

束序苧麻中的抗肿瘤活性成分及其构效关系研究

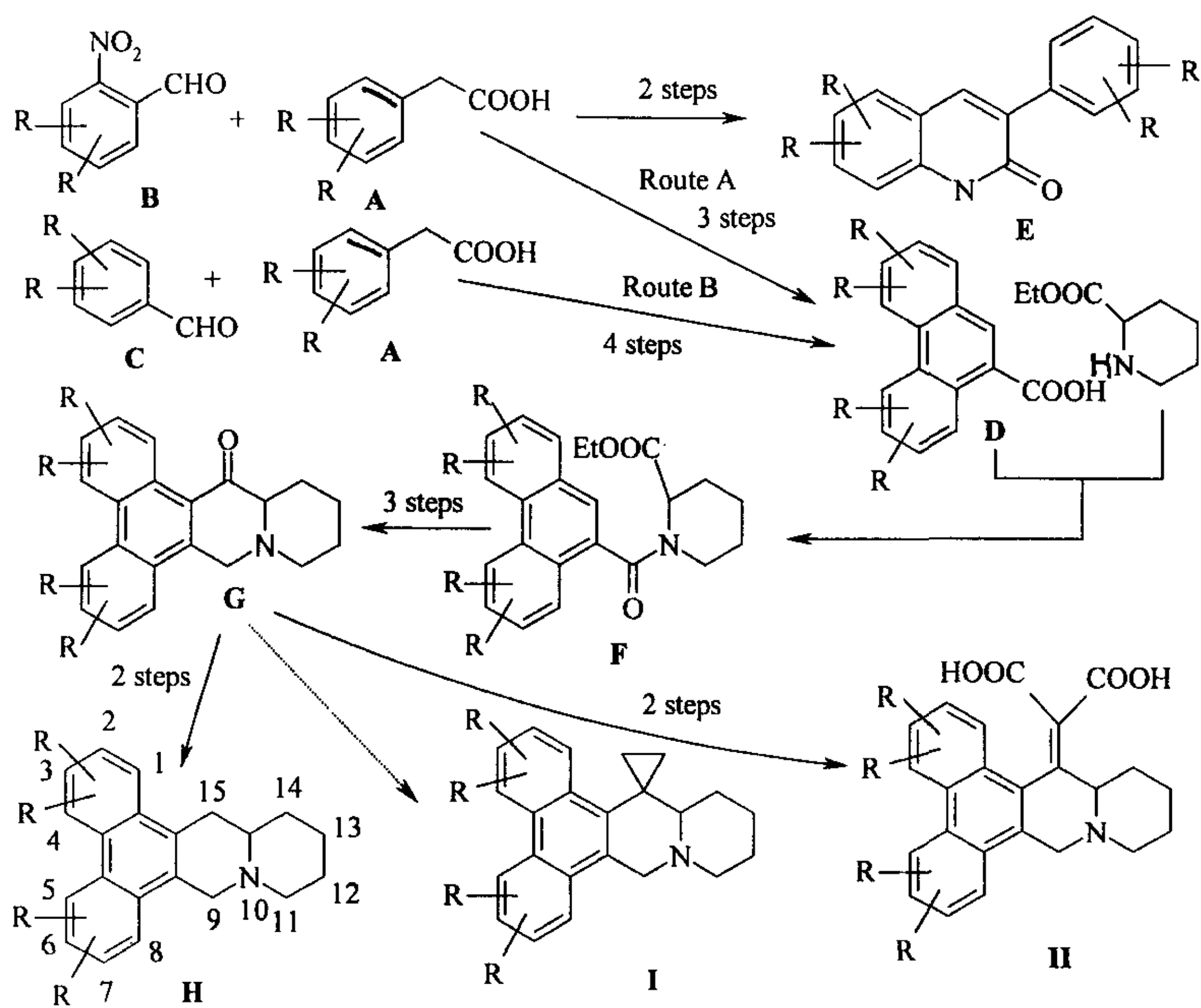
摘 要

在体外活性筛选中发现蓼科苧麻属植物束序苧麻 (*Boehmeria siamensis*) 具有抗肿瘤活性。通过活性跟踪, 我们从束序苧麻的乙醇提取物中分离到具有抗肿瘤活性的化合物——束序苧麻素 A, 其结构鉴定为 3,6,7-三甲氧基-11,12,13,14,14a,15-六氢-9*H*-菲[9,10-*b*]并喹啉里西定 ($GI_{50}=0.2\sim100$ ng/mL)。同时分离到抗肿瘤活性显著弱于束序苧麻素 A 的化合物——束序苧麻素 B (3,7-二甲氧基-6-羟基-11,12,13,14,14a,15-六氢-9*H*-菲[9,10-*b*]并喹啉里西定)。研究表明束序苧麻素 A 使肿瘤细胞的生长停留在 G1 期, 并诱导乳腺癌细胞向正常的脂肪细胞分化。

由于束序苧麻素 A 和 B 在植物中的含量太低; 加之由束序苧麻素 A 和 B 的活性看出, 菲环上的取代基对抗肿瘤活性有较大影响。因此我们成功地合成了束序苧麻素 A 以及在菲环上不同位置含不同个数的甲氧基取代的类似物 **II**, 目的在于深入研究此类生物碱的构效关系。

束序苧麻素 A 不稳定并有中枢神经毒性, 为此我们设计并探索了 C-15 位环丙烷化的 **I** 和 C-15 位二羧基亚甲基化的菲并喹啉里西定生物碱 (**II**) 的合成。拟通过 **I** 考察 C-15 位季碳化对此类生物碱的活性和稳定性的影响, 通过 **II** 探讨增加分子的极性从而降低或避免此类化合物的神经毒性的可能性。

在合成中间体 **D** 的过程中, 我们获得合成具有抑制肿瘤细胞迁移、促性腺激素释放激素受体拮抗剂和 5-羟色氨拮抗剂的 3-芳基-2-喹啉酮类化合物 **E** 的新方法 (总收率>80%)。



关键词：束序苈麻素 A，束序苈麻素 B，束序苈麻，抗肿瘤活性，菲并喹诺里西定生物碱，构效关系

Cytotoxic Alkaloids from *Boehmeria siamensis* and Their Structure-Activity Relationship

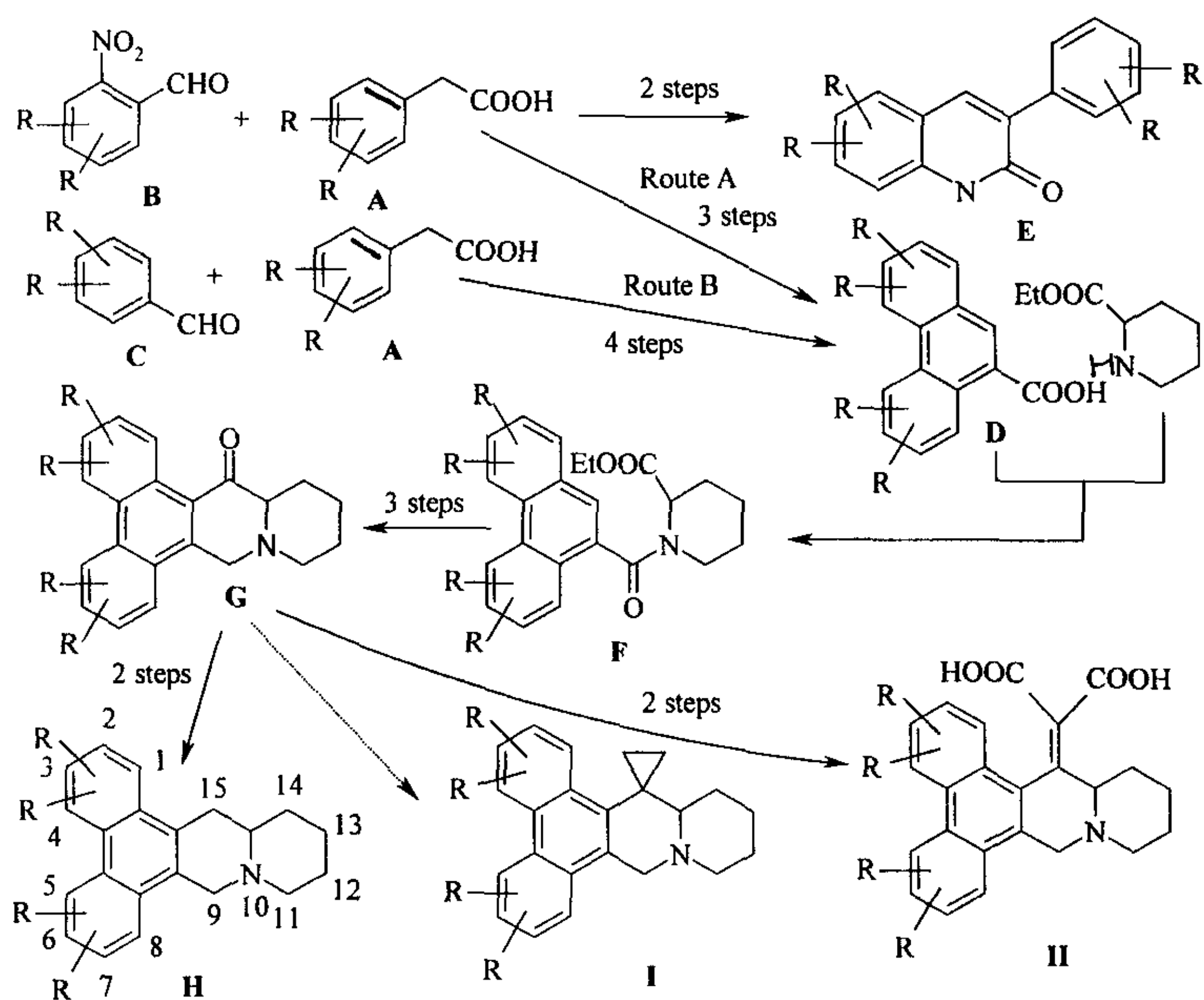
Yinggang Luo (Organic Chemistry)

Directed by Prof. Guolin Zhang

ABSTRACT

Boehmeriasin A, a cytotoxic alkaloid, was isolated along with boehmeriasin B from the aqueous ethanolic extract of *Boehmeria siamensis* Craib (Urticaceae) based on bioassay-guided fractionation. The cytotoxicity of Boehmeriasin B is lower than that of boehmeriasin A. On the basis of spectral evidence, the structures of boehmeriasins A and B were determined to be 3,6,7-trimethoxy- and 3,7-dimethoxy-6-hydroxy-11,12,13,14,14a,15-hexhydro-9*H*-phenanthro[9,10-*b*]quinolizidine, respectively. Boehmeriasin A possesses cytotoxic activity against 12 cell lines from 6 panels of cancer including lung cancer, colon cancer, breast cancer, prostate cancer, kidney cancer and leukemia with GI_{50} between 0.2 and 100 ng/ml. The investigation on mechanism indicated that the cancer cells were arrested in G1 phase by boehmeriasin A. Meanwhile boehmeriasin A could induce differentiation of cancer cells.

Boehmeriasin A and its analogues with methoxy groups at different C-atoms on phenanthrene moiety (**H**) were synthesized in order to study their structure-activity relationship, considering the sharp influence of the substituents on phenanthrene moiety as shown by the cytotoxicity of boehmeriasins A and B as well as the very low contents of them in plants.



To avoid the unstability and central nerve system toxicity, attempts to synthesis of derivatives of **H** corresponding to cyclopropanation (**I**) and dicarboxylmethylenation (**II**) were carried out.

A novel strategy to synthesis of 3-Aryl-2-quinolone (**E**) with quantitative yield was discovered in the course of transformation of 6-nitro- α -phenylcinnamic acid to 6-amino- α -phenylcinnamic acid.

At the end, the distribution, elucidation, total synthesis and biological activity of phenanthroquinolizidine alkaloids was reviewed.

Key words: Boehmeriasin A, Boehmeriasin B, *Boehmeria siamensis* Craib, cytotoxic activity, phenanthroquinolizidine alkaloids, structure-activity relationship.

目 录

└─┬─┐ 文摘

└─┬─┐ 英文文摘

└─┬─┐ 第一章束序苧麻中的抗肿瘤活性成分

└─┬─┐ 1. 结果与讨论

└─┬─┐ 1.1 化合物的结构鉴定

└─┬─┐ 1.2 束序苧麻素 A 的活性测试

└─┬─┐ 1.3 讨论

└─┬─┐ 2. 实验部分

└─┬─┐ 2.1 仪器和条件

└─┬─┐ 2.2 植物来源

└─┬─┐ 2.3 提取及分离

└─┬─┐ 2.4 结构鉴定

└─┬─┐ 2.5 束序苧麻素 A 抑制人体恶性肿瘤细胞体外生长活性实验

└─┬─┐ 2.6 束序苧麻素 A 的抗肿瘤作用机理的初步研究实验

└─┬─┐ 第二章束序苧麻 A 及其类似物的合成及构效关系研究

└─┬─┐ 1. 反合成分析

└─┬─┐ 1.1 菲环不同取代的菲并喹诺里西定型生物碱

└─┬─┐ 1.2 C-15 位环丙烷化和二羧基亚甲基化的两类菲并喹诺里西定型生物碱

└─┬─┐ 2. 全合成研究

└─┬─┐ 2.1 9-菲基甲酸类化合物(合成前体 B)的合成

└─┬─┐ 2.2 11, 12, 13, 14, 14a, 15-六氢-9H-菲[9, 10-b]并喹诺里西定-15-酮类化合物的合成

└─┬─┐ 2.3 11, 12, 13, 14, 14a, 15-六氢-9H-菲[9, 10-b]并喹诺里西定类化合物的合成(式 2-10)

└─┬─┐ 2.4 C-15 位环丙烷化(类型 I)的衍生物的合成探索(式 2-11)

└─┬─┐ 2.5 C-15 位二羧基亚甲基化(类型 II)的衍生物的合成探索

└─┬─┐ 3. 小结

└─┬─┐ 4. 实验部分

└─┬─┐ 4.1 仪器

└─┬─┐ 4.2 溶剂的无水处理

└─┬─┐ 4.3 化合物的合成

└─┬─┐ 第三章菲并喹诺里西定型生物碱的研究进展

└─┬─┐ 1. 菲并喹诺里西定型生物碱在自然界中的分布

└─┬─┐ 2. 菲并喹诺里西定型生物碱的结构鉴定、绝对构型的确定及稳定性

└─┬─┐ 3. 菲并喹诺里西定型生物碱的化学全合成

└─┬─┐ 3.1 先构建菲片段, 再构建喹诺里西定片段

└─┬─┐ 3.2 先合成喹诺里西定部分后合成菲片段

└─┬─┐ 4. 菲并喹诺里西定型生物碱类似物及构效关系研究

└─┬─┐ 5. 菲并喹诺里西定型生物碱的生物活性及作用机理

└─┬─┐ 5.1 菲并喹诺里西定型生物碱的生物活性

└─┬─┐ 5.2 菲并喹诺里西定型生物碱对蛋白质合成的抑制作用

6. 结论	
参考文献	
附图	
个人简历	
发表文章	
致谢	

量 NaOH 后引起的约 10 nm 的紫外红移现象说明分子中存在酚羟基。化合物 **2** 与化合物 **1** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图非常相似，差别在于化合物 **2** 的图谱中少一个甲氧基的信号（表 1-1）。根据 NIOSY 实验结果（H-2 与 H-2 和 H₃-3-OMe，H-4 与 H₃-3-OMe 和 H-5 以及 H-8 和 H₃-7-OMe 之间的 NOESY 相关信号）确定化合物 **2** 中的 6-位应为羟基取代（图 1-2）。因此化合物 **2** 被鉴定为 3,7-二甲氧基-6-羟基-11,12,13,14,14a,15-六氢-9*H*-菲[9,10-*b*]并喹啉里西定（束序苧麻素 B）（图 1-2）。束序苧麻素 B 可经简单的甲基化反应转化为束序苧麻素 A（见 2.4.3）。

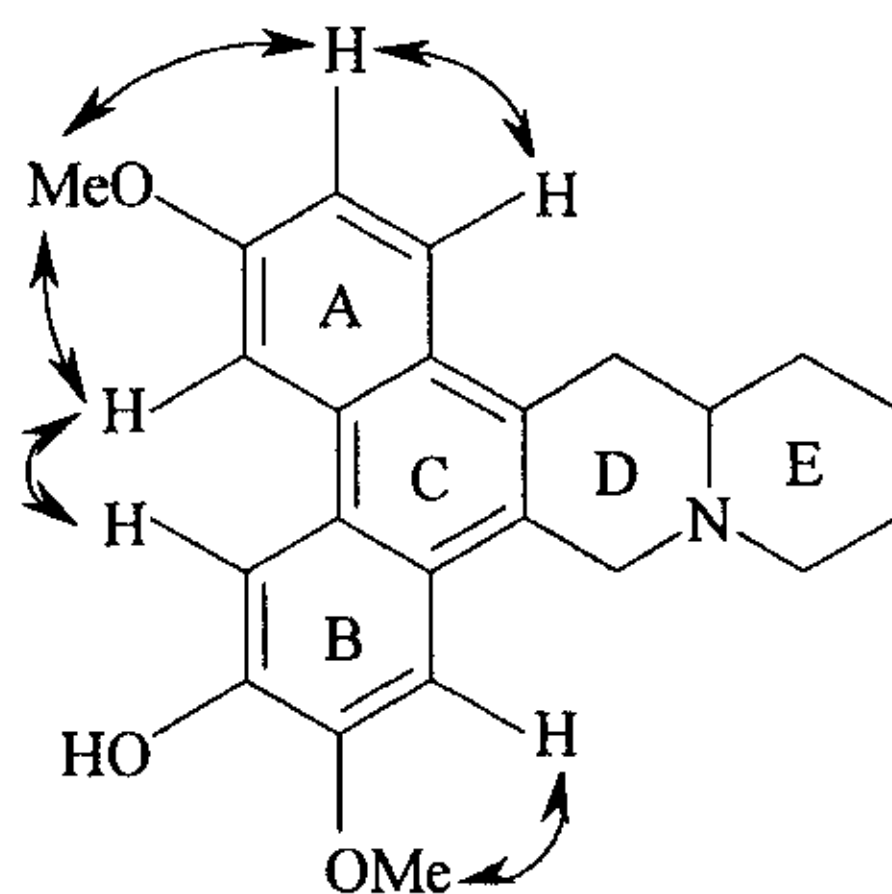


图 1-2 化合物 **2** 的 NOESY ($\leftrightarrow$) 谱中的重要相关

Figure 1-2 The key NOESY correlation of compound **2**

1.2 束序苳麻素 A 的活性测试

1.2.1 束序苳麻素 A 的体外抗肿瘤活性

表 1-2 束序苳麻素 A (1)的抗肿瘤活性 (GI_{50} : ng/ml)Table 1-2 The GI_{50} values of boehmeriasin A (1) against human tumor cell lines

Cell type	Compound 1	Taxol	Cell type	Compound 1	Taxol
K562	100	>100	MCF-7	5	80
HL-60	5	77	MDA-MB-231	3	40
DU-145	2	40	ACHN	0.3	>100
PC-3	5	44	UO-31	0.4	>100
A549	0.3	30	HT-29	0.2	40
NCI-H460	0.3	20	COLO-205	0.3	40

如 Table 1-2 所示, 束序苳麻素 A 对六种肿瘤共 12 个细胞系的生长具有抑制作用, 相应的 GI_{50} 值说明束序苳麻素 A 抗肿瘤作用非常强。

1.2.2 束序苳麻素 A 的抗肿瘤作用机理的初步研究

1.2.2.1 束序苳麻素 A 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞生长的影响

向乳腺癌细胞中加入不同浓度的束序苳麻素 A, 作用 24 小时后, SRB 染色法检测细胞增殖情况: 随着药物浓度从 7×10^{-5} ug/mL 上升至 7×10^{-3} ug/mL, 癌细胞的增殖随之减少。束序苳麻素 A 对乳腺癌细胞的生长抑制呈浓度依赖性, 完全生长抑制浓度为 7×10^{-3} ug/mL。当药物浓度继续上升 10 倍、100 倍时, 有较少细胞死亡, 死亡率不超过 20%。

向 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中加入 7×10^{-3} ug/ml 的束序苳麻素 A, 观察药物作用时间对癌细胞生长的影响。结果发现, 给药后 12 小时至 96 小时内, 细胞基本既没有增殖, 也没有死亡, 而空白对照组则一直处于良好的增殖状态。

1.2.2.2 束序苳麻素 A 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞生长周期的影响

为检测束序苳麻素 A 导致细胞生长滞留在哪一时期, 药物处理细胞后, 进行流式细胞术测定细胞周期分布时相。结果如下:

以浓度为 $7 \times 10^{-3} \text{ug/ml}$ 的药物处理 12 或 24 小时后, G1 期细胞比例由加药前的 45.2% 分别上升为 64.0 和 67.2%, S 期细胞则由 35.7% 下降为 24.3% 和 24.9%。

不同浓度药物处理细胞 48 小时后, 亦呈现出 G1 期细胞所占比例大幅度增加, S 期细胞减少, 而 G2 期细胞变化不大, 而且随着药物浓度的增加, 这种变化越明显。

以上结果说明束序苳麻素 A 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞后, 分裂相细胞减少, 细胞生长滞留在 G1 期。另外, 检测结果还显示, 该药物作用后凋亡细胞很少, 当浓度高达 $7 \times 10^{-1} \text{ug/mL}$ 并作用 48 小时后, 诱导的凋亡细胞比例为 15.2%, 而浓度为 $7 \times 10^{-3} \text{ug/mL}$ 的束序苳麻素 A 则基本上不诱导细胞凋亡。

1.2.2.3 束序苳麻素 A 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞形态的影响

浓度为 $7 \times 10^{-3} \text{ug/mL}$ 的束序苳麻素 A 作用于 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 24 小时后, 乳腺癌细胞出现明显的形态学变化, 即细胞拉长呈长梭形, 药物作用 3 天后, 光镜下可见少数细胞胞浆内开始有一些明亮的类似于脂滴的颗粒堆积。随着药物作用时间的延长, 细胞进一步变细变长, 且明亮的颗粒堆积愈加明显。进一步的细胞油红染色试验表明, 这些明亮颗粒确实为能被油红着色的脂滴 (图 1-3 到 1-5)。

后于 564nm 测定光吸收值。

2.6.2 流式细胞术

收获细胞用 70% 乙醇固定，测定前去乙醇，PBS 洗涤后加入 50ug/ml 碘化丙啉(propidium iodide, PI), 1%Triton X-100, 0.1M PBS 于 4℃染色 30 min 。用流式细胞仪测定结果经计算机处理，计算出各期细胞和调亡细胞百分比。

2.6.3 脂质油红染色

将常规培养的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞接种于 24 孔板内，贴瓶后加入不同浓度的束序苎麻素 A，继续培养 3-7 天。弃培养上清，加入 10%甲醛固定细胞 1 小时，用蒸馏水洗细胞，用油红(0.16g 油红染料溶解于 80%的醋酸中) 染色 5-10 分钟，直至脂滴着红色时终止染色。

