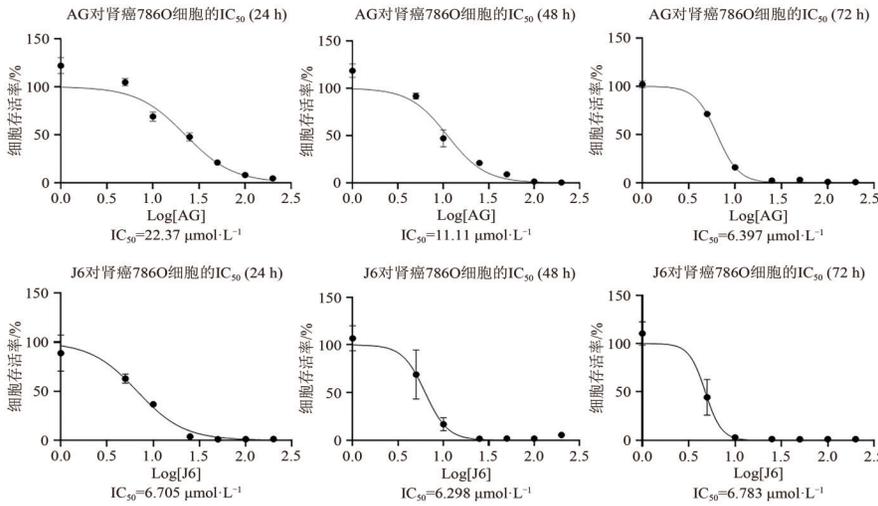
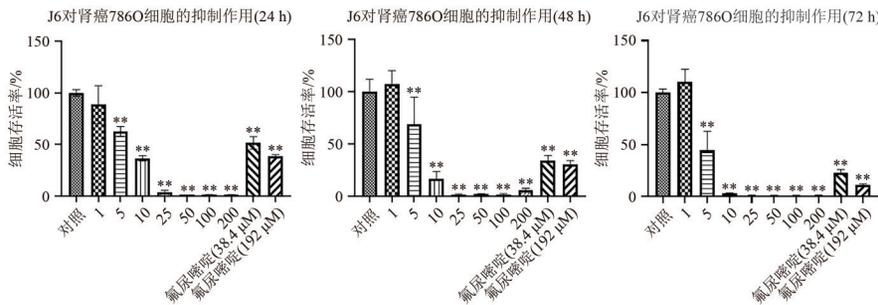


图4 AG和J6对肾癌786O细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of AG and J6 on the proliferation of renal cancer 786O cells



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

图5 J6对肾癌786O细胞24、48、72 h增殖的影响

Fig. 5 Effects of J6 on the proliferation of renal cancer 786O cells at 24, 48 and 72 h

可以浓度及时间依赖性抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖,发挥抗肿瘤作用(图6-图7)。

3 讨论

AG 具有广泛的生物学活性,近年来研究发现

其对肿瘤具有抑制作用,可将胃癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期,并诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[16],以及通过抑制 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 介导的 Bcl-2 活化和调节 p53 诱导的 Caspase-3 基因表达来诱导黑色素瘤细胞凋亡^[17],Bi 等^[18]发现,AG 可增强 TRAIL 通道的 G_2/M 期细胞周

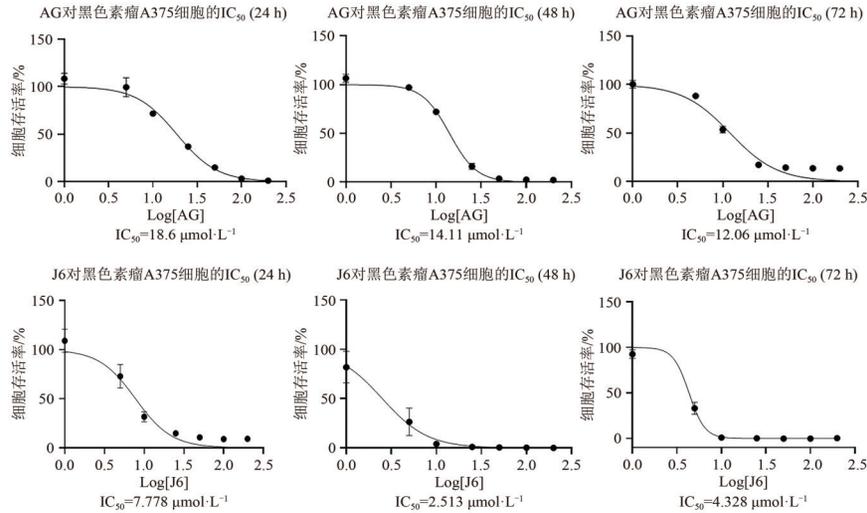
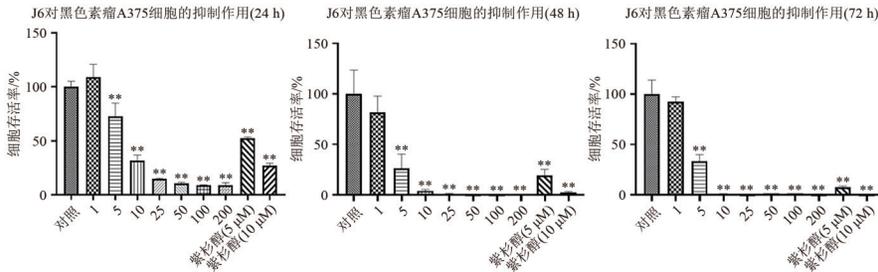


图 6 AG 和 J6 对黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响

Fig. 6 Effects of AG and J6 on the proliferation of melanoma A375 cells



注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

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

图 7 J6 对黑色素瘤 A375 细胞 24、48、72 h 增殖的影响

Fig. 7 Effects of J6 on the proliferation of melanoma A375 cells at 24, 48, and 72 h

期阻滞,抑制肾癌细胞增殖。

本研究将 AG 与丙酸酐以 $\leq 72 \text{ mg} : 5 \text{ mL}$ 的比例混合,在 $120 \sim 180 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下反应,将 AG 第 3、14 和 19 位的羟基修饰成丙酰基,得到改构化合物 J6,相对分子量为 541.3。该制备方法简单快捷,所需反应底物种类较少,利于后续纯化,丙酸酐可作为反应物,也可作为反应试剂,无毒副作用。最终获得的 AG 改构化合物 J6 可以非溶剂化或溶剂化形式存在,包括水合物形式。

本研究首次测定了 AG 改构化合物 J6 对胃癌 MKN45 细胞、肾癌 786O 细胞、黑色素瘤 A375 细胞的体外抑制作用,并以相应的临床用药(环磷酰胺、氟尿嘧啶、紫杉醇)作为对照^[19-21],验证 J6 的抗肿瘤活性。结果表明,J6 对肿瘤细胞半数抑制的给药剂量低于对照组药物给药剂量,对肿瘤细胞具有较强的活性且 IC_{50} 值较低。

通过 CCK8 实验发现, J6 可显著抑制胃癌

MKN45 细胞、肾癌 786O 细胞、黑色素瘤 A375 细胞增殖, 24、48、72 h 的 IC_{50} 值均显著低于 AG,其对肿瘤细胞的增殖抑制作用较 AG 更为显著和迅速,可在更低的剂量范围内发挥更高效的肿瘤抑制作用。

本研究采用丙酰基取代 AG 第 3、14、19 位,合成了 AG 改构化合物 J6,并验证了其抗肿瘤活性。由于取代基存在差异,导致化合物的整体结构存在差异。在药物化学领域,化合物的活性是与其结构为基础的,构效关系十分密切,结构上的微小变化也可能导致其活性发生很大的改变。我们通过实验验证了与 AG 存在结构差异的改构化合物 J6 可显著抑制胃癌 MKN45 细胞、肾癌 786O 细胞、黑色素瘤 A375 细胞增殖,为抗肿瘤药物研究提供了新的思路。而 J6 与目前研究更为广泛的 AG 三乙酰基修饰化合物的抗肿瘤活性对比,则需要未来更多的实验验证。

参考文献

- [1] ZENG B, WEI A L, ZHOU Q, et al. Andrographolide: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity and clinical trials and pharmaceutical researches [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(1): 336–364. DOI: 10.1002/ptr.7324.
- [2] BURGOS R A, ALARCÓN P, QUIROGA J, et al. Andrographolide, an anti-inflammatory multitarget drug: all roads lead to cellular metabolism [J]. *Molecules*, 2020, 26(1): 5. DOI: 10.3390/molecules26010005.
- [3] 龙凯花, 王春柳, 臧巧真, 等. 穿心莲内酯油水分布系数和溶解度的测定[J]. *陕西中医*, 2015, 36(3): 347–348. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7369.2015.03.045.
- [4] 彭伟文, 刘中秋, 叶玲, 等. 穿心莲内酯的溶解度和稳定性实验研究[J]. *中国医药指南*, 2008, 6(24): 76–77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2008.24.051.
- [5] PHATTANAWASIN P, SOTANAPHUN U, BURANA-OSOT J, et al. Isolation and characterization of the acid and base degradation products of andrographolide [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(10): 559–562. DOI: 10.1691/ph.2018.8082.
- [6] CUI J, GAO J, LI Y, et al. Andrographolide sulfate inhibited NF- κ B activation and alleviated pneumonia induced by poly I: C in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(4): 189–196. DOI: 10.1016/j.jphs.2020.08.005.
- [7] DUAN M X, ZHOU H, WU Q Q, et al. Andrographolide protects against HG-induced inflammation, apoptosis, migration, and impairment of angiogenesis via PI3K/AKT-eNOS signaling in HUVECs [J]. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 6168340. DOI: 10.1155/2019/6168340.
- [8] QIN X Y, WANG X, TIAN M Y, et al. The role of andrographolide in the prevention and treatment of liver diseases [J]. *Phytomedicine*, 2023, 109: 154537. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154537.
- [9] ZHANG R, ZHAO J, XU J, et al. Andrographolide suppresses proliferation of human colon cancer SW620 cells through the TLR4/NF- κ B/MMP-9 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4305–4310. DOI: 10.3892/ol.2017.6669.
- [10] 烟台靶点药物研究有限公司. 含穿心莲内酯衍生物的药物组合物及其制备方法 with 用途: CN200710014282.0 [P]. 2008–10–15.
- [11] 董陈诚, 钟漓, 张广钰, 等. 芒柄花黄素对人胃癌细胞 MKN-45 荷瘤裸鼠模型的抑制作用及机制研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(32): 4482–4483, 4486. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.006.
- [12] 朱莹莹, 赵路华, 严士海, 等. 乌骨藤提取物对人胃癌细胞 (MKN28) 细胞增殖的研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2007, 21(6): 36–39. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7813.2007.06.021.
- [13] 周青英, 徐乃春, 郑定钦, 等. 氟尿嘧啶调控 VHL/HIF 信号通路抑制肾癌细胞增殖、侵袭与转移的研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(8): 872–879. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2019.08.005.
- [14] 苏泽轩, 倪梁朝, 钟玲, 等. 5-氟尿嘧啶与双嘧达莫联合对肾癌细胞生长的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(7): 853–855. DOI: 10.3760/j.issn:1001-9030.2006.07.030.
- [15] 宋亚丽, 张莉, 薛燕宁, 等. 多西紫杉醇对黑素瘤 B16F10 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国麻风皮肤病杂志*, 2008, 24(10): 764–766. DOI: 10.3969/j.issn.1009-1157.2008.10.002.
- [16] LI S G, SHAO Q S, WANG Y Y, et al. Effect of andrographolide on proliferation and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells [J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2013, 16(7): 676–680.
- [17] PRATHEESHKUMAR P, SHEEJA K, KUTTAN G. Andrographolide induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by inhibiting NF- κ B-mediated Bcl-2 activation and modulating p53-induced caspase-3 gene expression [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(1): 143–151. DOI: 10.3109/08923973.2011.588233.
- [18] BI R, DENG Y Y, TANG C, et al. Andrographolide sensitizes human renal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through upregulation of death receptor 4 [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5): 1939–1948. DOI: 10.3892/or.2020.7737.
- [19] 毛臻, 李金花, 刘淑澍. 化疗解毒方诱导人胃癌 MKN-45 细胞凋亡及其分子机制研究[J]. *中药材*, 2021, 44(2): 442–446. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.02.035.
- [20] 杨智勇, 王晓英, 陈永革, 等. 葛根素对肾透明细胞癌 786-O 细胞生长抑制作用的研究[J]. *浙江医学*, 2021, 43(9): 930–935. DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2021.43.9.2020-4289.
- [21] LEON-FERRE R A, MARKOVIC S N. Nab-paclitaxel in patients with metastatic melanoma [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(12): 1371–1377. DOI: 10.1586/14737140.2015.1110024.

校稿: 李征 刘颖

本文引用格式: 吕梦, 朱雪萍, 陈佳凡, 等. 穿心莲内酯改构化合物 J6 的制备及抗肿瘤作用研究[J]. *肿瘤药学*, 2024, 14(5): 548–553. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.05.05.

Cite this article as: LÜ Meng, ZHU Xueping, CHEN Jiafan, et al. Preparation and antitumor effects of andrographolide-modified compound J6 [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2024, 14(5): 548–553. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2024.05.05.