

薯蓣皂苷元衍生物抗肿瘤的结构效关系研究

蒋红平, 吴亚克, 郑 微, 曾春玲, 傅微微, 范举正*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 为阐明薯蓣皂苷元衍生物的体外抗肿瘤活性的构效关系, 基于 Bcl-2 蛋白小分子抑制剂的三维药效团模型的特点, 本研究利用 autodock4.2 将薯蓣皂苷元衍生物和 Bcl-2 进行了大量对接及分析, 选择性的合成了 31 个化合物, 采用 MTT 法测定了这些化合物对 A375、A549、HepG-2 和 K562 等 4 个肿瘤细胞株的体外抗肿瘤活性。初步的构效关系研究表明, 薯蓣皂苷元失 F 环的 26-位脂肪酸酯、芳香酸酯类衍生物几乎没有活性; 薯蓣皂苷元三氮唑溴盐类衍生物均具有较好的体外抗肿瘤活性, 且三氮唑上连有较大的疏水基团的衍生物的活性更好; 薯蓣皂苷元及其失 F 环的杂环类、薯蓣皂苷元失 F 环氨基酸酯类衍生物能形成较强氢键、偶极作用的衍生物的活性更好。

关键词: 薯蓣皂苷元衍生物; Bcl-2; 体外抗肿瘤活性; 构效关系

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 05-0539-09

Structure-activity relationship of diosgenin derivatives as Bcl-2 antagonists

JIANG Hong-ping, WU Ya-ke, ZHENG Wei, ZENG Chun-ling, FU Wei-wei, FAN Ju-zheng*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The purpose of this paper is to clarify the structure-activity relationship of anti-tumor activity of diosgenin derivatives *in vitro*. Study has found that diosgenin can inhibit the reproduction of tumor cells by inducing apoptosis and the main target spot of this effect is Bcl-2. Based on the characteristics of pharmacophoric points' of the three-dimensional pharmacophore for Bcl-2 inhibitors, we have docked lots of diosgenin derivatives with Bcl-2, then synthesized 31 compounds of them, finally assessed the anti-tumor activity of the diosgenin derivatives *in vitro* against A375, A549, HepG-2 and K562. Preliminary studies of SAR have indicated that the aliphatic esters, and aromatic esters of diosgenin without F ring have no anti-tumor activity *in vitro*. The triazole bromides of diosgenin all achieve fairly good anti-tumor activity *in vitro*, and those with larger hydrophobic group have the better activity. The stronger is the hydrogen bonding interaction and dipole-dipole interaction of the heterocyclic of diosgenin and diosgenin without F ring and the acid ester of diosgenin without F ring, the better is the activity of derivatives.

Key words: diosgenin derivative; Bcl-2; anti-tumor activity *in vitro*; SAR

薯蓣皂苷元是一种天然的甾体化合物, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、降血脂、祛痰、溶血等多种生物活性^[1, 2]。近年来, 研究发现薯蓣皂苷元对 1547、M4Beu、HT-29、K562、HeLa、HEL 等细胞都有抑制生长并诱导其凋亡的作用^[3-7]。目前的研究结果表

明, 薯蓣皂苷元通过诱导细胞凋亡起到抑制肿瘤细胞生长的作用, 线粒体是其发挥抗肿瘤作用的主要靶点^[8, 9]。薯蓣皂苷元诱导细胞凋亡的可能机制为: 薯蓣皂苷元竞争性抑制 Bcl-2 亚家族蛋白和 Bcl-2 受体的结合, 释放出 Bcl-2 亚家族 (bax、bak 等) 促凋亡蛋白, 使线粒体释放 Cyt c, 导致细胞内凋亡通路下游的因子释放, 从而导致细胞凋亡^[10, 11]。

收稿日期: 2010-12-15.

*通讯作者 Tel: 86-28-85503222, E-mail: David-811@163.com

目前对薯蓣皂苷元的研究主要集中在药代动力学改善、提高治疗心血管疾病的生物活性等方面, 研究其衍生物抗肿瘤活性的文献报道很少^[12, 13]。基于已构建的细胞凋亡线粒体途径中的关键受体 Bcl-2 蛋白的小分子抑制剂三维药效团模型^[14], 作者运用 autodock4.2 将大量薯蓣皂苷元衍生物与 Bcl-2 进行了对接及分析, 选择合成了 31 个化合物, 其中部分化合物为已知化合物^[15–17], 采用 MTT 法测定了它们对 K562、HEPG-2、A375、K562 等 4 种肿瘤细胞株的体外抗肿瘤活性, 并结合薯蓣皂苷元衍生物的结构与 autodock4.2 对接结果以及体外抗肿瘤活性数据, 探讨了几类薯蓣皂苷元衍生物的体外抗肿瘤活性的初步构效关系, 该研究在国内外还未见报道, 对薯蓣皂苷元衍生物的抗肿瘤活性的进一步开发具有一定的参考意义。

1 衍生物的设计

作者对薯蓣皂苷元及其失 F 环的母体结构进行了一系列修饰, 经过大量对接 (图 1a, 1b), 选择合成了化合物 1~31 (图 2), 将这些衍生物分为二类:

1.1 针对疏水作用的衍生物设计 以咪唑、三氮唑或碳链连接, 再在三氮唑上引入疏水基团, 探索薯蓣皂苷元三氮唑溴盐类衍生物末端疏水基团的大小对体外抗肿瘤活性的影响。合成了化合物 3~11, 考察了连接基团的性质、疏水基团的大小等因素。

1.2 针对偶极作用、氢键作用的衍生物设计 利用化合物 1、2 和化合物 16~19 来考察薯蓣皂苷元脂肪

酸酯、芳香酸酯类衍生物的偶极、氢键作用的强弱对抗肿瘤活性的影响, 设计化合物 12~14 和 20~31 来探索薯蓣皂苷元及其失 F 环杂环衍生物、薯蓣皂苷元失 F 环氨基酸酯类衍生物的氢键、偶极作用的强弱对衍生物抗肿瘤活性的影响。

1.3 化合物的合成路线 以薯蓣皂苷元为原料, 在 3 位进行酰化、取代得化合物 12~15; 在 3 位乙酰化保护后, 将 F 环开环, 经酯化得化合物 21、23、25, 经取代得化合物 29~31, 见合成路线 1。

2 结果与讨论

2.1 化学部分 目标化合物, 经 ¹H NMR、¹³C NMR 确证其结构, 数据见表 1 和表 2。

2.2 化合物 1~31 的体外抗肿瘤活性 采用 MTT 法, 对人恶性黑色素瘤细胞株 A375、人肺腺癌细胞株 A549、人肝癌细胞株 HepG-2 和人慢性髓原白血病细胞 K562 进行 3 次重复试验, 以文献^[12]报道的 1-(3 β -薯蓣皂苷元)-3-苄基咪唑溴盐 (由实验室按文献的方法合成) 为阳性对照品, 结果如表 3~6 所示, 所有活性数据的 IC₅₀ 值为 3 次重复试验的平均值。

2.3 构效关系讨论 利用咪唑、三氮唑一类含氮杂环作为连接基团, 再在三氮唑上修饰相应的疏水基团, 由化合物 3~11 (表 3) 可以看出, 以氮杂环连接的薯蓣皂苷元衍生物都有较好的体外抗肿瘤活性, 总的趋势是: 咪唑溴盐类 > 1, 2, 3-三氮唑溴盐类 > 1, 2, 4-三氮唑溴盐类, 三氮唑上疏水作用较强的化合物 > 三氮唑上疏水作用较弱的化合物, 其中已知化

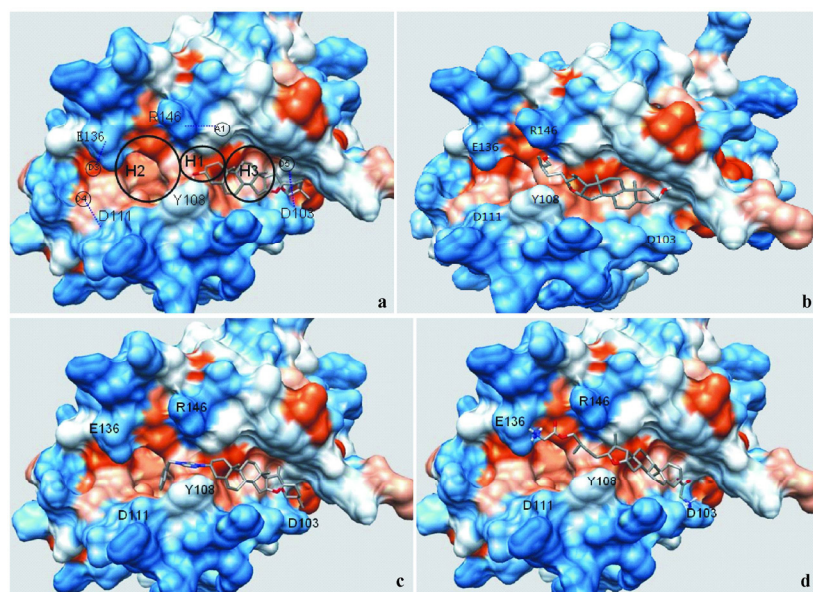


Figure 1 Docking models. a: The docking model of diosgenin with Bcl-2; b: The docking model of diosgenin without F ring with Bcl-2; c: The docking model of compound 9 with Bcl-2; d: The docking model of compound 26 with Bcl-2

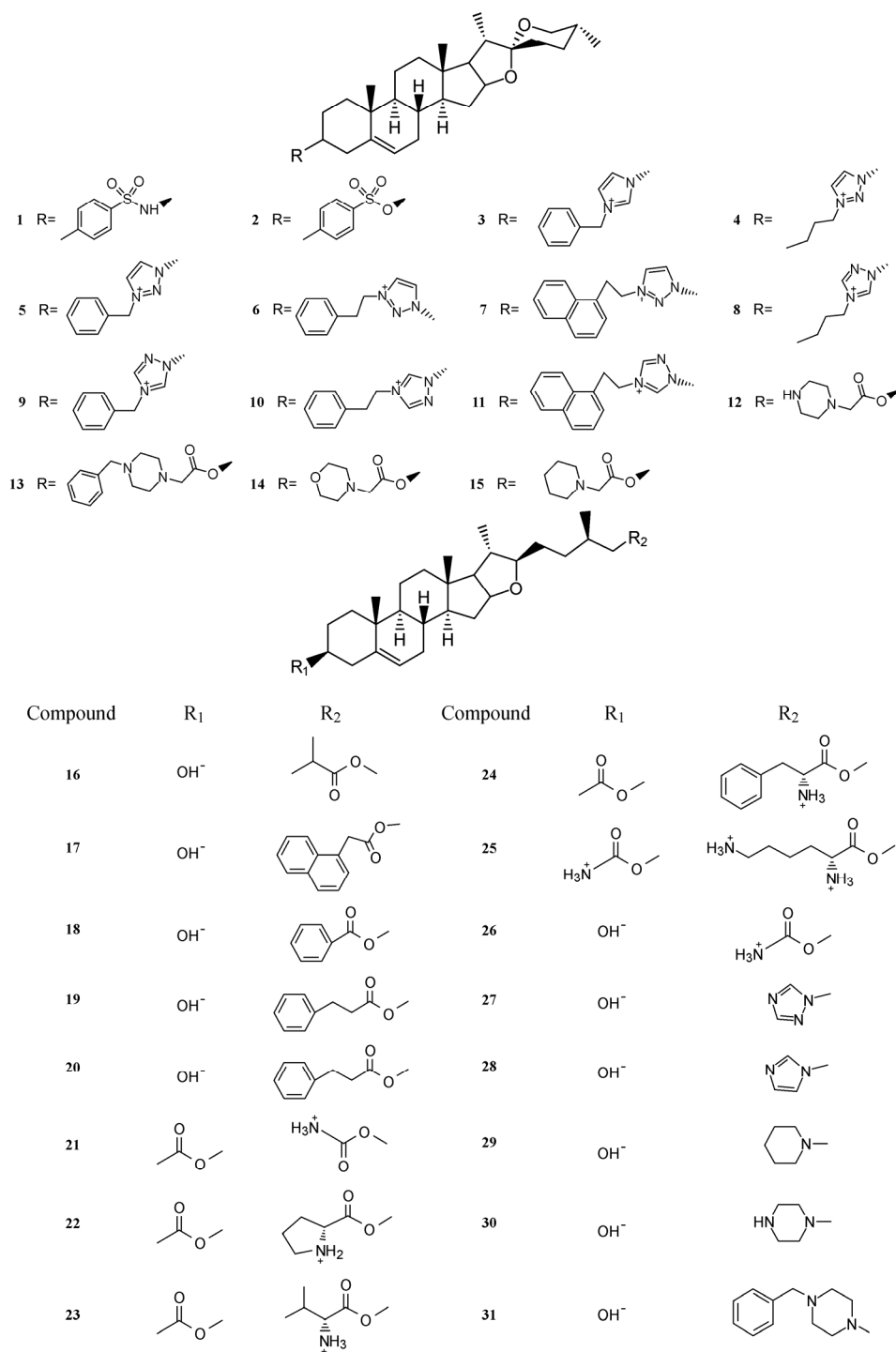
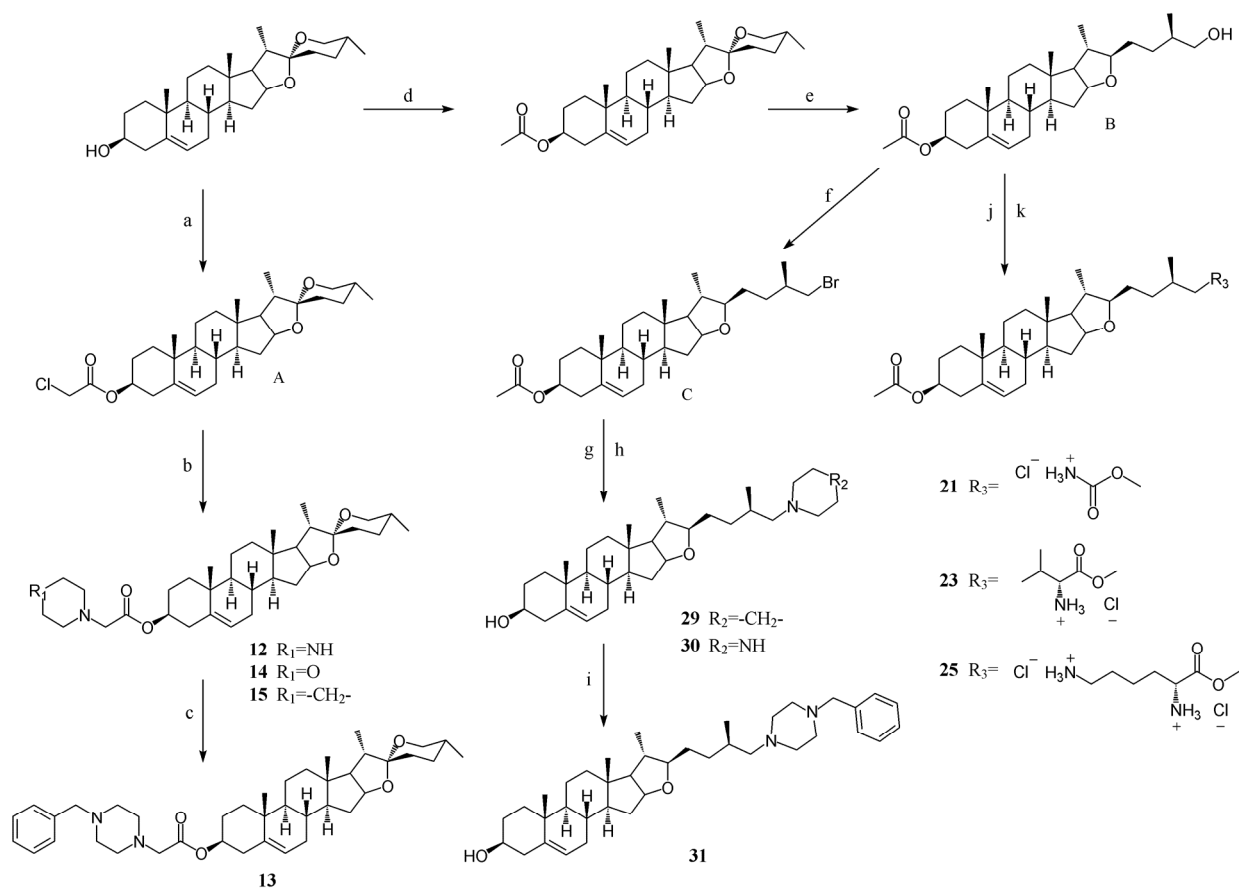


Figure 2 Chemical structures of diosgenin derivatives 1-31

合物 **3**^[12]薯蓣皂苷元的苄基咪唑溴盐的活性最好。化合物 **4** 在薯蓣皂苷元的 3-位先以 1, 2, 3-三氮唑作为连接基团, 再在三氮唑上引入一个正丁基, 化合物 **5** 是苄基, 化合物 **6** 比化合物 **5** 多一个碳原子, 是苯乙基, 化合物 **7** 比化合物 **6** 多一个环, 三氮唑上是萘乙基, 从表 3 可以看出化合物 **5~7** 的活性明显优于化合物 **4**, 其中化合物 **5** 对各个细胞株的活性最好, 可

能是因为 **5~7** 有较大的疏水基团占据 H2 所致 (图 1c), 这说明在薯蓣皂苷元三氮唑溴盐衍生物在三氮唑上有较大的疏水基团的衍生物的活性相对在三氮唑有较小的疏水基团的衍生物要好, 化合物 **8~12** 也说明了这个情况。

利用磺酰胺键和磺酰酯键形成氢键能力的大小不同设计的化合物 **1** 和 **2**, 由于溶解性等原因, 没有

**Table 1** ^1H NMR data of target compounds

Compd.	^1H NMR (CDCl_3) δ
12	5.38 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-6), 4.77–4.65 (m, 1H, H-3), 4.44–4.38 (dd, $J = 7.6, 11.2$ Hz, 1H, H-16), 3.49 (s, 1H, -NH-), 3.47 (s, 1H, H-26eq), 3.40–3.35 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H, H-26ax), 3.19 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C=O}$), 2.99–2.97 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, NCH_2 -), 2.60 (s, 4H, NCH_2 -), 2.35 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.04 (s, 3H), 0.98 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 6H)
13	7.36–7.29 (m, 5H, C_6H_5 -), 5.38 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-6), 4.67–4.65 (m, 1H, H-3), 4.44 (dd, $J = 7.6, 14.8$ Hz, 1H, H-16), 3.64 (s, 2H, PhCH_2 -), 3.49 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H-26eq), 3.41–3.35 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-26ax), 3.20 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C=O}$), 2.69 (s, 8H, NCH_2 -), 2.34 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 2.02–1.98 (m, 2H), 1.04 (s, 3H), 0.99 (d, $J = 4.2$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 4.4$ Hz, 6H)
14	5.38 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-6), 4.69 (m, 1H, H-3), 4.41 (q, 1H, $J = 7.6, 7.2$ Hz, H-16), 3.89 (s, 4H, CH_2 -5', CH_2 -7'), 3.47 (dd, 1H, $J = 3.2, 10.8$ Hz, H-26eq), 3.40 (s, 2H, CH_2 -2'), 3.37 (t, 1H, $J = 10.8$ Hz, H-26ax), 2.88 (s, 4H, CH_3 -4', CH_3 -8'), 2.35 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2 -4), 1.04 (s, 3H, CH_3 -19), 0.97 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -21), 0.80 (s, 6H, CH_3 -18, CH_3 -27)
15	5.35 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-6), 4.39 (m, 1H, H-3), 3.45 (dd, 1H, $J = 3.2, 10.8$ Hz, H-26eq), 3.37 (q, 1H, $J = 7.6, 7.2$ Hz, H-16), 3.36 (t, 1H, $J = 10.8$ Hz, H-26ax), 3.19 (s, 2H, CH_2 -2'), 2.56 (t, 4H, $J = 4.8$ Hz, CH_2 -4', CH_2 -8'), 2.32 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, CH_2 -4), 1.02 (s, 3H, CH_3 -19), 0.96 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3 -21), 0.78 (s, 6H, CH_3 -18, CH_3 -27)
21	7.24 (s, 3H, NH_3^+), 5.37 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-6), 4.61–4.58 (m, 1H, H-3), 4.32–4.27 (m, 1H, H-16), 4.05–4.00 (m, 1H, H-26), 3.91–3.87 (m, 1H, H-26), 3.58–3.53 (m, 1H, Ala-NCH), 3.32–3.27 (m, 1H, H-22), 2.32–2.30 (m, 2H, CH_2 -4), 2.04 (s, 3H, Ac), 1.98–1.97 (m, 1H, CH-25), 1.87–1.81 (m, 3H, Gly- CH_3), 1.16–1.12 (m, 3H, CH_3 -19), 1.06 (s, 3H, CH_3 -18), 1.03–1.00 (d, 3H, $J = 4.8$ Hz, CH_3 -21), 0.95–0.93 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH_3 -27)
23	8.86–8.78 (m, 3H, Leu- NH_3^+), 5.37 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-6), 4.61–4.58 (m, 1H, H-3), 4.32–4.27 (m, 1H, H-16), 4.13–4.09 (m, 1H, H-26), 4.02 (s, 1H, H-26), 3.98–3.93 (m, 1H, Leu-NCH), 3.32–3.28 (m, 1H, H-22), 2.33–2.31 (m, 2H, CH_2 -4), 2.03 (s, 3H, Ac), 1.15–1.11 (m, 3H, CH_3 -19), 1.06 (s, 3H, CH_3 -18), 1.05–0.98 (m, 8H, CH_3 -21, Leu- CH_3 , CH_3), 0.95–0.93 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH_3 -27)
25	8.61–8.54 (m, 3H, Lys- NH_3^+), 8.39–8.32 (m, 3H, Lys- NH_3^+), 5.36 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-6), 4.59–4.51 (m, 1H, H-3), 4.29–4.15 (m, 1H, H-16), 4.02 (s, 1H, H-26), 3.97–3.96 (m, 1H, Lys-NCH), 3.31–3.28 (m, 1H, H-22), 2.33–2.31 (m, 2H, CH_2 -4), 2.18 (s, 3H, Ac), 1.22–1.20 (m, 3H, CH_3 -19), 1.15–1.12 (m, 5H, CH_3 -18, Lys- CH_2 -4), 1.05–0.98 (m, 3H, CH_3 -21), 0.95–0.93 (d, $J = 4.6$ Hz, 3H, CH_3 -27)

Continued

Compd.	¹ H NMR (CDCl ₃) δ
29	5.35 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H, 6-H), 4.31–4.26 (m, 1H, H-3), 3.54–3.48 (m, 1H, 26-H), 3.33–3.28 (m, 1H, 26-H), 2.29–2.26 (m, 4H, piperidine-CH ₂ -2, CH ₂ -6), 2.08–2.01 (m, 2H, CH ₂ -26), 1.85–1.83 (m, 2H, CH ₂ -7), 1.76–1.70 (m, 4H, piperidine-CH ₂ -3, CH ₂ -5), 1.33–1.29 (m, 2H, piperidine-CH ₂ -6), 1.15–1.14 (m, 2H, CH ₂ -24), 1.02–1.00 (m, 6H, CH ₃ -18, CH ₃ -19), 0.96–0.92 (m, 3H, CH ₃ -21), 0.81–0.79 (m, 3H, CH ₃ -27)
30	7.26 (s, 2H, piperazine-NH ₂ ⁺), 5.34 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H, CH-6), 4.32–4.27 (m, 1H, H-3), 3.54–3.77 (m, 1H, H-16), 3.33–3.28 (m, 1H, H-3), 2.89–2.70 (m, 4H, piperazine-CH ₂ -2, CH ₂ -6), 2.49–2.370 (m, 4H, piperazine-CH ₂ -3, CH ₂ -5), 2.32–2.30 (m, 2H, CH ₂ -4), 1.06–1.05 (m, 6H, CH ₃ -18, CH ₃ -19), 0.94–0.92 (m, 3H, CH ₃ -21), 0.81–0.78 (m, 3H, CH ₃ -27)
31	7.47–7.38 (m, 5H, Ar-H), 5.35–5.34 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H, 6-H), 4.32–4.27 (m, 1H, H-3), 3.93 (s, 2H, PhCH ₂), 3.28–3.26 (m, 1H, H-22), 3.31–3.30 (m, 4H, piperazine-CH ₂ -2, CH ₂ -6), 2.33–2.29 (m, 2H, CH ₂ -4), 2.01–1.98 (m, 2H, CH ₂ -26), 1.85–1.83 (m, 2H, CH ₂ -7), 1.74–1.72 (m, 4H, piperazine-CH ₂ -3, CH ₂ -5), 1.02–0.99 (m, 6H, CH ₃ -18), 0.95–0.91 (m, 3H, CH ₃ -21), 0.79–0.78 (m, 3H, CH ₃ -27)

Table 2 ¹³C NMR data of target compounds

Compd.	¹³ C NMR (CDCl ₃) δ
12	169.6 (C=O), 139.4 (C-5), 122.5 (C-6), 109.2 (C-22), 80.7 (C-16), 74.2 (C-3), 66.8 (C-26), 61.9 (C-17), 59.9 (-COCH ₂ -), 56.3 (C-14), 53.5 (C-1'), 49.8 (C-9), 45.5 (C-2), 41.5 (C-20), 40.2 (C-4), 39.6 (C-13), 38.0 (C-12), 36.8 (C-1), 36.6 (C-10), 32.0 (C-7), 31.7 (C-15), 31.3 (C-8), 31.3 (C-23), 31.3 (C-2), 30.2 (C-8), 28.7 (C-25), 27.7 (C-24), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 17.1 (C-27), 16.2 (C-18), 14.5 (C-21)
13	169.6 (C=O), 139.5 (C-5), 129.5 (Ph-C), 128.3 (Ph-C), 127.5 (Ph-C), 122.5 (C-6), 109.2 (C-22), 80.7 (C-16), 74.3 (C-3), 66.8 (C-26), 62.6 (PhCH ₂), 62.0 (C-17), 59.4 (-COCH ₂ -), 56.4 (C-14), 52.5 (C-1'), 52.4 (C-2'), 49.8 (C-9), 41.5 (C-20), 40.2 (C-4), 39.6 (C-13), 38.0 (C-12), 36.8 (C-1), 36.7 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.3 (C-8), 30.2 (C-23), 29.7 (C-8), 28.7 (C-25), 27.7 (C-24), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21)
14	168.0 (C-1'), 138.4 (C-5), 121.6 (C-6), 108.3 (C-22), 79.8 (C-16), 73.6 (C-3), 65.8 (C-26), 61.0 (C-17), 55.4 (C-14), 48.9 (C-9), 65.6 (C-5'), 65.6 (C-7'), 58.5 (C-2'), 52.1 (C-4'), 52.1 (C-8'), 40.6 (C-20), 39.2 (C-4), 38.7 (C-13), 37.1 (C-12), 35.9 (C-1), 35.7 (C-10), 31.0 (C-7), 30.8 (C-15), 30.4 (C-23), 30.0 (C-2), 29.3 (C-8), 27.8 (C-25), 26.7 (C-24), 19.8 (C-11), 18.3 (C-19), 16.1 (C-27), 15.3 (C-18), 13.5 (C-21)
15	170.0 (C-1'), 139.6 (C-5), 122.5 (C-6), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 74.2 (C-3), 66.9 (C-26), 62.1 (C-17), 56.4 (C-14), 49.9 (C-9), 60.1 (C-2'), 54.1 (C-4'), 54.1 (C-8), 41.6 (C-20), 40.3 (C-4), 39.7 (C-13), 38.1 (C-12), 36.9 (C-1), 36.7 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.4 (C-23), 31.4 (C-2), 30.3 (C-8), 28.8 (C-25), 27.8 (C-24), 25.6 (C-5'), 25.6 (C-7'), 23.7 (C-6'), 20.8 (C-11), 19.3 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21)
21	176.6 (Ala, C-1), 170.4 (Ac, C-1), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 90.0 (C-22), 83.1 (C-5), 73.8 (C-22), 69.6 (C-16), 65.0 (C-3), 56.8 (C-26), 50.0 (C-17), 49.9 (C-13, 9, 14, Ala-NCH), 40.6 (C-15), 39.3 (C-4), 38.0 (C-10), 36.9 (C-1), 36.6 (C-12), 32.7 (C-25), 32.1 (C-31), 49.0 (C-24), 30.7 (C-23), 27.7 (C-2), 21.4 (Ac, C-2), 20.7 (C-11), 19.3 (C-18), 18.9 (C-19, 21), 16.7 (Ala, C-3), 16.4 (C-27)
23	170.5 (Leu, C-1), 169.7 (Ac, C-1), 139.6 (C-5), 122.3 (C-6), 89.9 (C-22), 83.1 (C-16), 73.8 (C-3), 70.9 (C-26), 64.9 (C-17), 56.8 (Leu, C-2), 51.6 (C-13, 9), 49.9 (C-14), 40.6 (Leu, C-3), 39.5 (C-15), 39.3 (C-4), 37.9 (C-10, 1), 37.8 (C-12), 32.5 (C-25), 32.1 (C-7), 31.9 (C-24), 31.4 (C-23), 27.6 (C-2), 24.4 (Leu, C-4, 5, 6), 21.4 (Ac, C-2), 20.5 (C-11), 19.2 (C-18, 19), 18.9 (C-21), 16.4 (C-27)
25	169.9 (Lys, C-1), 169.7 (Ac, C-1), 139.7 (C-5), 122.2 (C-6), 89.4 (C-22), 82.7 (C-16), 73.3 (C-3), 64.7 (C-17), 56.4 (Lys, C-2), 51.8 (C-13, 9), 49.8 (C-14), 40.5 (Lys, C-6), 37.9 (C-10), 37.7 (C-1), 36.7 (C-12), 32.2 (Lys, C-3), 31.6 (C-7), 31.3 (C-24), 30.4 (C-23), 29.9 (C-2), 27.6 (Lys, C-5), 26.3 (Ac, C-2), 22.0 (Lys, C-4), 21.36 (Ac, C-2), 20.4 (C-11), 19.2 (C-19, 18), 18.9 (C-21), 16.7 (C-27)
29	140.8 (C-5), 121.1 (C-6), 90.3 (C-22), 83.0 (C-16), 71.2 (C-3), 66.2 (C-17), 65.0 (C-26), 56.9 (C-piperidine, C-1), 55.0 (piperidine, C-5), 50.0 (C-13, 8, 9, 14), 42.2 (C-4), 40.5 (C-15), 39.4 (C-17), 37.8 (C-10), 37.2 (C-6), 36.5 (C-12), 32.3 (C-1), 32.1 (C-7), 31.9 (C-2), 31.5 (C-25), 25.6 (piperidine, C-3, 4), 24.4 (C-piperidine, C-5), 20.6 (C-20), 19.3 (C-11), 18.9 (C-18, 19), 18.4 (C-21), 16.3 (C-27)
30	140.8 (C-5), 121.2 (C-6), 90.3 (C-22), 83.0 (C-16), 71.3 (C-3), 66.1 (C-17), 66.0 (C-5), 56.9 (C-26), 54.9 (piperazine, C-1, C-4), 50.0 (C-13), 46.0 (C-8, 9, 14), 46.2 (piperazine, C-2, C-3), 40.6 (C-14), 39.4 (C-15), 37.8 (C-10), 37.2 (C-1), 32.2 (C-7), 31.9 (C-2), 31.5 (C-25), 31.5 (C-23), 30.8 (C-11), 20.6 (C-18), 19.3 (C-19), 18.9 (C-21), 16.4 (C-27)
31	140.8 (C-5), 133.7 (benzylpiperazine, C-6), 130.7 (benzylpiperazine, C-7, C-11), 129.3 (benzylpiperazine, C-8, C-10), 128.8 (benzylpiperazine, C-9), 121.3 (C-6), 89.7 (C-22), 83.26 (C-16), 71.6 (C-3), 64.8 (C-17), 63.5 (benzylpiperazine, C-5), 61.3 (C-26), 56.8 (benzylpiperazine, C-1, 4), 50.7 (benzylpiperazine, C-2, 3), 50.7 (C-13, 8), 49.9 (C-9, 14), 42.3 (C-4), 40.6 (C-15), 39.3 (C-17), 37.9 (C-10), 37.18 (C-6), 36.58 (C-12), 32.2 (C-1), 31.9 (C-7), 31.5 (C-2, 25), 20.6 (C-20), 19.4 (C-11), 18.7 (C-18, 19), 16.4 (C-21), 7.3 (C-27)

得到药理活性数据。化合物 16~19 是薯蓣皂苷元的脂肪酸酯、芳香酸酯类衍生物, 由活性数据可知 (表 4), 化合物 16~19 除化合物 17 对 A549 和 HepG-2 表现出一定的活性外, 其他的都没有活性, 说明薯蓣皂苷元的脂肪酸酯、芳香酸酯类衍生物没有抗肿瘤活性, 化合物 17 可能是因为在末端还有一个很大的疏水基团占据 H2 才对某些细胞株表现出了活性。

作者先以 1~2 个碳原子连接, 再修饰碱性的氮

基或其他基团, 以此考察薯蓣皂苷元及其失 F 环杂环衍生物的氢键、偶极作用对抗肿瘤活性的影响。合成了化合物 12~15 (表 5), 化合物 13 是以苄基取代了化合物 12 末端仲氨基的氢, 化合物 14 和 15 分别以碳原子和氧原子代替了化合物 12 哌嗪环上的末端氮原子, 化合物 12 的静电能值最低, 活性也是最好的, 尤其表现在 A375 和 HepG-2 两个细胞株上, 说明此类化合物的氢键、偶极作用越强的衍生物的抗肿瘤活

Table 3 The anti-tumor activity *in vitro* of the the triazole bromides of diosgenin. ^aValues are means of three parallel experiments

Compd.	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^a			
	A375	A549	HepG-2	K562
3	3.33	5.75	4.40	2.08
4	15.84	7.83	28.33	10.34
5	6.19	6.25	7.48	–
6	12.30	13.24	14.41	4.82
7	8.52	7.92	8.92	2.38
8	27.76	27.35	>30	>30
9	6.97	10.62	14.88	11.49
10	12.61	23.68	9.19	–
11	13.54	24.34	19.53	>30

Table 4 The anti-tumor activity *in vitro* of the aliphatic esters and aromatic esters of diosgenin. ^aMeans no result, ^bValues are means of three parallel experiments

Compd.	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	A375	A549	HepG-2	K562
1	– ^a	–	–	–
2	–	–	–	–
16	>30 ^b	>30	>30	>30
17	>30	11.99	15.78	–
18	>30	>30	>30	>30
19	>30	>30	>30	>30

Table 5 The anti-tumor activity *in vitro* of the heterocyclics of diosgenin and diosgenin without F ring. ^aMeans electrostatic energy, ^bValues are means of three parallel experiments

Compd.	EE ^a	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b			
		A375	A549	HepG-2	K562
12	–1.03	4.48	25.66	7.44	20.76
13	–0.77	>30	>30	5.20	>30
14	–0.23	11.95	11.83	18.68	>30
15	–0.05	>30	>30	14.24	>30
27	–0.07	>30	>30	>30	>30
28	–0.01	>30	>30	>30	>30
29	–0.01	>30	>30	>30	>30
30	–2.05	5.00	17.91	17.90	–
31	–1.22	10.55	17.50	14.41	10.34

性越好。薯蓣皂苷元失 F 环杂环衍生物也证明了这一点, 如化合物 **27** 和 **28** 分别用 1, 2, 4-三氮唑和咪唑替代化合物 **30** 的哌嗪环, 化合物 **29** 用碳原子代替化合物 **30** 哌嗪上的末端氮原子, 化合物 **31** 以苄基取代了化合物 **30** 哌嗪末端氮原子上的氢, 化合物 **30** 的活性最好, 特别表现在细胞株 A375 上。

化合物 **20**~**26** 考察了薯蓣皂苷元失 F 环氨基酸酯类衍生物的氢键、偶极作用的强弱对体外抗肿瘤活性的影响 (表 6), 化合物 **20** 是薯蓣皂苷元的失 F 环

26-位的芳香酸酯衍生物, 化合物 **21**~**24** 是薯蓣皂苷元的失 F 环 26-位氨基酸衍生物, 化合物 **25**、**26** 是薯蓣皂苷元的失 F 环的 3 位、26-位都有氨基末端的氨基酸衍生物, 从表 4 可知, 化合物 **25**、**26** 的对接静电能值均达到了–3.56, 而化合物 **21**~**24** 对接静电能值在–1.5 左右, 化合物 **20** 的静电能值只有–0.09, 抗肿瘤活性上也表现出了一定的规律, 氢键、偶极作用越强的衍生物的活性越好。可能是因为化合物 **20** 只与 A1 有较弱的氢键结合, 而 **21**~**24** 可能占据了 D3、D4、D5 中一个位点, 与 Bcl-2 都有较强的结合, 而化合物 **25**、**26** 可能分别占据了其中两个位点, 具有更强的氢键、偶极作用 (图 1d)。

Table 6 The anti-tumor activity *in vitro* of the acid esters of diosgenin without F ring. ^aMeans electrostatic energy, ^bValues are means of three parallel experiments

Compd.	EE ^a	IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^b			
		A375	A549	HepG-2	K562
20	–0.09	>30	>30	>30	>30
21	–1.98	9.07	21.89	18.23	14.2
22	–1.35	–	35.6	27.45	9.22
23	–1.36	6.76	21.56	19.39	10.9
24	–1.63	>30	>30	23.28	8.64
25	–3.56	5.58	13.77	10.03	7.69
26	–3.56	11.70	15.45	12.27	13.61

2.4 小结 薯蓣皂苷元失 F 环的 26-位脂肪酸酯、芳香酸酯类衍生物几乎没有体外抗肿瘤活性; 薯蓣皂苷元三氮唑溴盐类衍生物在三氮唑上连有较大的疏水基团的衍生物体外抗肿瘤活性较好; 薯蓣皂苷元及其失 F 环杂环类衍生物、薯蓣皂苷元失 F 环氨基酸酯类衍生物能形成较强氢键、偶极作用的衍生物的活性更好。总之, 本文讨论了几类薯蓣皂苷元及其失 F 环衍生物的体外抗肿瘤构效关系, 得到了一些比较有价值的结论, 对薯蓣皂苷元衍生物抗肿瘤活性的进一步开发具有一定的意义。

实验部分

1 仪器与试剂

¹H NMR 及 ¹³C NMR 用 BrukerAc-E200 和 Varian Unity NOVA400/54 核磁共振仪测定 (以 CDCl₃ 为溶剂, TMS 为内标); X4 数字显微熔点仪 (北京福凯科技发展有限公司), 温度未校正。Diosgenin (南京青泽医药科技有限公司); 薯蓣皂苷元及其衍生物用磷酸钼酸溶液, 荧光, 碘等显色。其他试剂、溶剂均为分析纯。

2 化学合成

化合物 A 的制备 将 1 g (2.40 mmol) 薯蓣皂苷元、456 mg (4.00 mmol) 氯乙酸、167 mg (0.12 mmol) 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 搅拌 5~10 min, 0 °C 下滴加 750 mg (0.36 mmol) 二环己基碳二亚胺 (DCC) 的二氯甲烷溶液反应 20 min。反应完全后, 过滤, 减压蒸除溶剂, 硅胶柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯, 得白色固体 950 mg, mp 200~202 °C, 收率 80.6%。

化合物 12 的制备 取 123 mg (0.25 mmol) 化合物 A、108 mg (1.25 mmol) 无水哌嗪, 溶于 5 mL 丙酮中, 60 °C 下回流反应 1 h, TLC 检测反应完全后, 过滤, 减压蒸除溶剂, 加入 10 mL 水, 析出大量的白色固体, 过滤, 滤饼用水洗涤 3 次, 每次 5 mL, 真空干燥得淡黄色固体, 经柱色谱纯化, 洗脱剂为二氯甲烷/甲醇, 得 120 mg 白色固体, mp 151~153 °C, 收率为 88.7%。

化合物 13 的制备 取 130 mg (0.24 mmol) 化合物 12、85 mg (0.48 mmol) 溴苄溶于 5 mL 丙酮中, 60 °C 回流反应 12 h, 反应完全后, 经柱色谱纯化, 得到 95 mg 白色固体, mp 165~167 °C, 收率 62.7%。取 65 mg (0.10 mmol) 该固体, 用 5 mL 二氯甲烷搅拌溶解, 通入干燥的氯化氢气体 (2 min), 析出大量白色固体, 过滤, 用乙醚洗涤 2 次, 每次 3 mL, 干燥后得 50 mg 白色固体, mp 206~208 °C, 收率 75.0%。

化合物 14 的制备 取 400 mg (0.82 mmol) 化合物 A 于 12 mL 吗啉中, 室温下电磁搅拌, 2.5 h 后, TLC 检测反应完全。将反应液倾入冰水中搅拌, 有大量白色固体产生, 抽滤, 水洗至无吗啉气味, 真空干燥得 420 mg 白色固体, 收率 95.2%, mp 148~151 °C。取 54 mg (0.10 mmol) 白色固体, 用 5 mL 二氯甲烷搅拌溶解, 通入干燥的氯化氢气体 (2 min), 析出大量白色固体, 过滤, 用乙醚洗涤 2 次, 每次 3 mL, 干燥后得 45 mg 白色固体, mp 168~170 °C, 收率 78.9%。

化合物 15 的制备 取 500 mg (1.02 mmol) 化合物 A、780 mg (9.19 mmol) 哌啶于 6 mL 二氯甲烷中, 室温下搅拌过夜, TLC 检测反应, 12 h 反应完毕。再加入碎冰搅拌, 用二氯甲烷萃取 3 次, 每次 10 mL, 合并有机相。用饱和氯化钠溶液洗涤 3 次, 每次 15 mL, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得 500 mg 黄色液体。用中性氧化铝柱色谱纯化, 石油醚/乙酸乙酯快速洗脱, 得 430 mg 白色固体, 收率 78.3%, mp 143~146 °C。取 54 mg (0.10 mmol) 白色固体, 用 5 mL 二氯甲烷搅拌溶解, 通入干燥的氯化氢气体 (2 min), 析

出大量白色固体, 过滤, 用乙醚洗涤 3 次, 每次 1 mL, 干燥后得 48 mg 白色固体, mp 194~196 °C, 收率 83.9%。

化合物 B 的制备 取 2.00 g (4.78 mmol) 薯蓣皂苷元、4 mL (40.23 mmol) 乙酸酐和 8 mL 吡啶加入反应瓶中, 先在冰浴下搅拌 30 min 后, 移至 60 °C 中搅拌 2.5 h。TLC 检测, 反应完毕, 冷却, 将反应液倒入 300 mL 冰水中搅拌 1 h, 抽滤, 滤饼用冰水洗, 真空干燥, 得 3-乙酰-薯蓣皂苷元酯 1.81 g, 白色粉末状固体, 产率 82.49%。

取 1.50 g (3.26 mol) 3-乙酰-薯蓣皂苷元酯置于反应瓶中, 加入 8 mL 二氯甲烷、20 mL 冰醋酸, 搅拌 10 min 后, 分批加入 1.06 g (16.51 mmol) 氰基硼氢化钠, 室温搅拌 5 h 后, 加入水 15 mL, 搅拌 10 min, 用二氯甲烷萃取, 再用饱和碳酸氢钠水溶液洗 3 次, 饱和食盐水洗 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 用石油醚/乙酸乙酯柱色谱纯化, 得白色固体粉末 1.26 g, 即化合物 B, 产率 84.01%, mp 104~105 °C (文献^[18]: mp 105~106 °C)。

化合物 21 的制备 将化合物 B 取出 0.50 g (1.09 mmol) 加到反应瓶中, 再加入 0.57 g (2.18 mmol) DCC、1.12 g (1.2 mmol) 4-二甲氨基吡啶、0.45 g *N*-Boc-*L*-丙氨酸和 10 mL 二氯甲烷, TLC 检测反应完全后过滤。滤液用 10% 碳酸氢钠溶液洗两次, 饱和氯化钠水溶液洗一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 抽干, 石油醚/乙酸乙酯柱色谱纯化得糖浆状固体。向此物质中加入溶有饱和盐酸气体的乙酸乙酯溶液, 搅拌 20 min, TLC 显示原料点完全消失。减压蒸除溶剂, 加入 10 mL 乙醚过滤, 滤饼用乙醚洗涤 3 次, 得淡黄色固体 0.31 g, 产率 53.76%, mp 96~98 °C。

化合物 23 的制备 参照化合物 21 的合成方法, 最终得白色固体, 产率 77.30%, mp 158~160 °C。

化合物 25 的制备 参照化合物 21 的合成方法, 最终得白色固体, 产率 58.4%, mp 178~180 °C。

化合物 C 的制备 薯蓣皂苷元失 F 环 3-乙酰-26-溴代物的合成: 取 1.00 g (2.18 mmol) 化合物 B 和 1.66 g (6.33 mmol) 三苯基磷, 置于 35 mL 四氢呋喃, 搅拌 20 min 后, 冰浴下分批加入 0.92 g (9.32 mmol) *N*-溴代丁二酰亚胺, 室温搅拌 4 h, 旋干, 柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯, 得白色粉末状固体 0.74 g, 产率为 65.2%。

化合物 29 的制备 将 0.60 g (1.5 mmol) 化合物 C、0.70 g (8.81 mmol) 哌啶、0.48 g (3.4 mmol) 无水碳酸钾和 15 mL 乙腈加入反应瓶中, 70 °C 反应 4 h 后,

旋干, 再加入 0.20 g (3.6 mmol) 氢氧化钾, 60 °C 反应 1 h, 旋干过柱, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯, 得白色固体产物 0.51 g, 产率为 69.4%, mp 165~166 °C。

化合物 30 的制备 参照化合物 29 的合成方法, 最终得白色固体, 产率为 50.03%, mp 179~180 °C。

化合物 31 的制备 将 0.18 g (0.35 mmol) 化合物 30、0.14 g (0.82 mmol) 溴苄、0.16 g (1.7 mmol) 无水碳酸钾和 15 mL 乙腈加入反应瓶中, 在 60 °C 反应 6 h。减压蒸除溶剂后加入 30 mL 二氯甲烷, 用饱和碳酸氢钠溶液洗两次, 饱和食盐水洗一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 抽干, 柱色谱纯化, 洗脱剂为石油醚/乙酸乙酯, 得乳白色固体 0.14 g, 产率为 60.4%, mp 220~221 °C。

3 体外抗肿瘤活性实验

以文献^[12]报道的 1-(3 β -薯蓣皂苷元)-3-苄基咪唑溴盐 (由实验室按文献的方法合成) 为阳性对照品, 以人恶性黑色素瘤细胞 A375、人肺腺癌细胞 A549、人肝癌细胞 HepG-2 以及人慢性髓原白血病细胞株 K562 细胞株为靶细胞, 用 MTT 法测定化合物的抗肿瘤活性, 实验重复 3 次。

收集对数期细胞, 先用计数板计数, 调整细胞悬液浓度, 每孔加入 200 μ L, 铺板使待测细胞调密度至 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ /孔 (边缘孔用无菌 PBS 填充)。5% CO₂、37 °C 孵育至细胞单层铺满孔底 (96 孔平底板), 用排枪吸取培养基, 再加入浓度梯度的药物 (6 个梯度, 每孔 200 μ L, 设 3 个复孔。浓度采用对半稀释法配制)。5% CO₂、37 °C 孵育 48 h, 倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h 后终止培养, (若药物与 MTT 能够反应, 可先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲 2~3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液), 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸收值。同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砷), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。通过 SPSS13.0 计算药物抑制率或 IC₅₀ 值。

致谢: 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室何谷老师课题组协助完成化合物体外抗肿瘤细胞实验, 在此一并致谢。

References

- [1] Hong ZQ, Lin JH. The progress of study of dioscin ligand [J]. J Fujian Coll Tradit Chin Med (福建中医学院学报), 2005, 15: 38–40.
- [2] Wang XP, Lu X. The progress of study of dioscin's bioactivation [J]. Foreign Med Sci (Tradit Chin Med) (国外医学中医中药分册), 2004, 26: 138–141.
- [3] Leger DY, Liagre B, Beneytout JL. Role of MAPKs and NF- κ B in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells [J]. Int J Oncol, 2006, 28: 201–207.
- [4] Trouillas P, Corbiere C, Liagre B, et al. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13: 1141–1149.
- [5] Liu MJ, Wang Z, Ju Y, et al. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55: 79–90.
- [6] Raju J, Patlolla JMR, Swamy MV, et al. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13: 1392–1398.
- [7] Huo R, Zhou QL, Wang BX, et al. Diosgenin induces apoptosis in HeLa cells via activation of caspase pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25: 1077–1082.
- [8] Corbiere C, Liagre B, Terro F, et al. Induction of antiproliferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cancer cells [J]. Cell Res, 2004, 14: 188–196.
- [9] Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death [J]. Curr Opin Struct Biol, 2000, 10: 649–655.
- [10] Srinivasan S, Koduru S, Kumar R, et al. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells [J]. Int J Cancer, 2009, 125: 961–967.
- [11] Cailleteau C, Liagre B, Beneytout JL. A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin-induced megakaryocytic differentiation [J]. J Cell Biochem, 2009, 107: 785–796.
- [12] Zhang HB, Yang XD, Qing C, et al. Steroidal midazolium salts and their synthesis method: CN, 200610011025. 7 [P]. 2006-07-06.
- [13] Geng Q, Zeng CL, Fu WW, et al. Preparation of diosgenin derivatives and their antitumor activities [J]. West China J

- Pharm Sci (华西药理学杂志), 2009, 24: 475-478.
- [14] Zheng CH, Zhou YJ, Zhu J, et al. Construction of a three-dimensional pharmacophore for Bcl-2 inhibitors by flexible docking and the multiple copy simultaneous search method [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 6407-6417.
- [15] Fu WW, Wu YK, Fan JZ. The design and synthesis of diosgenin anti-tumor derivatives (I) [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2010, 25: 658-663.
- [16] Zeng CL, Geng Q. The design and synthesis of diosgenin anti-tumor derivatives (II) [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2011, in press.
- [17] Zheng W, Jiang HP. The design and synthesis of diosgenin anti-tumor derivatives (III) [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2011, in press.
- [18] Chaosuanchaoen N, Kongkathip N, Kongkathip B. A novel synthetic approach from diosgenin to a 17 α -hydroxy orthoester via a region- and stereo-specific rearrangement of an epoxy ester [J]. Syn Commun, 2006, 34: 961-983.

热烈祝贺《药学报》荣获第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖

中国出版政府奖是国家设立的新闻出版行业的最高奖, 2007 年首次开评, 每三年评选一次, 在业界和大众中的影响越来越大, 已成为出版行业繁荣发展的一个风向标。第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖。自 2010 年 9 月开始评选, 经过自下而上、基层推荐、逐级审核、专家评审和公示征求意见等环节, 在报送的 3325 份推荐材料中, 共 478 种图书、期刊、音像制品、电子出版物、网络出版物等获出版政府奖及提名奖, 评选结果已于 3 月 10 日正式对外公布。在本次获奖项目中, 20 本期刊 (科技、社科期刊各 10 本) 获得出版政府奖, 39 本期刊 (科技期刊 19 本、社科期刊 20 本) 获得出版政府奖提名奖。29 本获奖科技期刊代表了中国 5000 多本科技期刊的最高水平, 《药学报》更是药学领域唯一获得出版政府奖提名奖的期刊。《药学报》荣誉的取得, 感谢全国药学工作者多年的支持, 感谢主办单位中国药学会和中国医学科学院药物研究所多年来的大力支持。《药学报》编辑部有信心在各级领导、药学同仁的大力支持下, 永葆《药学报》在药学期刊中的领先地位。

《药学报》编辑部