

查尔酮异甘草素类化合物的合成及其对子宫颈癌细胞的抑制作用

杨旭超, 王永波, 木合布力·阿布力孜*, 西力扎提·阿不来提, 任丙昭(新疆医科大学药学院药物化学有机教研室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 设计并合成查尔酮异甘草素类化合物, 并评价其抗子宫颈癌活性。方法 利用 Claisen-Schmidt 反应原理, 通过微波固相合成 5 种目标化合物, 并进行结构表征。以 SiHa(人子宫颈鳞癌细胞)和 HeLa(子宫颈癌细胞)细胞株作为体外模型, 利用 MTT 法考察目标化合物对宫颈癌细胞增殖的抑制活性, 利用流式细胞仪测定目标化合物对宫颈癌细胞促凋亡作用。结果与结论 快速高效合成了 5 个查尔酮异甘草素类化合物, 其结构经 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱确认。目标化合物能有效抑制宫颈癌细胞增殖, 促进宫颈癌细胞凋亡。

关键词: 查尔酮异甘草素; Claisen-Schmidt 反应; 微波固相反应; 抗子宫颈癌活性

中图分类号: R284.3; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)01-0001-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.001

Synthesis of Chalcone Isoliquiritigenin Compounds and Its Anti-cervical Cancer Activity

YANG Xuchao, WANG Yongbo, MUHEBULI Abulizi*, XILIZHATI Abulaiti, REN Bingzhao(Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesis of chalcone isoliquiritigenin compounds, and evaluate its anti-cervical cancer activity. **METHODS** Using Claisen-Schmidt reaction principle, by microwave solid-phase synthesis of 5 target compounds, and structural characterization. SiHa(human cervical squamous cell carcinoma) and HeLa(cervical cancer cells) cells as *in vitro* model, using MTT method to study the inhibitory activity of the target compounds on the proliferation of cervical cancer cells, promotion of the apoptosis of cervical cancer cells by flow cytometry. **RESULTS & CONCLUSION** Five chalcone isoliquiritigenin compounds were synthesized and characterized by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra. The target compound could inhibit the proliferation of cervical cancer cells effectively and promote the apoptosis of cervical cancer cells.

KEY WORDS: chalcone isoliquiritigenin compound; Claisen-Schmidt reaction; microwave solid-phase synthesis; anti-cervical cancer activity

中药甘草中的查尔酮类化合物异甘草素(isoliquiritigenin, ILG)在药理试验中显示明显的促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖的活性, 且对正常细胞的毒性低于肿瘤细胞^[1]。ILG 作为另外一个抗肿瘤活性较明显的甘草查尔酮类成分(化学结构式见图 1), 主要存在于乌拉尔甘草当中, 但含量很低, 仅为 0.12%^[1], 这使得天然提取的异甘草素生产成本高。因此, 探索并优化 ILG 的人工合成工艺对于增加异甘草素的产量以及保护甘草资源具有重要意义。在我国新疆地区, 子宫颈癌的发病率和死亡率居全国首位, 是新疆地方性高发疾病之一^[2], 尤其是在遗传易感性较高的维吾

尔族妇女中, 子宫颈癌的发病率显著高于其他民族人群^[3]。有文献显示 ILG 对结肠癌^[4-7]、前列腺癌^[8-10]、乳腺癌^[11-15]、结肠癌^[16]、肝癌^[17]、胃癌^[18]等均显示出很好的抗肿瘤活性。

本实验通过简单、快速、高效的微波途径合成 5 个 ILG 类似物, 微波最佳功率为 150 W, 反应时间为 100 s, 后处理简单。然后对其抗宫颈癌活性做了研究(MTT 和流式), 并根据活性简单分析了其类似物之间的化学构效关系。本课题选用 2 种 HPV 阳性细胞(SiHa 与 HeLa)做对比研究, 发现合成的 ILG 类似物对 2 种细胞均有抑制和促凋亡作用。

基金项目: 国家自然科学基金(81260379); 新疆研究生科研创新项目(XJGR12014094)

作者简介: 杨旭超, 男, 硕士生 Tel: 1527679978 E-mail: 15276799978@163.com *通信作者: 木合布力·阿布力孜, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: 13899862478 E-mail: mourboul@hotmail.com

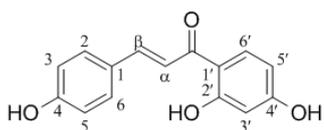


图 1 异甘草素的化学结构

Fig. 1 The structures of isoliquiritigenin

1 合成部分

1.1 材料

1.1.1 试剂 2, 4-二羟基苯乙酮(批号: 20140410)、对羟基苯乙酮(批号: 20140321)、香草醛(批号: 20120831)、异香草醛(批号: 20140211), 对羟基苯甲醛(批号: 20121002)、3, 4-二羟基苯甲醛(批号: 20140412)均购自上海达瑞; 中性氧化铝(天津福晨, 批号: 20131018); 氢氧化钾(天津盛奥, 批号: 20131018); 石油醚(天津富宇, 批号: 20140315); 乙酸乙酯(天津富宇, 批号: 20140513),

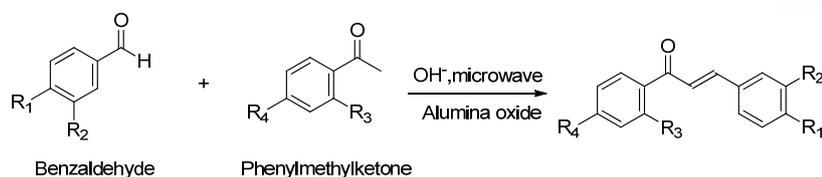


图 2 异甘草素衍生物微波合成途径

Fig. 2 The microwave synthesis pathway of isoliquiritigenin derivatives

1.2.2 查尔酮异甘草素类化合物(I~V)的制备

将 Phenylmethylketone(0.01 mol)和 Benzaldehyde (0.012 mol)与中性氧化铝 8 g 混合均匀, 加入研细的氢氧化钾 4 g, 放置在研钵中进行充分研磨。所得混合物放入超声微波协同萃取仪进行反应, 选择最佳功率为 150 W, 反应时间为 100 s。反应结束之后, 反应生成物变成红橙色固体, 通过薄层色谱监测反应进行程度, 以反应物薄层斑点消失或不再变淡为反应停止标准。将反应混合物冷却到室温, 用预先冷冻的冰蒸馏水(约 250~300 mL)进行充分搅拌溶解; 然后把水不溶性固体抽滤, 所得滤液用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 进行酸化, 并不断充分搅拌溶液使得 pH 值达到 1~2, 出现大量的沉淀, 放入冰箱中冷却 10 min 之后, 进行抽滤, 用蒸馏水洗涤 3 次, 得到黄色固体粗品, 干燥后称量约为 5.1 g。最后, 用硅胶柱层析的方法进行纯化, 以石油醚: 乙酸乙酯=2:1 为洗脱剂, 收集黄色馏分, 减压蒸去有机溶剂, 得化合物 I~V。

1.3 合成化合物的鉴定

ILG(I): $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$, 分子量 256.25, 金黄色

硅胶(青岛海洋化工, 批号: 0150002, 200~300 目, 柱层析), 其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 CW-2000 型超声微波协同萃取仪(上海新拓分析仪器科技有限公司); DHG-9075A 型恒温鼓风干燥箱(上海中联高科实验设备有限公司); SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); AB104-N 型电子分析天平(梅特勒一托利多); 2F-2C 型暗箱式自动紫外分析仪(上海安亭电子仪器厂); X24 型数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司); Unity-Inova600 核磁共振谱仪(美国 Varian 公司)。

1.2 方法

1.2.1 目标化合物的制备^[19] 采用以中性氧化铝为固相载体的方法, 碱为催化剂, 在微波辐射的作用下反应, 合成途径见图 2。

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
I	-OH	-H	-OH	-OH
II	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH
III	-OCH ₃	-OH	-H	-OH
IV	-OH	-OH	-OH	-OH
V	-OH	-H	-H	-OH

粉末, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮, 不溶于石油醚和水, mp. 198~200 °C; ¹H-NMR(DMSO, 600 Hz) δ : 6.26(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-3'), 6.4(1H, dd, $J=1.8, 8.4$ Hz, H-5'), 6.83(2H, d, $J=9$ Hz, H-3, 5), 7.74(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6'), 7.78(1H, d, $J=15.2$ Hz, α -H), 7.85(1H, d, $J=15.2$ Hz, β -H), 8.15(2H, d, $J=9$ Hz, H-2, 6), 13.60 (1H, s, OH); ¹³C-NMR(DMSO, 150 MHz) δ : 104.5(C-3'), 110.1(C-5'), 114.8(C-1'), 117.7(C-3, C-5), 119.3(C- α), 127.6(C-1), 133.1 (C-2, 6), 134.7(C-6'), 146.1(C- β), 162.1(C-4), 166.7(C-2'), 167.7(C-4'), 193.4(C=O); UV_{max} 378 nm; 收率 58.90%。

3-甲氧基-异甘草素(II, 3-OM-ILG): $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 分子量 286.28, 橘黄色粉末, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮, 不溶于石油醚和水, mp. 207~209 °C; ¹H-NMR(DMSO, 600 MHz) δ : 3.87(3H, s, OCH₃), 6.28(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.42(1H, dd, $J=2.4, 9.0$ Hz, H-5'), 6.78(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5), 7.28(1H, dd,

$J_1=1.8$ Hz, $J_2=8.4$ Hz, H-6), 7.54(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 7.73(1H, d, $J=15$ Hz, H- α), 7.79(1H, d, $J=15$ Hz, H- β), 8.2(1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6'), 13.65(1H, s, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 150 MHz) δ : 57.5(OCH₃), 104.5(C-3'), 109.9(C-5'), 113.5(C-2), 114.9(C-1'), 117.3(C-5), 119.4(C-6), 126.5(C- α), 128.1(C-1), 134.7(C-6'), 146.6(C-4), 149.9(C- β), 151.8(C-3), 166.8(C-2'), 167.7(C-4'), 193.4(C=O); UV_{max} 388 nm; 收率 57.60%。

3-羟基-异甘草素(III, 3-OH-ILG): C₁₆H₁₄O₄, 分子量 270.28, 淡金黄色针状固体, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮, 不溶于石油醚和水, mp. 198.7~200.1 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 3.83(3H, s, OCH₃), 6.82(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-2), 6.88(2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3', 5'), 6.98(1H, d, $J=9$ Hz, H-5), 7.26(1H, dd, $J=1.8, 9$ Hz, H-1, 6), 7.55(1H, d, $J=15.6$ Hz, H- α), 7.65(1H, d, $J=15.6$ Hz, H- β), 8.03(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', 6'), 9.13(1H, s, OH-3), 10.36(1H, s, OH-4'); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz) δ : 57.5(OCH₃), 113.8(C-3), 116.6(C-5), 117.2(C-6), 121.3(C-5'), 123.62(C-3'), 126.81(C- α), 129.7(C-1), 131.3(C-6'), 132.9(C-2'), 133.1(C-1'), 145.1(C- β), 148.5(C-3), 151.9(C-4), 164.0(C-4'), 193.4(C=O); UV_{max} 391 nm; 收率 52.90%。

3, 4'-二羟基-4-甲氧基-异甘草素(IV, 3, 4'-DOH-4-MO-ILG): C₁₅H₁₂O₅, 分子量 272.25, 黄色粉末, 易溶于甲醇、乙醇、丙酮, 不溶于石油醚和水, mp. 220~221 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 6.27(1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.40(1H, dd, $J=2.4, 9$ Hz, H-5'), 6.81(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-2), 7.20(1H, dd, $J=1.8, 8.2$ Hz, H-6), 7.37(1H, d, $J=1.8$ Hz, H-5), 7.65(1H, d, $J=15.3$ Hz, H- α), 7.71(1H, d, $J=15.3$ Hz, H- β), 8.14(1H, d, $J=9$ Hz, 6'), 13.60(1H, s, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 150 MHz) δ : 104.5(C-3') 110.0(C-5'), 114.9(C-2), 117.6(C-1'), 117.7(C-5), 119.2(C-6), 124.3(C- α), 128.1(C-1), 134.7(C-6'), 146.6(C-4), 147.5(C-3), 150.8(C- β), 166.8(C-2'), 167.7(C-4'), 193.3(C=O); UV_{max} 358 nm; 收率 48.89%。

4, 4'-二羟基-异甘草素(V, 4, 4'-DOH-ILG): C₁₅H₁₂O₃, 分子量 240.26, 深黄棕色粉末, 微溶于水, 易溶于甲醇、乙醇, 溶于乙酸乙酯, mp. 196~198 °C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 600 MHz) δ : 6.82(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3, 5), 6.87(3H, d, $J=9$ Hz, H-3', 5'), 7.61(1H, d, $J=15.6$ Hz, H- α), 7.68(1H, d, $J=15.6$ Hz, H- β), 7.70(2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, 6), 8.03(3H, d, $J=9$ Hz, H-2', 6'), 10.03(1H, s, OH), 10.34(1H, s, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 150 MHz) δ : 117.2(C-3, 5), 117.6(C-3, 5), 120.4(C- α), 127.9(C-1), 132.6(C-2, 6), 132.8(C-2', 6'), 145.0(C- β), 161.7(C-4), 163.8(C-4'), 188.9(C=O); UV_{max} 349 nm; 收率 38.75%。

2 体外抗宫颈癌活性

2.1 材料与仪器

2.1.1 试剂 SiHa 人子宫颈鳞癌细胞株、HeLa 子宫颈鳞癌细胞株(中国科学院上海细胞研究所); DMEM 培养基、改良型 RPMI1640 培养基、胎牛血清均来自 HyClone 公司; DMSO、PBS、胰蛋白酶、青/链霉素、MTT(Sigma 公司); 顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司); Penicillin-Streptomycin Solution、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(BD Biosciences)。

2.1.2 仪器 KS-18 生物安全柜(德国 Heraeus); CO₂ 孵育箱(德国 Heraeus); Allegra-64R 台式高速低温离心机(美国 Beckmann); AD340 酶标分析仪(美国 Beckmann); HHW420 型恒温水浴锅(深圳市博大精科技实业有限公司); BA210 倒置显微镜(德国 Motic); EPICS XL/XL-MCL 流式细胞仪(美国 Beckmann)。

2.2 方法与结果

2.2.1 细胞培养鳞癌细胞 人子宫颈鳞癌细胞株 SiHa, 采用含 10%胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素的 DMEM 培养液, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 每隔 24~48 h 更换培养基。

子宫颈鳞癌细胞株 HeLa, 采用含 10%胎牛血清, 100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素的 RPMI-1640 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 每隔 24~48 h 更换培养液。

2.2.2 生长曲线测定 取生长形态良好的 SiHa、HeLa 细胞均匀接种于 96 孔板中(密度为每毫升 2.5×10^4 个), 每组平行 6 孔, 每孔 200 μL , 周边

36孔用无菌PBS填充。培养24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 h后, 每孔加入20 μL MTT溶液($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 保持培养液原体积不变。在 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养4 h后, 加入100 μL DMSO溶解紫色结晶, 利用酶标仪测定490 nm (630 nm校准)波长下的OD值。

2.2.3 样品溶液的制备 将目标化合物以100% DMSO溶解后, 分别用完全培养液DMEM、RPMI-1640稀释成5% DMSO母液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤除菌后备用。

2.2.4 MTT法测定目标化合物对宫颈癌细胞增殖的抑制活性 分别取对数生长期的SiHa和HeLa细胞均匀接种于96孔板中(密度为每毫升 4×10^4 个), 每组平行6孔, 每孔200 μL , 周边36孔用无菌PBS填充。细胞贴壁后向每孔分别加入目标化合物(I~V)使其终浓度分别为12.5, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以此浓度进行药物干预24, 48, 72 h。干预后次日, 每孔加入20 μL MTT溶液($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 保持培养液原体积不变。在 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养4 h后, 加入100 μL DMSO溶解紫色结晶, 利用酶标仪测定490 nm (630 nm校准)波长下的OD值, 细胞生长抑制率(IR)=[(OD_空-OD_测)/OD_空] $\times 100\%$ 计算, 并用Bliss法计算IC₅₀, 判断细胞活力, 结果见图3(注: OD_空为空白对照组的吸光度值; OD_测为药物或阳性对

照组在某一浓度的吸光度值)。

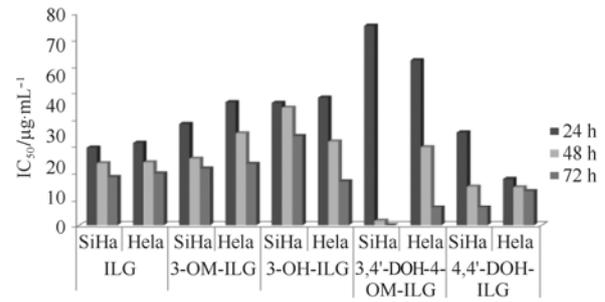


图3 异甘草素对SiHa与HeLa细胞IC₅₀

Fig. 3 The IC₅₀ of isoliquiritigenin derivatives about SiHa and HeLa cells

2.2.5 流式细胞仪测定促进宫颈癌细胞凋亡活性 分别选择对数生长期的SiHa细胞和Hela细胞, 以每孔 1×10^6 个的密度接种于6孔板, 培养24 h后, 以不同目标化合物的4种浓度(0, 12.5, 25, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行药物干预。待所有药物干预完成后, 收集细胞, 加入450 μL 的Binding Buffer悬浮细胞, 加入5 μL Annexin V-FITC混匀后, 加入碘化吡啶(PID)5 μL , 混匀后室温、避光反应5~15 min, 分别用流式细胞仪检测SiHa细胞和Hela细胞的凋亡情况, 结果见表1~2。(注: 流式细胞仪分析条件: 激发波长Ex=488 nm; 发射波长Em=530 nm。SiHa和Hela细胞的空白组的凋亡率均 $<3.00\%$)。

表1 异甘草素衍生物对SiHa细胞的凋亡率

Tab. 1 The apoptotic effect of SiHa cells with different isoliquiritigenin derivatives

凋亡率	ILG			3-MO-ILG			3-OH-ILG			3, 4'-DOH-4-MO-ILG		
	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
早期凋亡/%	7.8	30.7	39.8	8.2	8.7	38.6	11.6	24.4	35.0	10.5	14.8	6.6
晚期凋亡/%	1.3	1.8	3.8	0.2	0.5	1.4	0	7.3	5.1	1.2	1.8	23.2
总凋亡/%	9.1	36.9	43.6	8.4	9.2	40.0	11.6	31.7	40.1	11.7	16.6	29.8

表2 异甘草素衍生物对HeLa细胞的凋亡率

Tab. 2 The apoptotic effect of HeLa cells with different isoliquiritigenin derivatives

凋亡率	ILG			3-MO-ILG			3-OH-ILG			3, 4'-DOH-4-MO-ILG		
	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
早期凋亡/%	16.6	11.5	32.5	15.3	26.8	52.9	11.9	33.3	55.5	27.0	25.2	28.9
晚期凋亡/%	0.2	0.3	1.2	8.0	65.5	5.0	1.5	2.8	41.5	4.0	5.2	5.5
总凋亡/%	16.8	11.8	33.7	23.3	92.3	57.9	13.4	36.1	97.0	31.0	30.4	34.4

3 讨论

微波干法有机反应是将反应物浸渍在氧化铝、硅胶、粘土、硅藻或高岭石等多孔无机载体中进行的微波反应。这些无机固体载体与微波只有弱偶合作用, 而固体介质表面上所吸附的有机

反应物能充分吸收微波能量, 活化后使反应速率大大提高。微波辐射加热方式不同于传统的加热, 在极短的时间内, 能提供更大的能量, 更有利于化学键的断裂。结果就是化学反应的速度加快, 反应时间也相应的缩短, 从而提高目标化合

物的产率；通过查阅各类文献^[20]，本研究试过硼酸催化高温法^[21]和羟基保护法^[22]，均没有微波固相合成产率高。

经过反复试验，得到最佳反应功率为 150~200 W。当功率<100 W 时，反应物几乎未见变化；但功率>250 W，由于单位时间的能量过高，反应物会燃烧、碳化，从而导致产率下降。由于加入反应瓶中的反应物是分批次加入的，只要第 1 次反应完全后，后面的会好反应。所以在功率为 150~200 W 条件下，反应时间比较灵活，在起初反应时可以 150~200 s 若干次，待第 1 批反应完毕后，将反应物收集，后面批次反应时间均为 100 s。在实验过程中，氢氧化钾固体需研磨成粉末状固体，颗粒越细越好，目的是为了在反应过程中由于局部的温度过高导致自燃而发生碳化，导致产率下降。

干反应中不存在因溶剂挥发而形成高压的危险，可在较安全的条件下利用普通微波炉在敞口容器中进行，具有安全、高效、操作方便、产物纯化容易、装置简单等优点，避免了大量有机溶剂的使用。对解决环境污染具有现实意义。

本实验利用一种绿色、低耗能、零污染、操作简便、成本低和产率高的方法——微波固相反应，完成了对查尔酮异甘草素初步的结构修饰和目标化合物的合成，为在体外抗人宫颈癌活性的研究奠定物质基础。

采用 MTT 法测定目标化合物对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞抑制作用，药物浓度在 12.5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内，5 个目标化合物均显示出较强的抗宫颈癌活性。根据不同时间的 IC_{50} 和不同浓度的抑制率来评价目标化合物的抗宫颈癌活性：5 个目标化合物均显示出浓度依赖性 or 时间依赖性。ILG、3-MO-ILG、3-OH-ILG、4, 4'-DOH-ILG 对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞的抑制率明显是随着浓度 (12.5~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的增高而增大的，同时也是随着时间 (24, 48, 72 h) 而增大的。

综上所述，查尔酮异甘草素衍生物的目标化合物在浓度 12.5, 25, 50, 75, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的条件下，分别干预 SiHa 细胞和 HeLa 细胞 24, 48, 72 h，采用 MTT 法测定其对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞抑制增殖作用。实验结果表明，查尔酮类异甘草素衍生物的目标化合物对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞具有明显的浓度依赖性和时间依赖性。通过

查尔酮类异甘草素衍生物的目标化合物对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞抑制率的比较，本研究筛选出对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞具有较强的抑制作用的目标化合物——ILG、3-MO-ILG、3-OH-ILG 和 3, 4'-DOH-4-MO-ILG。为了进一步验证 MTT 结果，本研究测定其对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞的凋亡作用，实验结果表明，在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下，它们对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞的凋亡率>30%，具有明显的促凋亡作用。

然而，在倒置显微镜下观察发现，在 100, 150, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞形态出现皱缩甚至出现破裂或者裂解，表明，在此浓度下，3-OH-ILG 和 3, 4'-DOH-4-MO-ILG 对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞具有明显抑制增殖作用。

因此，查尔酮异甘草素衍生物对人宫颈癌细胞具有良好的生物活性，通过分析其构效关系得到，在 B 环上的 3 位引入 1 个甲氧基，得到 3-MO-ILG，其脂溶性增加，有利于穿过细胞膜渗透到细胞质中，进一步增强了其抗癌生物活性，表明甲氧基是增强抗肿瘤活性的一个基团。

在 ILG B 环上的 3 位引入 1 个羟基，得到 3-OH-ILG，也可以增强其抗肿瘤的生物活性；同时，ILG 在 A 环 2 位减少 1 个羟基，B 环上 3 位引入 1 个羟基，4 位引入 1 个甲氧基，得到 3, 4'-DOH-4-MO-ILG，羟基的减少，使化合物的脂溶性增加，也可以达到细胞中；在 ILG 的 A 环 2 位上减少 1 个羟基，得到 4, 4'-DOH-ILG，通过细胞增殖抑制率结果证明，4, 4'-DOH-ILG 对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞具有很强的生物活性，却低于 ILG 对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞的生物活性，表明羟基的存在是产生抗肿瘤生物活性的 1 个必要基团。因此，羟基和甲氧基的个数，及其在 A 环和 B 环上的位置对抗肿瘤生物活性具有重要影响。

本实验通过对 SiHa 细胞和 HeLa 细胞增殖抑制实验和细胞凋亡实验，筛选出了具有应用开发前景的化合物，为进一步的体内活性研究和作用机制研究奠定了重要的物质基础。

REFERENCES

- [1] 国家食品药品监督管理局. 化学药物稳定性技术指导原则 [S]. 2005.
- [2] 何三民, 石森林. HPLC 法测定甘草中甘草素、异甘草素、甘草苷的含量[J]. 中草药, 2003, 34(7): 618.
- [3] 古扎丽努尔·阿不力孜, 程静新, 米克热木, 等. 新疆维吾尔

- 族妇女宫颈癌 HPV 谱研究[J]. 肿瘤, 2007, 27(5): 379-382.
- [4] TAKAHASHI T, BABA M, NISHINO H, et al. Cyclooxygenase-2 plays a suppressive role for induction of apoptosis in isoliquiritigenin-treated mouse colon cancer cells [J]. Cancer Lett, 2006, 231(2): 319-325.
- [5] YOSHIDA T, HORINAKA M, TAKARA M, et al. Combination of isoliquiritigenin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in colon cancer HT29 cells [J]. Environ Health Prev Med, 2008, 13(5): 281-287.
- [6] AUYEUNG K K, KO J K. Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell [J]. Invest New Drugs, 2010, 28(1): 1-13.
- [7] ZHAO H X, ZHANG X H, CHEN X W, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 279(3): 311-321.
- [8] LEE Y M, LIM D Y, CHOI H J, et al. Induction of cell cycle arrest in prostate cancer cells by the dietary compound isoliquiritigenin [J]. J Med Food, 2009, 12(1): 8-14.
- [9] KWON G T, CHO H J, CHUNG W Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling [J]. J Nutr Biochem. 2009, 20(9): 663-676.
- [10] ZHANG X, YEUNG E D, WANG J, et al. Isoliquiritigenin, a natural anti-oxidant, selectively inhibits the proliferation of prostate cancer cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(8): 841-847.
- [11] YE L, GHO W M, CHAN F L, et al. Dietary administration of the licorice flavonoid isoliquiritigenin deters the growth of MCF-7 cells overexpressing aromatase [J]. Int J Cancer, 2009, 124(5): 1028-1036.
- [12] WANG N, WANG Z Y, WANG Y. Dietary compound isoliquiritigenin prevents mammary carcinogenesis by inhibiting breast cancer stem cells through WIF1 demethylation [J]. Oncotarget, 2015, 6(12): 9854-9876.
- [13] LAU G T, YE L, LEUNG L K. The licorice flavonoid isoliquiritigenin suppresses phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in the non-tumorigenic MCF-10A breast cell line [J]. Planta Med, 2010, 76(8): 780-785.
- [14] WANG K L, HSIA S M, CHAN C J. Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells [J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(4): 337-349.
- [15] WANG Z Y, WANG N, LIU P X, et al. MicroRNA-25 regulates chemoresistance-associated autophagy in breast cancer cells, a process modulated by the natural autophagy inducer isoliquiritigenin [J]. Oncotarget, 2014, 5(16): 7013-7026.
- [16] AUYEUNG K K, KO J K. Novel herbal flavonoids promote apoptosis but differentially induce cell cycle arrest in human colon cancer cell [J]. Invest New Drugs, 2010, 28(1): 1-13.
- [17] HSU Y L, KUO P L, LIN C C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells [J]. Life Sci, 2005, 77(3): 279-292.
- [18] MA J, FU N Y, PANG D B, et al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. Planta Med, 2001, 67(8): 754-757.
- [19] KAKATI D, SARMA J C. Microwave assisted solvent free synthesis of 1,3-diphenylpropanones [J]. Chem Cent J, 2011, 5(8): 1-5.
- [20] MOURBOUL A, ANWAR M, RENA K. Advance in study on the preparation techniques and pharmacological actions of isoliquiritigenin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(4): 277-280.
- [21] 李宏智, 艾尼瓦尔·买买提, 木合布力·阿布力孜, 等. 异甘草素衍生物的合成及结构表征[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(19): 1882-1885.
- [22] 戈夏, 李建其. 木犀草素和奥洛波尔的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(4): 159-161.

收稿日期: 2015-09-19

RRLC-ESI-MS/MS 分析白头翁皂苷在大鼠体内的组织分布

刘亚丽¹, 魏韶锋¹, 宋永贵², 李伟², 张凌², 杨世林², 王萌¹, 苏丹^{2*} (1.江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330025; 2.江西中医药大学中药制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 研究白头翁皂苷在大鼠体内的分布规律和蓄积情况。方法 以 300 mg·kg⁻¹ 白头翁皂苷提取物均匀分散混悬液单次灌胃给予大鼠后, 采用 RRLC-ESI-MS/MS 对白头翁皂苷中的有效成分 B3, BD, B7, B10, B11 在动物体内的组织分布情况进行考察。结果 白头翁皂苷在动物体内的分布迅速且广泛, 给药 0.25 h 后, 各组织脏器中即可检测到较高水平的药物浓度。5 种皂苷在大部分组织器官中的达峰时间为 30 min, 给药 2 h 后, 白头翁皂苷的浓度逐渐下降, 给药 6 h 后, 药物基本消除。在动物脑中亦可检测到药物的存在。结论 白头翁皂苷在体内不易蓄积, 主要分布在心脏、肝、肺、肾、小肠等器官, 心脏中药物浓度最高, 且可以透过血脑屏障。

关键词: 白头翁皂苷; RRLC-ESI-MS/MS; 组织分布

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)01-0006-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.002

基金项目: 国家自然科学基金(81460594); 江西省自然科学基金(20151BAB215038); 江西省卫计委科研项目(2015A054); 江西中医药大学博士启动基金(2010BS2037、2014BS019)

作者简介: 刘亚丽, 女, 博士, 讲师 Tel: 18007092727 E-mail: 582685133@qq.com *通信作者: 苏丹, 女, 博士, 副教授, 硕导 Tel: 13177859011 E-mail: Sud94@aliyun.com