

文章编号: 1674-8085(2020)05-0022-04

SN38 与呋咱氮氧化物偶联物的合成 及抗肿瘤活性研究

*戴 一¹, 贾晓益², 宋祖荣¹

(1. 安徽新华学院药学院, 安徽, 合肥 230088; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽, 合肥 230013)

摘 要: SN38 为喜树碱类拓扑异构酶抑制剂。本研究以羧基呋咱氮氧化物与 SN38 的酚羟基成酯合成制备 SN38 与呋咱氮氧化物的偶联物, 采用 griess 法、MTT 法及划痕实验分别测定了该偶联物的体外 NO 释放、抗肿瘤活性及抗肿瘤转移活性。结果显示合成的 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物 24 h 体外释放 NO 达 32.4%, 抗肿瘤活性比 SN38 及 SN38 与呋咱氮氧化物的混合物更强, 且具有一定的抗转移活性。可见 SN38 与呋咱氮氧化物的偶联物表现出显著的协同效应。

关键词: SN38; 呋咱氮氧化物; griess 法; 抗肿瘤; 抗转移

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2020.05.005

SYNTHESIS AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF CONJUGATE OF SN38 AND FUROXANS

*DAI Yi¹, JIA Xiao-yi², SONG Zu-rong¹

(1. Pharmacology College, Anhui Xinhua University, Hefei, Anhui 230088, China;

2. Pharmacology College, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230013, China)

Abstract: SN38 is a topoisomerase inhibitor of camptothecin alkaloids type. The conjugate of SN38 and furoxans was synthesized through esterification of furoxan containing carboxyl with phenol hydroxyl of SN38. The NO release, antitumor activity and anti-metastasis activity of the conjugate of SN38 and furoxans *in vitro* were determined by Griess method, MTT method and scratch assay respectively. The results showed that the conjugate of curcumin and furoxans could be prepared. The percent of NO release from conjugate of SN38 and furoxans was 32.4% *in vitro* in 24 h. The anti-tumor activity of conjugate of SN38 and furoxans is more potent than those of SN38, or mixture of SN38 and furoxans. Moreover, the conjugate of SN38 and furoxans has anti-metastasis activity. These results indicated that the conjugate of SN38 and furoxans has significant synergistic effects.

Key words: SN38; furoxans; griess method; anti-tumor; anti-metastasis

7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)为喜树碱衍生物, 它是喜树碱衍生物中活性最好的化合物之一, 同其他喜树碱类化合物一样, 通过抑制拓扑异构酶 I

阻滞 DNA 的复制而发挥抗肿瘤作用^[1], 其前药即是获得 FDA 批准的临床用药伊立替康。伊立替康水溶性相比于 SN-38 有了提高, 但体外活性比

收稿日期: 2020-06-06; 修改日期: 2020-07-29

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81603362); 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2019A0873); 安徽新华学院中药量效关系研究团队(kytd201908)

作者简介: *戴 一(1979-), 男, 安徽利辛人, 副教授, 博士, 主要从事活性天然产物研究(E-mail:daiyiii@163.com);

贾晓益(1978-), 女, 安徽合肥人, 副教授, 博士, 主要从事抗炎药理研究(E-mail:jiaxiaoyi78@126.com);

宋祖荣(1977-), 女, 安徽凤阳人, 副教授, 硕士, 主要从事中医药药理研究(E-mail:szr77@126.com).

SN-38 低 100-1000 倍^[2]。尽管伊立替康在体内经羧酸酯酶代谢形成 SN-38, 但仅有使用剂量的 2%~8% 能转化成 SN-38^[3]。另外 SN38 不能抑制肿瘤的转移, 肿瘤的转移是导致癌症患者死亡的重要因素之一, 因此, SN-38 的改造依然受到很大的关注。

一氧化氮(NO)作为一种气态信使分子, 具有多种生理活性^[4], 高剂量 NO (微摩尔浓度) 可以抑制肿瘤生长^[5]及逆转肿瘤的耐药性^[6]。在抗肿瘤转移方面, NO 供体可以下调金属基质蛋白酶(MMP)^[7]、N-myc 下游调节基因-1 (NDRG1)^[8]、细胞粘附分子(CAMs)的活性及抑制肿瘤细胞表面的微泡形成等, 从而阻止肿瘤的侵袭转移^[9]。NO 供体种类繁多, 常见的为硝酸酯类, 如临床上使用的硝酸甘油、硝酸异山梨酯等^[10], 但硝酸酯类结构不稳定, 且受撞击易爆等。现今受到关注的 NO 供体多为 N-偶氮烯二醇类、亚硝基硫醇类及呋咱氮氧化物类^[11]。由于呋咱氮氧化物在酸碱中均具有较好的稳定性, 且易于制备, 得到较多的应用。拼合原理是药物化学普遍采取的药物设计策略, 可以起到多药协同的效果^[12]。受此启示, 本研究设计合成了 SN38

与呋咱氮氧化物的偶联物, 以期达到二者的协同抗肿瘤效果、为 SN38 新体系研究开发提供参考。

1 仪器与试剂

Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ 三合一质谱仪, BrukerACF-400 型核磁共振仪, bio-rad mode680 酶标仪, SN38 购于阿拉丁试剂有限公司。DEME 培养基、胎牛血清 FBS、MTT 均购置于生工生物工程(上海)股份有限公司, 其他试剂均为分析纯。受试鼠乳腺癌 4T1 细胞及人肺癌 A549 细胞来自于美国 ATCC 公司。

2 方法与结果

2.1 合成路线

首先合成呋咱氮氧化物 **2**, 再在 EDCI、DMAP 存在条件下与 SN38 酚羟基成酯制备出 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物 **1**, 结果见图 1。产物经 NMR、MS 确认结构。

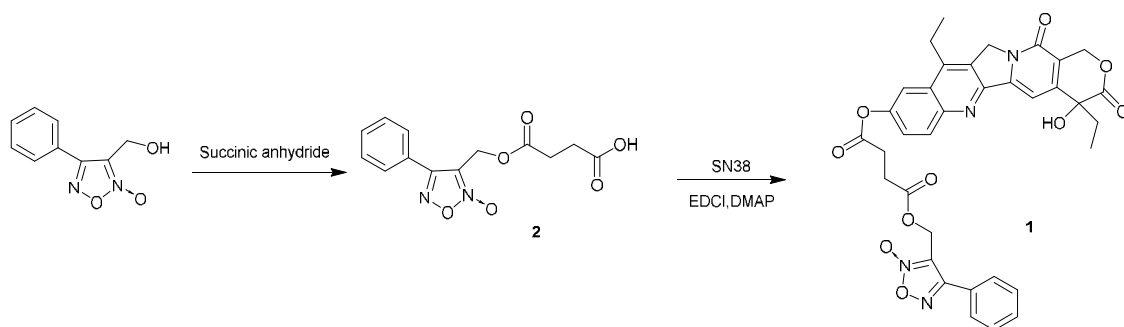


图 1 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物的合成
Fig. 1 Synthesis of conjugate of SN38 and furoxans

2.2 化合物 2 的合成

按文献报道^[13]合成, 首先以肉桂醇(10.74 g, 80 mmol)为起始原料, 在 16 mL 冰乙酸溶解后缓慢加入 NaNO₂ 饱和水溶液 20 mL, 控温在 70 °C 以下, 反应完毕, 加水稀释, 以乙醚萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压过滤, 除去乙醚, 所得产物直接用于下步反应。取上步所制化合物(1.152 g, 6 mmol), 丁二酸酐(900 mg, 9 mmol), DMAP(45 mg, 0.4 mmol)溶于 60 mL 二氯甲烷, 室温反应过夜, 反应完毕, 分别用稀盐酸、冰水洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩即得灰白色固体,

收率为 81%, TLC 分析 R_f 约 0.4 (展开剂石油醚: 乙酸乙酯=1: 1); ¹H-NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.78 – 7.64 (m, 2H), 7.64 – 7.43 (m, 3H), 5.13 (s, 2H), 2.74 – 2.53 (m, 4H)。与文献比较分析, 数据相一致。

2.3 化合物 1(即 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物)的合成

取 SN38 (392 mg, 1 mmol)、化合物 **2** (350 mg, 1.2 mmol)、EDCI (380 mg, 2 mmol) 及 DMAP (123 mg, 1.0 mmol) 溶于 20 mL 二氯甲烷中, 室温搅拌反应, TLC 跟踪, 反应完毕, 反应液分别以稀盐酸及饱和

食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压除去二氯甲烷, 粗产物过硅胶柱, 以石油醚: 乙酸乙酯梯度洗脱 (石油醚: 乙酸抑制=5:1~1:1), 得淡黄色固体, 收率为 43%, TLC 分析 R_f 约 0.6 (展开剂为石油醚: 乙酸乙酯=1: 1); UV(MeOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 375 nm(3.53), 227 nm(4.61); ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 0.95 – 1.08 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.33 – 1.44 (t, J = 7.7 Hz, 3H), 1.82 – 1.98 (ddt, J = 16.9, 14.2, 7.1 Hz, 2H), 2.81 – 2.90 (dd, J = 7.6, 5.4 Hz, 2H), 2.98 – 3.07 (dd, J = 7.6, 5.3 Hz, 2H), 3.09 – 3.20 (q, J = 7.7 Hz, 2H), 3.88 – 3.93 (s, 1H), 5.20 – 5.35 (m, 5H), 5.68 – 5.79 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.58 (m, 4H), 7.63 – 7.76 (m, 3H), 7.80 – 7.85 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.19 – 8.27 (d, J = 9.2 Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 7.87, 14.02, 23.18, 28.67, 29.18, 31.62, 49.41, 54.54, 66.32, 72.80, 98.10, 111.12, 114.53, 118.64, 125.21, 125.89, 127.33, 127.42, 127.61, 129.47, 131.47, 132.09, 145.42, 146.77, 147.41, 149.41, 157.61, 170.65, 171.31, 173.86; m/z (ESI-MS) 667.6 $[M+H]^+$ 。

2.4 SN38 与呋喃氮氧化物偶联物体外 NO 释放^[14]

2.4.1 NO 标准曲线绘制

于 96 孔板中分别加入不同浓度 NaNO_2 标准溶液 (50、25、12.5、6.25、3.125、1.56 μM) 100 μL , 复孔 3 个, 每孔再分别加入 Griess 试剂 (含 1.0% 磺胺、5.0% 的磷酸、0.1% N-1-萘乙二胺盐酸盐溶液) 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 10 min, 540 nm 测定吸光度, 得回归方程为 $y = 0.0404x + 0.0561$, $r = 0.9998$ 。表明

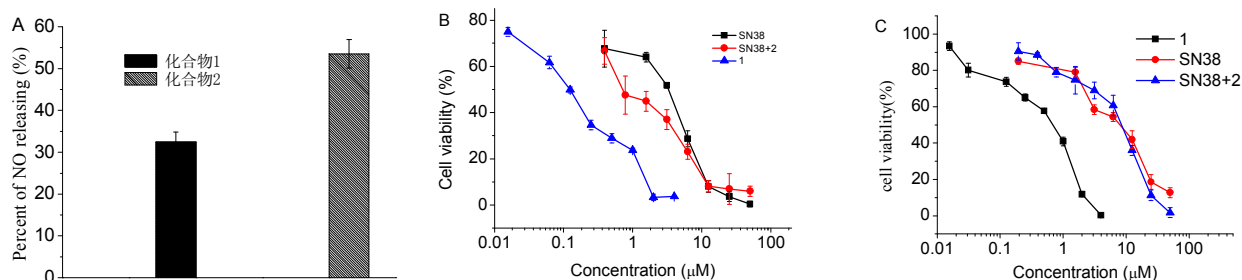
NaNO_2 在 50~1.56 μM 浓度范围内线性关系良好。

2.4.2 SN38 与呋喃氮氧化物偶联物体外 NO 释放

以 pH = 7.4 PBS/乙腈 (1:1) 混合溶剂制备 50 μM 浓度的化合物 1、2 供试液, 加入半胱氨酸 (500 μM) 后 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 24 h。按照 2.4.1 法测定各供试液 540 nm 的吸光度, 计算 24 h NO 的释放程度, 结果见图 2A, 在过量半胱氨酸存在下, 24 h 内化合物 1、2 均具有较高的释放度, 分别达到 32.4% 和 53.5%, 可见化合物 1 的在体外均有较高的 NO 释放度为其抗癌活性的发挥提供了基础。

2.5 SN38 与呋喃氮氧化物偶联物抗肿瘤活性研究

取对数生长期的细胞种植于 96 孔板中, 每孔种植 4000 个细胞, 过夜培养, 以含药培养基替换培养基, 继续孵育 48 h, 吸去含药培养基, 以含 MTT 培养基替换, MTT 浓度为 1 mg/mL, 继续孵育 4 h, 吸去 MTT 培养基, 加入 DMSO 150 μL , 震荡 10 min, 于酶标仪 490 nm 测定吸光度 OD 值, 计算抑制率及 IC_{50} 值。抑制率(%) = $[1 - (\text{A}_{\text{实验组}} - \text{A}_{\text{空白组}}) / (\text{A}_{\text{对照组}} - \text{A}_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。化合物 1、2 及由化合物 1 和 2 按 1:1 摩尔比组成的混合物 MTT 结果显示 (图 2B、2C), 化合物 1 和 SN38 及 SN38+2 对 A549 细胞 IC_{50} 值分别为 0.66、7.78、8.14 μM , 对 4T1 细胞 IC_{50} 值分别为 0.12、3.46、0.71 μM 。可见 SN38 与呋喃氮氧化物的偶联, 显著提高了母体化合物的细胞毒性, 均高于简单的 SN38 与化合物 2 的简单混合效果, 为 SN38 的 NO 供体化的开发提供了依据。



A: NO 释放; B: 对 HepG2 细胞的 MTT 结果; C: 对 A549 细胞的 MTT 结果

图 2 呋喃氮氧化物与 SN38 偶联物的 NO 释放及抗癌活性

Fig.2 The release of NO and anticancer activity from conjugate of SN38 and furoxans

2.6 姜黄素与呋喃氮氧化物偶联物抗转移活性研究

在 6 孔板中种植 4T1 细胞, 长至汇合度达

95%~100%, 用 1 mL 枪头轻轻在细胞上划出十字痕, 以 PBS 洗去划掉的细胞, 加入含药培养基继续培养, 在 0 h 及 24 h 分别以显微镜观察伤口的愈合。

结果如图 3 所示,单独的 SN38 与对照组相似,都可见明显的划痕愈合,而 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物组可见划痕未见明显愈合,说明 SN38 与呋咱氮氧化物的偶联物具有一定的抗肿瘤转移效果。

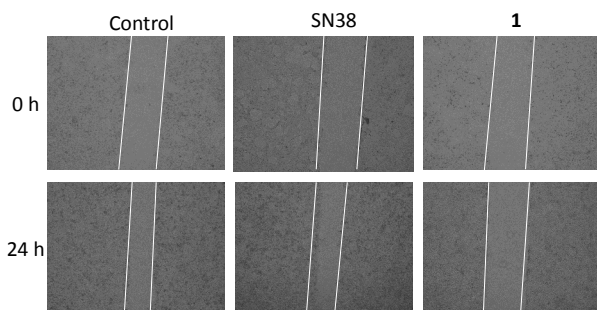


图 3 SN38 与呋咱氮氧化物偶联物抗肿瘤转移作用

Fig.3 The anti-metastasis of conjugate of SN38 and furoxans

3 讨论

SN38 通过抑制拓扑异构酶而发挥抗肿瘤作用,在临床上已较为广泛的使用,但其在使用过程中同样会产生耐药性,其活性有进一步提升的空间,仍具有较大的开发潜力。NO 作为第一个发现的气态信使分子,参与多种生理及病理过程,高浓度一氧化氮可以抑制肿瘤的增殖、转移及逆转肿瘤的耐药性。本研究通过品和原理合成了 SN38 与呋咱氮氧化物的偶联物,该偶联物进入细胞体内,酯键水解释放 NO 和原药 SN38,发挥协同效果。初步体外实验显示,该偶联物可以释放 NO 和具有比母体更强的抗肿瘤活性,同时具有一定的抗肿瘤转移作用,值得进一步开发研究。

参考文献:

[1] Pommier Y. DNA Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, Biology, and Interfacial Inhibition[J]. Chem Rev, 2009,109 (7):2894-2902.
[2] Mathijssen RHJ, van Alphen R J, Verweij J,et al. Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11)[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7 (8):2182-2194.
[3] Slatter J G, Schaaf LJ, Sams J P, et al. Pharmacokinetics,

metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients[J]. Drug Metab Dispos, 2000, 28(4): 423-433.

- [4] 马超,袁文金,吴红云,等. 不同强度远程缺血预适应对稳定型心绞痛患者运动耐力、血清一氧化氮及内皮素的影响[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2018, 39(4):92-94.
[5] Wink D A, Vodovotz Y, Laval J, et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(5):711-721.
[6] Riganti C, Miraglia E, Viarisio D, et al. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux [J]. Cancer Res, 2005, 65(2):516-525.
[7] Cheng H, Wang L, Mollica M, et al. Nitric oxide in cancer metastasis[J]. Cancer Lett, 2014,353(1):1-7.
[8] Hickok J R, Sahni S, Mikhed Y, et al. Nitric oxide suppresses tumor cell migration through N-Myc downstream-regulated gene-1 (NDRG1) expression: role of chelatable iron[J]. J Biol Chem, 2011, 286(48):41413-41424.
[9] Kang F H, Zhu J Y, Wu J B, et al.O²-3-Aminopropyl diazeniumdiolates suppress the progression of highly metastatic triple-negative breast cancer by inhibition of microvesicle formation via nitric oxide-based epigenetic regulation[J]. Chem Sci, 2018, 9(34), 6893-6898.
[10] 李娜,廖晶,胡文,等. 1 例原发性高血压合并心、肾功能不全患者的药学监护[J]. 井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(6):93-97.
[11] Riccio D A, Schoenfisch MH. Nitric oxide release: Part I. Macromolecular scaffolds[J]. Chem Soc Rev, 2012, 41(10):3731-3741.
[12] Kiberstis P A, Travis J. Stocking oncology's medicine cabinet [J]. Science, 2017, 355(6330):1142-1143.
[13] 戴一,曹殿洁. 白藜芦醇与呋咱氮氧化物偶联物的合成及抗肿瘤活性研究[J].天然产物研究与开发, 2019,31(3):502-505.