

文章编号: 1674-8085(2021)01-0026-04

姜黄素-二氯乙酸偶联物的合成及抗肿瘤活性研究

*戴 一, 白 娟, 陶阿丽, 施福瑞

(安徽新华学院药学院, 安徽, 合肥 230088)

摘 要: 以二氯乙酸为起始原料通过制备酰氯后与姜黄素反应制得姜黄素-二氯乙酸偶联物。采用噻唑兰 (MTT) 法考察其对 HeLa、HepG2、A2780 及 A549 等 4 种肿瘤细胞的增殖抑制活性, 通过线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) 检测其对线粒体膜电位的破坏, 通过流式细胞术检测其诱导的细胞凋亡。结果发现姜黄素-二氯乙酸偶联物抗肿瘤活性比单纯的姜黄素、二氯乙酸及姜黄素与二氯乙酸的混合物更强, 且能更强地破坏线粒体膜电位及诱导细胞凋亡。可见姜黄素-二氯乙酸偶联物表现出显著的协同效应, 具有潜在的药物开发价值。

关键词: 姜黄素; 二氯乙酸; 偶联物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R284.3

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2021.01.005

SYNTHESIS AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF CONJUGATE OF CURCUMIN AND DICHLOROACETIC ACID

* DAI Yi, BAI Juan, TAO A-li, SHI Fu-rui

(Pharmacology College, Anhui Xinhua University, Hefei, Anhui 230088, China)

Abstract: Using dichloroacetic acid as starting material to prepare dichloroacetyl chloride, conjugate of curcumin and dichloroacetic acid was synthesized through reaction between curcumin and dichloroacetyl chloride. The in vitro antitumor activities of the conjugate was evaluated for HeLa, HepG2, A2780 and A 549 by MTT. Damage of mitochondrial membrane potential was measured by mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1 and apoptosis of cells were assayed by flow cytometry methods. The results showed that the antitumor activity of conjugate of curcumin and dichloroacetic acid was more potent than those of curcumin, dichloroacetic acid or mixture of curcumin and dichloroacetic acid, moreover, it can destruct mitochondrial membrane potential and induce apoptosis of cells, more strongly. It is evident that conjugate of curcumin and dichloroacetic acid has significant synergistic effects, with a potential value of drug development.

Key words: curcumin; dichloroacetic acid; conjugate; anti-tumor activity

姜黄粉为一味古老的植物药, 由草药姜黄的根茎制成。在印度传统医学及中医中均记载着姜黄粉可以用来预防和治疗多种疾病, 而其发挥药理作用的重要物质基础为姜黄素。姜黄素为一橙黄色的多酚天然成分, 除了在姜黄 (*Curcuma longa* Linn) 中

含有外, 在莪术 (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc) 和郁金 (*Curcuma aromatica* Salisb) 等植物中也有分布^[1]。姜黄素药理活性多样, 如抗炎、抗氧化、抗感染、肝脏保护、心脏保护及抗肿瘤作用, 其抗肿瘤活性及机制是研究的热点^[2-6]。姜黄素可以通过

收稿日期: 2020-10-12; 修改日期: 2020-11-22

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目(KJ2019A0873, KJ2019A0874); 安徽新华学院制药工程教学团队建设项目 (2017jxtdx08)

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);

白 娟(1987-), 女, 山东潍坊人, 讲师, 硕士, 主要从事制药工艺研究(E-mail:smallbai23@163.com);

陶阿丽(1983-), 女, 安徽合肥人, 教授, 硕士, 主要从事有机合成化学研究(E-mail:1982343785@qq.com);

施福瑞(1999-), 女, 安徽六安人, 安徽新华学院药学院药学专业 2016 级本科生(E-mail:281137963@qq.com).

多个靶点达到抗肿瘤的目的,如作用 NF- κ B、AP-1、STAT3、EGFR、P53、MMP-9 等抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡及阻滞肿瘤转移等^[7-8]。

二氯乙酸是一白色液体,靶向线粒体抑制丙酮酸脱氢酶激酶(PDK),干扰了肿瘤赖以生存的无氧糖酵解供能途径,导致细胞色素 c 的释放及凋亡诱导因子(AIF)向细胞核的转移,进而引起细胞凋亡^[9-10]。单独使用二氯乙酸时活性并不强,多药联合是抗肿瘤的有效方法^[11]。基于此,本实验设计合成了姜黄素-二氯乙酸偶联物,并初步研究了该偶联物的抗肿瘤活性,对线粒体膜电位的破坏及细胞凋亡诱导,以期实现二氯乙酸与姜黄素协同作用,提高姜黄素的抗肿瘤活性,为新型姜黄素衍生物的研究开发提供参考。

1 仪器与试剂

BruckerACF-300 型核磁共振仪,布鲁克(北京)科技有限公司;CytoFLEX 流式细胞仪,美国贝克曼库尔特公司;奥林巴斯 IX71 荧光显微镜,日本奥林巴斯公司;API3000 质谱仪,美国 PE 公司;bio-rad mode680 酶标仪,美国伯乐生命医学产品有限公司;姜黄素(纯度大约 98%),购于大连美仑生物技术有限公司。DEME 培养基购于 hyclone 公司,胎牛血清 FBS 购于 lonsera 公司,MTT、JC-1 试剂盒和细胞凋亡检测试剂盒均购置于碧云天试剂公司,其他试剂均为分析纯。受试细胞株人肝癌 HepG2 细胞、人宫颈癌细胞 HeLa 细胞、人卵巢癌 A2780 细胞及人肺癌 A549 细胞来自于美国 ATCC 公司。

2 目标化合物的合成

以二氯乙酸为起始原料,草酰氯作为酰化试剂合成二氯乙酰氯,所得酰氯在缚酸剂三乙胺存在的条件下与姜黄素发生酯化反应即合成出姜黄素-二氯乙酸偶联物,见图 1。产物经 NMR、MS、IR 确认结构。

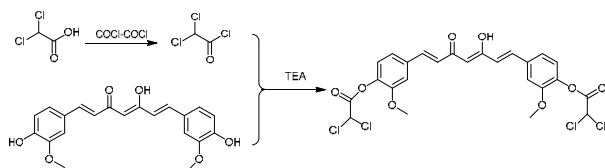


图 1 姜黄素-二氯乙酸偶联物的合成

Fig. 1 Synthesis of conjugate of curcumin and dichloroacetic acid

2.1 二氯乙酰氯的制备^[12]

取二氯乙酸(2 mL, 24 mmol)置于 250 mL 圆底烧瓶中,加 CH_2Cl_2 100 mL 溶解,缓慢加入草酰氯(10 mL, 120 mmol)及 2 滴 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),室温搅拌反应 4 h,蒸馏收集 108℃ 左右馏分得无色液体即为二氯乙酰氯,收率 74%。

2.2 姜黄素-二氯乙酸偶联物的合成

取姜黄素(228 mg, 1 mmol),溶于 50 mL 二氯甲烷中,加入三乙胺(277 μL , 2 mmol),冰水浴条件下缓慢滴加二氯乙酰氯(324 mg, 2.2 mmol);滴加完毕,室温搅拌反应, TLC 跟踪;反应完毕,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩,得黄色固体,收率为 62%。TLC 分析 R_f 约 0.5 (展开剂为石油醚:乙酸乙酯=2:1); ^1H NMR (300 MHz, Chloroform- d) δ 3.89(s, 6H), 5.88 (s, 1H), 6.21 (s, 2H), 6.59 (d, J = 15.8 Hz, 2H), 7.18 (m, 7H), 7.63 (d, J = 15.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 56.10, 63.86, 77.23, 102.02, 111.76, 120.96, 122.53, 124.82, 134.92, 139.65, 140.35, 151.10, 162.35, 182.99; IR(KBr) ν_{max} 3524, 3018, 2943, 2845, 1769, 1637, 1600, 1505, 1460, 1416, 1304, 1262, 1200, 1159, 1030, 968, 849, 815, 752 cm^{-1} ; m/z (ESI-MS) 591.0[M+H] $^+$, 589.2[M-H] $^-$ 。

3 结果与分析

3.1 体外抗肿瘤活性研究

于 96 孔板中接种对数生长期肿瘤细胞培养,每孔加 5000 个细胞 培养基为 100 μL , 于 37℃, 5% CO_2 的全湿条件下培养,培养过夜后给不同浓度的待测化合物,平行 3 个孔,阴性对照组加给药组等体积的培养基,以 DEME 培养基作为空白对照组,给药后继续培养 48 h,弃去培养液,每孔加 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL ,继续孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,震荡 10 min,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-(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})] $\times 100\%$ 。对姜黄素、二氯乙酸、姜黄素与二氯乙酸 1:2 摩尔比混合物及姜黄素-二氯乙酸偶联物进行 MTT 抗癌活性实验,结果见表 1。姜黄素与二氯乙酸混合物活性明显高于姜黄素,体现了姜黄素与二氯乙酸之间具有协同效应,且姜黄素-二氯乙酸偶联物的活性又高于姜黄素与二氯乙酸的混合物,尤其

对 A549 细胞、A2780 细胞及 HepG2 细胞, 姜黄素-二氯乙酸偶联物均表现出较强的肿瘤抑制活性, IC_{50} 值分别为 $(12.42 \pm 2.16) \mu M$ 、 $(16.69 \pm 7.17) \mu M$ 和 $(12.44 \pm 1.10) \mu M$, 相比于母体化合物姜黄素(IC_{50} 值分别为 $(18.84 \pm 3.12) \mu M$ 、 $(23.83 \pm 4.36) \mu M$ 和 $(28.35 \pm 4.8 \mu M)$)活性提高了 1 倍左右, 姜黄素与二氯乙酸进行偶联, 具有较强的协同效果, 为姜黄素新型衍生物的开发提供了依据。

表 1 姜黄素-二氯乙酸偶联物体外抗肿瘤活性结果

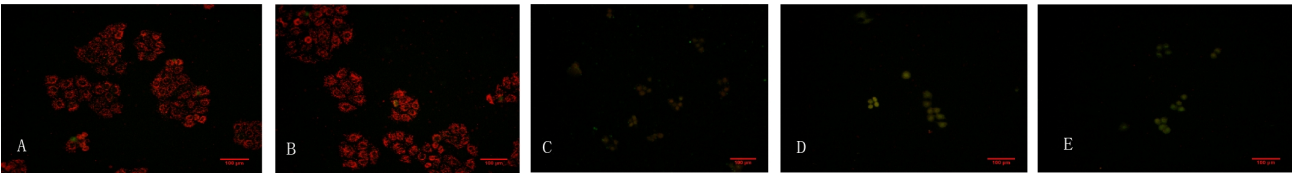
Table 1 In vitro antitumor activities of conjugate of curcumin and dichloroacetic acid

化合物	$IC_{50}(\mu M)$			
	HepG2	HeLa	A2780	A549
姜黄素	28.35 ± 4.80	15.97 ± 3.71	23.83 ± 4.36	18.84 ± 3.12
姜黄素与二氯乙酸混合物(1:2)	27.31 ± 3.98	10.09 ± 1.89	28.06 ± 12.61	17.64 ± 2.89
姜黄素与二氯乙酸偶联物	12.44 ± 1.10	13.62 ± 2.02	16.69 ± 7.17	12.42 ± 2.16
二氯乙酸	>400	>400	>400	>400

3.2 姜黄素-二氯乙酸偶联物对线粒体膜电位的破坏

基于线粒体途径的细胞凋亡早期可看到线粒体膜电位的破坏,通过 JC-1 荧光探针测定红绿荧光

的相对比率可研究线粒体去极化的比例。于 6 孔板中接种 HepG2 细胞, 每孔 10 万个细胞, 2 mL 完全培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱培养过夜, 于次日分别用含药培养基进行替换继续培养 24 h, 所加药物的浓度姜黄素-二氯乙酸偶联物、姜黄素、姜黄素与二氯乙酸混合物 (摩尔比 1:2) 以姜黄素计均为 100 μM , 二氯乙酸为 200 μM 。24 h 后按线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1) (购于碧云天生物) 原位处理, 经 PBS 洗涤后用荧光显微镜观察。单独二氯乙酸在考察时间内对线粒体几乎没有影响, 与对照组一样染色后以红色荧光主导, 几乎看不到绿色。对于单独的姜黄素组, 可见到明显的绿色, 单独的姜黄素对细胞线粒体电势产生了破坏作用, 但其红绿荧光的比率明显大于姜黄素与二氯乙酸混合物组, 说明姜黄素与二氯乙酸具有协同作用, 更强地破坏线粒体膜电位, 但其强度仍略低与姜黄素-二氯乙酸偶联物, 可能是姜黄素-二氯乙酸偶联物具有更高的脂溶性, 细胞摄取更高而产生了更强的作用。因此, 姜黄素-二氯乙酸偶联物具有更高的生物活性。



(A:对照; B:二氯乙酸; C:姜黄素; D:姜黄素与二氯乙酸混合物; E:姜黄素-二氯乙酸偶联物)

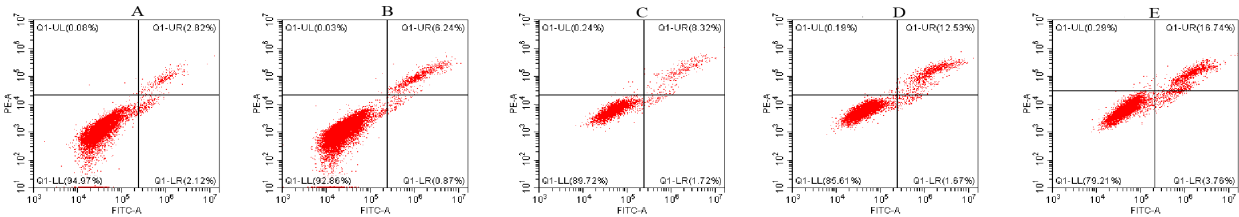
图 2 姜黄素-二氯乙酸偶联物对线粒体膜电位的破坏

Fig. 2 Damage of conjugate of curcumin and dichloroacetic acid to mitochondrial membrane potential

3.3 姜黄素与二氯乙酸偶联物诱导细胞凋亡

于 12 孔板中接种 HepG2 细胞, 每孔 20 万个细胞, 1 mL 完全培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱培养过夜, 于次日分别用含药培养基进行替换继续培养 48 h, 所加药物的浓度姜黄素-二氯乙酸偶联物、姜黄素、姜黄素与二氯乙酸混合物 (摩尔比 1:2) 以姜黄素计均为 50 μM , 二氯乙酸的为 100 μM 。48 h 后按 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书 (购于碧

云天生物) 收集所有细胞, 经 PBS 洗涤后加 Annexin V-FITC 及 PI 进行染色, 流式细胞仪检测。结果可见, 相比于对照组, 单独的二氯乙酸诱导的细胞凋亡略高, 而单独姜黄素组诱导的凋亡提高了 1.03 倍, 姜黄素与二氯乙酸混合物则提高了 1.88 倍, 姜黄素-二氯乙酸偶联物提高了 3.15 倍, 可见姜黄素与二氯乙酸具有协同作用, 且偶联组合效果更好, 与 MTT 结果基本一致。



(A: 对照 4.94; B: 二氯乙酸 7.11; C: 姜黄素 10.04; D: 姜黄素与二氯乙酸混合物 14.2; E: 姜黄素-二氯乙酸偶联物 20.5)

图 3 姜黄素-二氯乙酸偶联物诱导凋亡

Fig. 3 Effect of conjugate of curcumin and dichloroacetic acid on the apoptosis dichloroacetic acid

4 小结

姜黄素作为一个酚类天然产物,受到广泛地关注,尤其在抗肿瘤领域研究较为活跃。在对抗肿瘤的研究中,姜黄素采用了多种形式,如纳米药物运输、结构改造、多药联用等^[13-14];本实验采用酯化反应,通过姜黄素的羟基与二氯乙酸成酯制成前药,二氯乙酸可以干扰线粒体代谢途径达到抗肿瘤目的。该合成的前药姜黄素-二氯乙酸偶联物在细胞内酯酶作用下释放出姜黄素与二氯乙酸,起到协同抗肿瘤效果。通过 MTT 实验可见,对 4 种肿瘤细胞 A549、HepG2、A2780 及 HeLa 均表现出较强的肿瘤抑制活性,相比于母体化合物肿瘤抑制活性有了明显的提高,在线粒体膜电位及凋亡诱导研究中,表现出的结果与 MTT 结果一致,偶联物均较母体化合物姜黄素有了显著的提高,体现了姜黄素与二氯乙酸之间的协同效应,说明姜黄素与二氯乙酸的偶联组合对于更高活性姜黄素衍生物开发是一个有效选择。

参考文献:

- [1] Aggarwal B B, Sundaram C, Malani N, et al. Curcumin: the Indian solid gold [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595(1):1-75.
- [2] Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N, et al. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes [J]. *Planta Med*, 1983, 49(3):185-187.
- [3] Sreejayan, Rao M N. Nitric oxide scavenging by curcuminoids[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1997, 49(1):105-107.
- [4] Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 206(2):533-540.
- [5] Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1[J]. *Oncogene*, 2006, 25(2):278-287.
- [6] Divya C S, Pillai M R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis [J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(5):320-332.
- [7] Shanmugam M K, Rane G, Kanchi M M, et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment [J]. *Molecules*, 2015, 20(2):2728-2769.
- [8] Vallianou N G, Evangelopoulos A, Schizas N, et al. Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2):645-651.
- [9] Dhar S, Lippard S J. Mitaplatin, a Potent Fusion of Cisplatin and the Orphan Drug Dichloroacetate[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(52):22199-22204.
- [10] Bonnet S, Archer S L, Allalunis-Turner J, et al. A Mitochondria-Kp Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1):37-51.
- [11] Kiberstis P A, Travis J. Stocking oncology's medicine cabinet [J]. *Science*, 2017, 355(6330):1142-1143.
- [12] Biancalana L, Zacchini S, Ferri N, et al. Tuning the cytotoxicity of ruthenium(II) para-cymene complexes by mono-substitution at a triphenylphosphine/ phenoxy diphenyl phosphine ligand[J]. *Dalton Trans*, 2017, 46(47):16589-16604.
- [13] Rodrigues F C, Anil Kumar N V, Thakur G. Developments in the anticancer activity of structurally modified curcumin: an up-to-date review [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 177:76-104.
- [14] Tomeh M A, Hadianamrei R, Zhao X. A Review of curcumin and its derivatives as anticancer agents [J]. *Int J Mol Sci*. 2019, 20(5):1033.