

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.08.006

◇ 药学研究 ◇

新型槲皮素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

周芳¹, 杨扬², 郭举²作者单位:¹武汉大学中南医院药学部,湖北 武汉 430071;²武汉工程大学绿色化工过程教育部重点实验室,湖北 武汉 430205

基金项目:湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2016057)

摘要:目的 设计并合成以槲皮素为母核,研究 3'-位羟基引入芳香丙烯酸基槲皮素衍生物的体外抗肿瘤活性。方法 以槲皮素为原料,用不同取代的芳香丙烯酸与其 3'-位羟基缩合成酯,得目标槲皮素衍生物,并通过核磁共振波谱仪(¹H-NMR)进行结构表征,同时用噻唑蓝比色法(MTT法)测试目标化合物对不同肿瘤细胞的抗肿瘤活性。结果 通过抗肿瘤活性测试显示,所合成的目标化合物对人结肠癌细胞和乳腺癌细胞表现出了较好的抗肿瘤活性,均达到了微摩尔级,其中化合物 5C₁ 和 5C₆ 对乳腺癌肿瘤细胞的细胞毒达到了 10 微摩尔级,半抑制浓度(IC₅₀)分别为 10.59 μmol/L 和 10.31 μmol/L。结论 该系列槲皮素衍生物的合成为后续槲皮素衍生物的合成研究和获得具有潜在抗肿瘤活性的先导化合物奠定了基础。

关键词:槲皮素; 化学技术,合成; 药物筛选试验,抗肿瘤; 核磁共振,生物分子; 衍生物

Synthesis and antitumor activity of novel quercetin derivatives

ZHOU Fang¹, YANG Yang², GUO Ju²Author Affiliations:¹Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China;²Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education,

Wuhan Institute of Technology, Wuhan, Hubei 430205, China

Abstract: **Objective** To design and synthesize quercetin derivatives by introducing 3'-aryl acrylic groups and investigate their antitumor activities *in vitro*. **Methods** With quercetin as raw material, condensation of 3'-hydroxyl groups with different substituted aromatic acrylic acid was conducted to get target quercetin derivatives, and their structures were characterized by ¹H-NMR, of which antitumor activity against different tumor cells was tested by MTT assay. **Results** The antitumor activity test showed that some compounds exhibited good antitumor activity against human colon cancer cells and breast cancer cells, which all reached the micromolar level. Especially, the cytotoxicity of compound 5C₁ and 5C₆ against breast cancer cells reached 10 micro-molar level, and their IC₅₀ values were 10.59 and 10.31 μmol/L, respectively. **Conclusion** The synthesis of these novel quercetin derivatives laid the foundation for further study on the synthesis of quercetin derivatives and obtaining lead compounds with potential antitumor activity.

Key words: Quercetin; Chemistry techniques, synthetic; Drug screening assays, antitumor; Nuclear magnetic resonance, biomolecular; Derivatives

槲皮素(Quercetin)(图1)是一种广泛存在于植物及食物中的黄酮类化合物,呈黄色粉末状固体,通常含有两分子结晶水,弱酸性。文献研究表明,槲皮素具有抗氧化作用、抗肿瘤作用、抗炎作用、

降血糖等多种生物活性,具有很高的药用价值^[1-6]。

近年来,槲皮素对癌症的化学预防和治疗作用逐渐被人们所认识并引起广泛的重视。研究表明,槲皮素能全面地作用于癌发生的始发、促癌和演进三个阶段,兼有抗致癌、抗促癌和诱导分化的作用^[7]。对人白血病细胞、结肠癌细胞、骨髓瘤细胞、卵巢癌细胞、乳腺癌细胞、淋巴瘤细胞、膀胱癌细胞等均有一定的抑制作用^[8-11]。槲皮素通过改变细胞色素 p4501A1(CYP1A1)等代谢酶的基因表达和活性,抑制致癌物的活化,或通过抑制环加氧酶-2(COX-2)的 mRNA 和蛋白质水平,从而减轻细胞损伤和癌变,对癌症发生具有预防作用。此外,在对

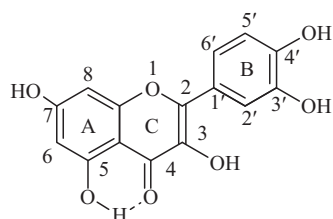


图1 槲皮素的化学结构

癌症的治疗方面,槲皮素具有诱导肿瘤细胞凋亡、调节肿瘤细胞周期、干扰肿瘤细胞的信号传导通道、作用于雌激素受体、抑制肿瘤的血管生成,抑制肿瘤生长、转移、增强抗癌药物对肿瘤细胞的敏感性、逆转抗癌药物的耐药性等作用^[12-14]。目前国内外课题组从事槲皮素衍生物的研究很多^[15-16],如贾景景等^[17]将烯丙基和异戊烯基的引入槲皮素得到了一系列具有抗肿瘤活性的衍生物, Jian Yuan 等^[18]将甲基引入槲皮素得到一系列具有抗肿瘤活性的衍生物,但关于针对槲皮素特定位置羟基衍生化的文献报道的并不多,据此,我们设计合成了一系列新型的槲皮素衍生物 5C₁-5C₇(图2),这为后续槲皮素衍生物的合成研究以及获得具有更好抗肿瘤活性的先导化合物奠定了基础。

本研究的起止时间为 2016 年 3 月至 2017 年 6 月。

1 材料与方法

1.1 实验仪器 ¹H-NMR: Bruker AVANCE III 400M NMR, 瑞士布鲁克科技有限公司; 双目显微熔点仪(表显): XT-4 型(温度计未校正), 北京泰克仪器有限公司; 三用紫外分析仪: MQK-ZF-1, 上海米青科实业有限公司; 恒温磁力搅拌器: CJB-S 型, 西安安泰仪器科技有限公司; 循环水式多用真空泵: 2XZ 型, 上海精密仪器仪表有限公司; 旋转蒸发器: RE-3000 型, 西安安泰仪器科技有限公司; 电热鼓风干燥箱: CN841-640L 型, 吴江市超能电热设备有限公司。

1.2 实验试剂 槲皮素: 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 溴化苄: 国药集团化学试剂有限公司; 取代芳香丙烯酸: 梯希爱(上海)化成工业发展

有限公司; 二碳酸二叔丁酯: 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC): 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 4-二甲氨基吡啶(DMAP): 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 钯碳(Pd-C): 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 四氢呋喃: 加金属钠回流变蓝供用; N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、乙酸乙酯、二氯甲烷(CH₂Cl₂): 重蒸且无水处理; 硅胶 G 和 H: 青岛海洋化工厂, 未经活化; MTT 法所需肿瘤细胞: 中科院上海细胞库。所用试剂和溶剂均为化学纯或分析纯, 除特别注明外, 未经进一步处理。

1.3 化学合成实验

1.3.1 3,7,4'-三苄基槲皮素(2)的合成 称取槲皮素 5.02 g, 以 100 mL DMF 溶解, 加入无水碳酸钾 7.18 g, 置于冰浴搅拌约 15 min。取溴化苄 8.2 mL 加入反应液中, Ar 保护, 反应 24 h 以上。反应完毕, 用适量水稀释反应液, 乙酸乙酯萃取, 合并有机层, 以水洗有机层, 无水硫酸钠干燥溶剂, 旋干得红棕色油状物。粗产品经硅胶柱层析, 以 CH₂Cl₂ 为洗脱剂, 得淡黄色针状固体(2) 4.67 g, 收率 55%, 熔点 155~156℃(文献参考值^[1]为 150~152℃)^[19-20]。

1.3.2 3,7,4'-三苄基槲皮素-3'-芳香丙烯酸酯(4B₁-4B₇)合成通法 称取 3,7,4'-三苄基槲皮素(2) 10 mmol 和取代芳香丙烯酸(3A₁-3A₇) 10 mmol, 以适量无水 CH₂Cl₂ 溶解, 冰浴, DCC 10 mmol 和 DMAP 12 mmol 以无水 CH₂Cl₂ 溶解加入反应体系, Ar 保护, 低温反应 30 min, 自然升温至室温反应过夜。以薄层色谱显色法(TLC)监测反应进行。反应完毕, 收集滤液, 旋干溶剂, 以 CH₂Cl₂-CH₃OH 重结晶得黄色沉淀(4B₁-4B₇), 收率 70%~85%。

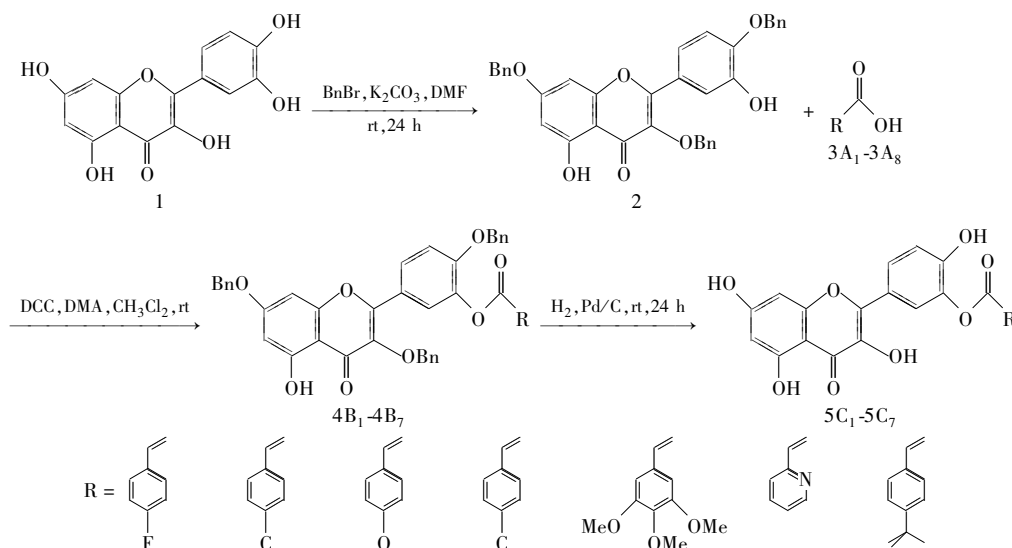


图2 槲皮素 3'-芳香丙烯酸酯目标化合物的合成路线

1.3.3 槲皮素-3'-芳香丙烯酸酯(5C₁-5C₇)合成通法 称取 3,7,4'-三苄基槲皮素-3'-芳香丙烯酸酯(4B₁-4B₇)5 mmol,以适量四氢呋喃和无水乙醇溶解,加入 20% 钯碳 0.5 mmol,密封真空后,通入氢气,室温搅拌 24 h。反应完毕,旋干溶剂,以 CH₂Cl₂-石油醚重结晶得浅绿色粉末(5C₁-5C₇),收率 81%~95%。

2 结果

2.1 结构表征 3,7,4'-三苄基槲皮素(2): ¹H-NMR(CDCl₃,400MHz) δ(ppm): 5.07(s,2H), 5.13(s,2H), 5.19(s,2H), 6.44(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.50(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.95(d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.24-7.47(m, 15H), 7.61-7.64(m, 2H), 12.62(bris, 1H)。

4B₁: ¹H-NMR(CDCl₃,400MHz) δ(ppm): 4.93(s,2H), 5.14(s,2H), 5.17(s,2H), 5.42(d, J = 15 Hz, 1H), 6.44(d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.51(s, 1H), 6.53(d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.01(d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.21-7.56(m, 19H), 7.62(m, 1H), 7.77(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.92(dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 12.64(bris, 1H)。

4B₂: ¹H-NMR(CDCl₃,400MHz) δ(ppm): 5.13(s,2H), 5.15(s,2H), 5.19(s,2H), 5.57-5.52(d, J = 15 Hz, 1H), 6.44(d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.54-6.56(d, J = 6 Hz, 1H), 6.53(d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.01(d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.21-7.56(m, 19H), 7.62(m, 1H), 7.77(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.92(dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 12.64(bris, 1H)。

4B₃: ¹H-NMR(CDCl₃,400MHz) δ(ppm): 2.42(s,3H), 5.08(s,2H), 5.11(s,2H), 5.12(s, 1H), 5.13(s,2H), 5.49(d, J = 12 Hz, 1H), 6.44(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.53(d, 1H), 7.02(d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.25-7.44(m, 19H), 7.78(d, J = 2.0 Hz, 1H),

7.95(dd, J = 8.8, 1H), 12.64(bris, 1H)。

5C₁: ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ(ppm): 5.13(s, 1H), 5.40(d, J = 15 Hz, 1H), 6.20(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.45(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.10(d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.32(d, J = 6 Hz, 2H), 7.34(d, J = 6 Hz, 2H), 7.43(t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.87(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.96(dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 9.65(bris, 1H), 10.50(bris, 1H), 10.87(bris, 1H), 12.43(bris, 1H)。

5C₂: ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ(ppm): 5.50-5.54(d, J = 15Hz, 2H), 6.19(d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.41(d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.60(s, 1H), 7.08(d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.39(d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.62(s, 1H), 7.65(s, 1H), 7.69(m, 2H), 7.80(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.96(dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 9.57(s, 1H), 10.46(s, 1H), 10.81(s, 1H), 12.42(bris, 1H)。

5C₃: ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ(ppm): 2.45(s, 3H), 5.10(s, 1H), 5.50(d, J = 12 Hz, 1H), 6.22(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.47(d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.94(s, 1H), 7.18(d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.36(s, 1H), 7.42(s, 1H), 7.40(s, 1H), 7.41(d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.81(d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.98(dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 9.62(bris, 1H), 10.76(s, 1H), 10.97(bris, 1H), 12.45(bris, 1H)。

2.2 抗肿瘤活性实验 选取了人结肠癌细胞系 HCT-8,人肝癌细胞系 BEL-7402,人胃腺癌细胞系 BGC-823,人肺腺癌上皮细胞系 A549,人卵巢癌细胞系 A2780,人乳腺癌细胞系 MX-1、MDA-MB-231 等肿瘤细胞株,通过 MTT 法对槲皮素衍生物 5C₁-5C₇的抗肿瘤活性进行了测试,经过 3 次平行测试,取平均值,结果显示如下。

表 1 目标化合物对 8 种人肿瘤细胞的抑制活性/μM

化合物	IC ₅₀						
	HCT-8	BEL-7402	BGC-823	A549	A2780	MX-1	MDA-MB-231
5C ₁	11.26	>100	>100	>100	>100	11.50	10.59
5C ₂	72.13	>100	>100	>100	>100	>100	30.16
5C ₃	12.04	>100	>100	>100	>100	50.72	30.32
5C ₄	22.25	>100	>100	>100	>100	90.50	50.40
5C ₅	41.97	>100	>100	>100	>100	30.84	34.81
5C ₆	15.60	30.71	82.4	58.1	77.2	18.10	10.31
5C ₇	34.64	>100	>100	>100	>100	22.04	32.93

注: IC₅₀表示有 50% 的肿瘤细胞生长被抑制时的药物浓度;HCT-8(人结肠癌细胞系),BEL-7402(人肝癌细胞系),BGC-823(人胃腺癌细胞系),A549(人肺腺癌上皮细胞系),A2780(人卵巢癌细胞系),MX-1、MDA-MB-231(人乳腺癌细胞系)

3 讨论

本研究用不同取代的芳香丙烯酸与槲皮素3'位羟基进行缩合得到目标缩合物,并通过核磁共振波谱仪($^1\text{H-NMR}$)对目标化合物进行结构表征,同时对该类衍生物进行了体外细胞毒性试验的抗肿瘤活性测试,初步的活性结果显示该系列衍生物具有一定的抗肿瘤活性(表1)。通过对该系列槲皮素衍生物 5C_1 - 5C_7 (图2)体外抗肿瘤活性的测试结果可以看出,部分槲皮素衍生物对人结肠癌细胞系 HCT-8 和人乳腺癌细胞系 MX-1、MDA-MB-231 表现出了较好的抗肿瘤活性,尤其使目标化合物 5C_1 和 5C_6 对乳腺癌肿瘤细胞的 IC_{50} 值达到了10微摩尔级,显示出了良好的体外抗乳腺癌活性,这为后续的槲皮素衍生物的合成研究以及获得具有潜在抗肿瘤活性的先导化合物提供了科学参考。

参考文献

- [1] BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance [J]. Nutr Rev, 1998, 56 (11): 317-333.
- [2] YSOHIDA M, SAKAI T, HOSOKAWA N, et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells [J]. FEBS Lett, 1990, 260(1): 10-13.
- [3] 张志琴, 朱双雪. 槲皮素的药理活性与临床应用研究进展 [J]. 药学研究, 2013, 32(7): 400-403, 433.
- [4] 骆明旭, 罗丹, 赵万红. 槲皮素药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 9(17): 12-14.
- [5] 于夏, 唐滋贵. 槲皮素的研究进展 [J]. 河南职工医学院学报, 2011, 23(3): 391-392.
- [6] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
- [7] PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants [J]. J Nat Prod, 2000, 63 (7): 1035-1042.
- [8] SCAMBIA G, RANELLETTI FO, BENEDETTI PANICI P, et al. Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II) [J]. Gynecol Oncol, 1992, 45(1): 13-19.
- [9] RANELLETTI FO, RICCI R, LAROCCA LM, et al. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors [J]. Int J Cancer, 1992, 50(3): 486-492.
- [10] OSMAN Y, MORIYAMA Y, SHIBATA A. Enhanced elimination of Ph + chromosome cells *in vitro* by combined hyperthermia and other drugs (AZT, IFN- α , TNF, and quercetin): its application to autologous bone marrow transplantation for CML [J]. Exp Hematol, 1995, 23(5): 444-452.
- [11] PRAJDA N, SINGHAL RL, YEH YA, et al. Linkage of reduction in 1-phosphatidylinositol 4-kinase activity and inositol 1, 4, 5-trisphosphate concentration in human ovarian carcinoma cells treated with quercetin [J]. Life Science, 1995, 56(19): 1587-1593.
- [12] AVILA MA, VELASCO JA, CANSADO J, et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468 [J]. Cancer Res, 1994, 54(9): 2424-2428.
- [13] LAVOIE HA, WITORSCH RJ. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 209(3): 257-269.
- [14] NING S, FUESSE S, KOTZSCH M. et al. siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth [J]. Int J Oncol, 2004, 25(4): 1065-1071.
- [15] 高秀霞, 侯海燕, 孔祥玲, 等. 苯并芘对孕早期小鼠胎盘绒毛组织的影响及槲皮素的防护作用机制 [J]. 安徽医药, 2016, 20(1): 17-21.
- [16] 柳航, 胡巍, 方芸. 紫花地丁乙酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 安徽医药, 2015, 19(6): 1068-1071.
- [17] 贾景景, 郭中原, 梁曜华, 等. 槲皮素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(23): 2013-2017.
- [18] YUAN J, WONG IL, JIANG T, et al. Synthesis of methylated quercetin derivatives and their reversal activities on P-gp- and BCRP-mediated multidrug resistance tumour cells [J]. Eur J Med Chem, 2012, 8(54): 413-422.
- [19] 于姝燕, 杨跃, 郑永胜, 等. 槲皮素-3'-氨基酸酯盐酸盐的合成研究 [J]. 化学研究与应用, 2008, 20(5): 631-635.
- [20] CHENGLONG WU, LI CHENG, YING LI, et al. Syntheses of the ammonium salts of 7-carbamate derivatives of quercetin [J]. Letters in Organic Chemistry, 2007, 4(5): 366-369.

(收稿日期: 2017-10-20, 修回日期: 2018-02-01)

◇ 编读往来 ◇

《安徽医药》关于文稿中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位实行国务院1984年2月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并以单位符号表示,具体使用参照1991年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{天}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;组合单位符号中表示相除的斜线多于1条时,应采用负数幂的形式表示,如 ng/kg/min 应采用 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式;组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,如前例不采用 $\text{ng/kg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的形式。