

· 论著 ·

沙蟾毒精酯类衍生物的合成和抗肿瘤活性研究

罗 川¹, 马建江², 缪震元³, 吴岳林² (1. 安徽华润金蟾药业股份有限公司, 安徽 淮北 235000; 2. 上海应用技术大学化学与环境工程学院, 上海 201418; 3. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 基于活性天然产物沙蟾毒精骨架设计 3-酯类衍生物, 并测试其抗肿瘤活性。方法 通过缩合剂催化下将酸和沙蟾毒精进行酯化反应, 得到 3-酯类沙蟾毒精衍生物, 采用 Cell Titer 法测试体外抗肿瘤活性。结果 3-沙蟾毒精酯类衍生物对所有的肿瘤细胞株显示出优异的体外抗肿瘤活性, 其 IC₅₀ 值均在 1 μmol/L 以下。结论 化合物 **2a** 活性最好, 对 3 种肿瘤细胞株的 IC₅₀ 值为 4.0~91.7 nmol/L, 可作为抗肿瘤候选化合物进行进一步研究。

[关键词] 沙蟾毒精; 药物设计; 酯类; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R914

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)01-0035-03

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202007022

Design, synthesis and antitumor activity of 3-arenobufagin esters

LUO Chuan¹, MA Jianjiang², MIAO Zhenyuan³, WU Yuelin² (1. Anhui Huarun Golden Frog Pharmaceutical Co., Ltd., Huaibei 235000, China; 2. School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China; 3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To search for novel potent 3-ester derivatives of arenobufagin and test their antitumor activities in vitro. **Methods** Target compounds were synthesized by esterification of arenobufagin with acids. CellTiter method was used to assay the in vitro antitumor activities. **Results** 3-Ester derivatives exhibited excellent antitumor activities against all the cancer cells. **Conclusion** Among the 3-ester derivatives, compound **2a** had the best activities with the IC₅₀ of 4.0~91.7 nmol/L and appeared to be a valuable candidate for further study.

[Key words] arenobufagin; drug design; ester derivatives; antitumor activity

活性天然产物是药物研发重要的先导化合物来源之一, 基于天然产物已成功开发出很多临床治疗药物。从我国传统中药中分离有效活性成分, 已成为国内外发现先导化合物的一个有效途径。蟾蜍是我国特有中药材, 具有解毒、消肿、止痛、强心利尿、抗癌等作用^[1-3]。现代研究发现中药蟾蜍含有多种抗肿瘤活性成分, 其中, 主要化学成分之一的沙蟾毒精(图 1)具有优秀的体内外抗肿瘤活性, 但其心脏毒性使得沙蟾毒精治疗窗窄, 无法作为抗肿瘤药物进行后续开发^[4-7]。早期研究表明, 沙蟾毒精的 3 位羟基对活性和毒性有较大影响^[8]。Deng 等对沙蟾毒精的 3 位进行了修饰, 设计了一类成纤维细胞活化蛋白-α 靶向沙蟾毒精前药衍生物, 不仅在体内外显示出优异的抗肿瘤活性, 而且降低了心脏毒性^[9]。果德安等也对沙蟾毒精的 3 位羟基进行

了结构修饰, 设计得到一类 3-氮取代氨基甲酸酯类衍生物, 对 A549、HCT116、Calu-6、PANC-1、SW620 和 NSCLC 等 6 种细胞株均显示出优秀的活性, 其 IC₅₀ 值在 10 nmol/L 以下^[10]。因此, 笔者设计 3 位酯基取代的沙蟾毒精衍生物, 进一步探讨沙蟾毒精的构效关系, 从中筛选获得高活性的候选化合物。

1 仪器与试剂

核磁共振仪为 Bruker 300 或 600 型, TMS 为内标, CD₃OD、DMSO-d₆ 或者 CDCl₃ 为溶剂。化学位移(δ)和偶合常数(J)分别以×10⁻⁶(ppm)和 Hz 为单位。在 API-3000LC-MS 型质谱仪上完成 ESI 质谱。TLC 分析所用硅胶板为 GF254(青岛海洋化工有限公司)。硅胶柱层析采用 60G 硅胶(青岛海洋化工有限公司)。商品化溶剂皆为市售分析纯或化学纯。

2 实验方法

2.1 化合物 **2a-2j** 的合成方法

将沙蟾毒精(83 mg, 0.2 mmol)、酸(0.3 mmol)、

[基金项目] 安徽省科技重大专项(201903a07020031)

[作者简介] 罗 川, 高级工程师, 研究方向: 肿瘤药物研究与开发, Tel: (0561)3152858, Email: luoch51@126.com

[通信作者] 吴岳林, 博士, 研究方向: 药物设计和药物合成工艺研究, Tel: (021)60877231, Email: wylidraggon@sit.edu.cn

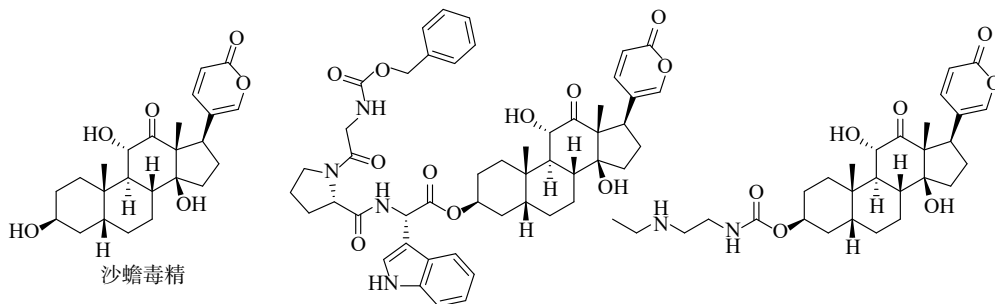


图 1 沙蟾毒精及其代表性衍生物的化学结构

DMAP(24.4 mg, 0.2 mmol)和 5 ml 干燥的二氯甲烷加入到 25 ml 烧瓶中, 氩气保护下逐份加入 EDCI(115 mg, 0.6 mmol)。室温反应过夜, 反应完全后蒸去溶剂, 残余物经柱色谱纯化后得目标产物 **2a-2j** (洗脱剂为二氯甲烷: 甲醇=100:1)。

2a: 白色固体, 收率 13.9%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.68 (d, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.28 (d, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.18 (d, 1H), 4.14 (d, 1H), 4.05 (d, 2H), 3.91 (q, 1H), 2.15 (d, 2H), 2.02 ~ 2.11 (m, 1H), 1.86 (m, 9H), 1.40 (s, 4H), 1.26 (d, 2H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (s, 3H)。

2b: 白色固体, 收率为 55.5%。¹H NMR: (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.76 (d, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.27 (d, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.33 (d, 1H), 4.11 (d, 1H), 3.84 (s, 1H), 2.43 (d, 1H), 2.30 (t, 2H), 2.05 ~ 2.09 (m, 2H), 1.86 ~ 1.94 (m, 2H), 1.75 ~ 1.80 (m, 5H), 1.63 ~ 1.73 (m, 4H), 1.45 (d, 1H), 1.33 ~ 1.44 (m, 15H), 1.27 (s, 3H), 0.86 ~ 0.88 (m, 3H)。

2c: 白色固体, 收率 15.2%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.74 (d, 1H), 7.40 (d, 1H), 6.30 (d, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.35 (d, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.84 (d, 1H), 2.45 (d, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.65 ~ 1.92 (m, 11H), 1.46 ~ 1.53 (m, 1H), 1.26 ~ 1.42 (m, 5H), 1.21 (s, 3H), 0.92 (s, 3H)。

2d: 白色固体, 收率 46.7%。¹H NMR: (CDCl₃, 500 MHz) δ: 8.85 (s, 1H), 8.40 (m, 2H), 7.62 ~ 7.77 (m, 2H), 7.41 (s, 1H), 6.29 (d, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.13 (d, 1H), 3.86 (d, 1H), 2.56 (d, 1H), 1.72 ~ 2.24 (m, 11 H), 1.32 ~ 1.51 (m, 6H), 1.23 (s, 3 H), 0.94 (s, 3H)。

2e: 白色固体, 收率 43.5%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.66 ~ 7.74 (m, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.08 ~ 7.20 (m, 3H), 6.27 (t, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.36 ~ 4.26 (m, 1H), 4.00 ~ 4.15 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.56 (d, 1H), 2.27 ~ 2.41 (m, 3H), 2.04 (m, 2H), 1.80 ~ 1.86 (m, 3H), 1.70 ~ 1.79 (m, 4H), 1.64 (s, 3H), 1.26 ~ 1.42 (m, 6H), 1.18 (s, 1H), 1.13 (s, 1H), 1.01 (d, 1H),

0.91 (d, 3H)。

2f: 白色固体, 收率 50.3%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.94 (d, 1H), 7.72 (d, 1H), 7.53 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.32 (d, 1H), 6.29 (d, 1H), 5.36 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.35 (t, 1H), 4.06 ~ 4.16 (m, 1H), 3.85 (d, 1H), 2.51 (d, 1H), 1.97 ~ 2.13 (m, 3H), 1.74 ~ 1.89 (m, 8H), 1.45 ~ 1.54 (m, 1H), 1.31 ~ 1.45 (m, 3H), 1.25 (s, 1H), 1.21 (s, 3H), 0.93 (s, 3H)。

2g: 白色固体, 收率 42.6%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 10.11 (s, 1H), 8.20 (d, 2H), 7.97 (d, 2H), 7.72 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.29 (d, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.36 (m, 1H), 4.12 (t, 1H), 3.81 ~ 3.93 (m, 1H), 2.55 (d, 1H), 2.08 (t, 2H), 1.84 ~ 2.00 (m, 4H), 1.76 ~ 1.84 (m, 5H), 1.61 (s, 3H), 1.38 (d, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.93 (s, 3H)。

2h: 白色固体, 收率 12.5%。¹H NMR: (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.73 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.27 (d, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.35 (q, 2H), 4.36 ~ 4.40 (m, 1H), 4.04 ~ 4.14 (m, 1H), 2.46 (d, 1H), 1.69 ~ 2.26 (m, 10H), 1.57 (d, 1H), 1.22 ~ 1.50 (m, 8H), 1.20 (s, 3H), 0.91 (s, 3H)。

2i: 白色固体, 收率 52.3%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.74 (m, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.79 (s, 2H), 6.38 (d, 1H), 6.32 (d, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.08 ~ 4.19 (m, 1H), (3.92 (d, 9H), δ3.87 (d, 1H), 2.51 (d, 1H), 1.84 (m, 10H), 1.40 (t, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 0.95 (s, 3H)。

2j: 白色固体, 收率 39.2%。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.84 (d, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.50 (t, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.02 (t, 2H), 6.32 (d, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.18 ~ 4.09 (m, 1H), 3.92 (d, 3H), 3.87 (d, 1H), 2.52 (d, 1H), 2.09 (d, 1H), 1.78 ~ 2.00 (m, 7H), 1.59 (s, 3H), 1.28 ~ 1.46 (m, 6H), 1.25 (s, 3H), 0.96 (s, 3H)。

2.2 体外抗肿瘤活性测试

选用人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 Bel7404 和人肠癌细胞 HCT116, 均由海军军医大学药学院冻存和传代。在 37 °C、5 % CO₂ 条件下,

用含有 10 % 的胎牛血清、1 % 的青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中传代培养细胞。弃去培养皿中的上层培养基,用 PBS 洗细胞 2 次,再加入胰酶,放入培养基中消化 1~2 min,待细胞脱壁后,再加入新的培养基,轻轻吹打,使细胞完全脱落,待细胞入 5 ml 新的培养基,轻轻吹打,用细胞计数法计算细胞浓度,然后接种于 96 孔板中。将接种完的 96 孔板放置于 37 °C、5 % 的 CO₂ 培养箱中孵育过夜,次日细胞即可贴壁。按照不同的实验设计加入不同浓度的药物,每组设 3~4 个复孔,每孔加入 10 μl 相应浓度的药物,再将 96 孔板放入培养箱继续培养。活性测试采用 10 % CellTiter™ Blue (Promega, Cat.# G8081/2, US) 试剂盒,并在 37 °C、5 % CO₂ 环境下孵育 1 h。用酶标仪(Bio Tek, US)测量 530/40 nm 和 590/35 nm 处荧光值,计算公式:

$$\text{细胞存活率}(\%) = [(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100\%$$

其中,As: 实验组(含有细胞、荧光试剂和化合物的培养基);Ac: 对照组(含有细胞和荧光试剂,不含化合物的培养基);Ab: 空白组(不含细胞、化合物的培养基)。

3 结果与讨论

3.1 化学合成

目标化合物通过各类酸和沙蟾毒精发生酯化反应得到,收率为 12.5%~55.5%,合成路线见图 2。从反应收率上看,芳香族酯类衍生物收率高于脂肪族类酯类衍生物。例如,化合物 2c 为乙酸酯衍生物,收率仅为 15.2%,而化合物 2e 为对甲基苄酯衍生物,收率为 43.5%。在反应中还发现,水分对反应有较大影响。因此,反应溶剂需要干燥处理,并且反应体系还需保持在无水条件下,才能保证反应顺利进行。

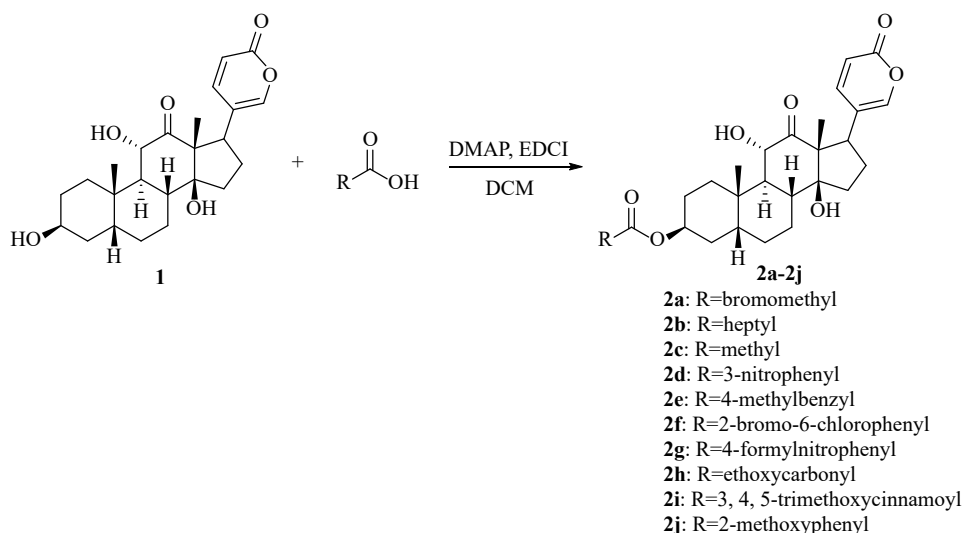


图 2 3-沙蟾毒精酯类衍生物 2a-2j 的合成路线

3.2 体外抗肿瘤活性研究

课题组选择 3 种肿瘤细胞株 (MCF-7、Bel7404 和 HCT116),以沙蟾毒精为阳性对照,采用 CellTiter 法开展了体外抗肿瘤活性研究,结果见表 1。可以看出,3-沙蟾毒精酯类衍生物均具有优异的体外抗肿瘤活性。对 MCF-7 细胞株,化合物 2a、2c 和 2j 显示出高于阳性对照药沙蟾毒精的活性。对 Bel7404 细胞株,所有化合物均显示出优异的活性,其中,化合物 2a、2b、2d 和 2e 活性最好,其 IC₅₀ 值均在数个纳摩尔,相比沙蟾毒精提高近 1000 倍。对 HCT116 细胞株,化合物 2e 活性最高,其 IC₅₀ 值为 4.5 nmol/L,相比沙蟾毒精提高了 3.7 倍,化合物 2b 和 2c 与阳性药相当。

整体而言,脂肪族酯类化合物活性高于芳香族

表 1 沙蟾毒精及其酯类衍生物 2a-2j 的体外抗增殖活性 (μmol/L)

化合物	MCF-7	Bel 7404	HCT 116
2a	0.0917	0.0040	0.0489
2b	0.2403	0.0024	0.0163
2c	0.0471	0.0479	0.0173
2d	0.1817	0.0048	0.0279
2e	0.1910	0.0040	0.0045
2f	0.1982	0.0203	0.2043
2g	0.1887	0.0212	0.0605
2h	0.1616	0.5365	0.0302
2i	0.1418	0.0252	0.0488
2j	0.0968	0.0168	0.0258
沙蟾毒精	0.1101	4.5440	0.0167

(下转第 57 页)

- derivative of oxcarbazepine, and zonisamide concentrations in serum in a clinical setting[J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(4): 469-476.
- [14] 曹青, 薛飞, 宋元红, 等. UPLC-MS/MS同时测定人血浆中奥卡西平及其代谢产物的浓度[J]. *临床医学研究与实践*, 2018, 3(13): 7-8, 11.
- [15] 徐善森, 张焜, 周敬凯, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中拉莫三嗪、奥卡西平及其代谢物浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(12): 1176-1179.
- [16] 陈婷婷, 刘富岗. RP-HPLC法同时测定人血浆中左乙拉西坦、奥卡西平及其活性代谢产物的浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(20): 2133-2136, 2164.
- [17] 林奕泓, 黄成珂, 王哲, 等. HPLC法同时检测人血浆中奥卡西平及其代谢产物浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 26(2): 115-118.
- [18] FORTUNA A, SOUSA J, ALVES G, et al. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(4): 1605-1615.
- [19] 张宏久, 周凡, 闫小华, 等. 反相高效液相色谱法测定血清中奥卡西平的代谢产物单羟基衍生物[J]. *中南药学*, 2007, 5(1): 28-30.
- [20] 刘亦伟, 王长连, 黄品芳. 高效液相色谱法同时测定拉莫三嗪、苯巴比妥、苯妥英、卡马西平的血药浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(20): 1660-1662.
- [21] 李世焯, 洪震, 吴逊, 等. 临床诊疗指南-癫痫病分册(2015修订版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [22] 杨娟娟, 王陈翔, 周子晔, 等. LC-MS/MS测定人血清中奥卡西平及其活性代谢产物10-羟基卡马西平的浓度及其临床应用[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(22): 2823-2827.
- [23] 楼江, 林能明, 刘占利, 等. HPLC-DAD测定血浆拉莫三嗪、奥卡西平及10-羟基卡马西平浓度效果观察[J]. *浙江医学*, 2019, 41(1): 35-39.
- [收稿日期] 2020-05-14 [修回日期] 2020-07-10
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 37 页)

酯类化合物, 例如对 MCF-7 细胞株, 溴乙酸酯衍生物 **2a** 的 IC_{50} 值为 91.7 nmol/L, 而芳香族酯类化合物除 **2j** 外, 活性均在 100 nmol/L 以上。

4 结论

基于活性天然产物沙蟾毒精骨架, 在其 3 位引入酯基基团, 设计合成出 10 个 3-沙蟾毒精酯类衍生物。体外抗肿瘤活性研究发现, 所有的化合物对 3 种肿瘤细胞株 MCF-7、Bel7404 和 HCT116 均显示出优异的抗肿瘤活性。其中, 化合物 **2a** 活性最好, 对 3 种肿瘤细胞株的 IC_{50} 值均在 100 nmol/L 以下, 可作为抗肿瘤候选化合物进行进一步研究。

【参考文献】

- [1] 秦资凡, 王保和. 中药蟾酥的研究进展概况[J]. *中国药物评价*, 2014, 31(5): 306-309.
- [2] 吴喜燕, 高慧敏, 王智民. 蟾蜍类药材化学成分研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(14): 207-214, 220.
- [3] NOGAWA T, KAMANO Y, YAMASHITA A, et al. Isolation and structure of five new cancer cell growth inhibitory bufadienolides from the Chinese traditional drug Ch'an Su[J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(9): 1148-1152.
- [4] HOU W, HUANG Z X, XU H G, et al. Hybrids of arenobufagin and benzoisosenazol reducing the cardiotoxicity of arenobufagin[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(20): 3391-3394.
- [5] HAN L Y, YUAN B, SHIMADA R, et al. Cytocidal effects of arenobufagin and hellebrigenin, two active bufadienolide compounds, against human glioblastoma cell line U-87[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(6): 2488-2502.
- [6] PERERA CORDOVA W H, LEITÃO S G, CUNHA-FILHO G, et al. Bufadienolides from parotoid gland secretions of Cuban toad *Peltophyryne fustiger* (Bufonidae): Inhibition of human kidney Na(+)/K(+)-ATPase activity[J]. *Toxicon*, 2016, 110: 27-34.
- [7] WEI X, YANG J, MAO Y, et al. Arenobufagin inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway and induces apoptosis and autophagy in pancreatic cancer cells[J]. *Pancreas*, 2020, 49(2): 261-272.
- [8] MA B, XIAO Z Y, CHEN Y J, et al. Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic bufalin 3-nitrogen-containing-ester derivatives[J]. *Steroids*, 2013, 78(5): 508-512.
- [9] DENG L J, WANG L H, PENG C K, et al. Fibroblast activation protein α activated tripeptide bufadienolide antitumor prod-rug with reduced cardiotoxicity[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(13): 5320-5333.
- [10] 果德安, 吴婉莹, 栗世铀, 等. 沙蟾毒精衍生物及其制备方法、包含该衍生物的组合物、及其用途: CN110483608A[P]. 2019-11-22.
- [收稿日期] 2020-07-06 [修回日期] 2020-09-28
[本文编辑] 李睿旻