

靶向 PDGF 受体抑制剂的齐墩果酸类似物合成及其抗肿瘤生物活性研究

李倩雯, 蒯振彧, 李孝孝, 徐川东, 孟艳秋*

(沈阳化工大学制药工程教研室, 辽宁 沈阳 110142)

摘要: 采用计算机辅助设计, 将 PDGF 受体与已知活性的化合物进行模拟对接, 并通过对靶蛋白上发挥活性作用的关键氨基酸残基片段进行解析, 确定能和关键位点结合的活性基团, 以天然产物齐墩果酸为母体, 在其 2 位上引入活性基团, 同时对其 C-28 位羧基进行酯化和酰胺化结构修饰, 设计并合成了一系列靶向 PDGF 受体抑制剂且具有一定抗肿瘤活性的齐墩果酸类似物, 其结构经 MS、NMR 确证。采用 MTT 法, 选用人胃癌细胞 (SGC-7901) 和人肺癌细胞 (A549) 进行初步的体外抗肿瘤活性筛选。采用 FPIA 法, 对 **I**₃ 和 **II**₅ 进行 PDGF 受体蛋白抑制实验。活性测试表明化合物 **I**₃、**II**₅ 与阳性对照药物相比表现更强的抑制作用。FPIA 测试表明化合物 **II**₅ 和 PDGF 受体蛋白具有较好的结合能力。因此, 新合成的齐墩果酸类似物抗肿瘤活性明显高于母体化合物, 值得进一步研究。

关键词: 齐墩果酸类似物; 结构改造; 计算机辅助设计

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2076-09

Targeting PDGF receptor inhibitors: synthesis and biological evaluation of oleanolic acid analogs

LI Qian-wen, KUAI Zhen-yu, LI Xiao-xiao, XU Chuan-dong, MENG Yan-qiu*

(Department of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: The computer-aided design was used to simulate the docking of PDGF receptor with known active compounds, and the active groups that can bind to key sites were identified by analyzing the key amino acid residue fragments that exerted active effects on the target proteins. The natural product oleanolic acid was used as the parent, and the active group was introduced into the 2-position, and the C-28 carboxyl group was esterified and amidated. A series of oleanolic acid analogues targeting PDGF receptor inhibitors were designed and synthesized. Their structures were confirmed by MS and NMR. Through MTT assay, SGC-7901 and A549 cells were selected for preliminary *in vitro* anti-tumor activity screening. PDGF receptor protein inhibition test was performed on **I**₃ and **II**₅ by FPIA. The activity tests showed that **I**₃ and **II**₅, compared with the positive control drug, had stronger inhibition. FPIA test showed that **II**₅ and PDGF receptor protein had good binding ability. The newly synthesized oleanolic acid analogues have significantly higher antitumor activity than the parent compound and deserve further study.

Key words: oleanolic acid derivatives; structural modification; computer aided design

收稿日期: 2018-09-03; 修回日期: 2018-10-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21372156); 辽宁省创新团队资助立项 (LT2017009); 辽宁省教育厅科研项目 (LFD2017004); 辽宁省自然科学基金资助项目 (201602588); 沈阳市科学技术计划项目 (F16-230-6-00).

*通讯作者 Tel: 86-24-89383903, Fax: 86-24-89383760, E-mail: myq6581@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0806

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 是一种以游离和/与糖结合形式广泛存在于夏枯草、怀牛漆、油橄榄、连翘、青叶胆和女贞子等植物中的五环三萜类化合物^[1,2]。齐墩果酸具有多种重要的药理活性,如抗病毒、降血糖、抗糖尿病、抗 HBV 和抗肿瘤^[3-6]等。本课题组自 2000 年以来,开展了五环三萜类似物的设计合成及抗肿瘤活性研究,主要集中在乳香酸、熊果酸、积雪草酸的结构修饰及体外抗肿瘤活性评价^[7-10]。此外,通过计算机辅助设计,在模拟解析化合物与蛋白靶点结合的基础上,指导齐墩果酸、积雪草酸等五环三萜化合物的结构改造,取得一定的进展^[11,12]。

PDGF 受体属于受体酪氨酸激酶跨膜糖蛋白二聚体分子^[13],其自分泌生长方式和肿瘤组织细胞内的高表达,在 PDGF 受体阳性细胞恶性转化及其侵袭转移中起到重要作用^[14,15]。目前,通过抑制 PDGF 受体的酪氨酸蛋白激酶活性及信号传导,从而抑制肿瘤新生血管生成,去寻找新的抗肿瘤药物已成为肿瘤治疗中的热点^[16]。FDA“快通道”审批的多靶点、多激酶抑制剂索拉菲尼,具有脲基结构,高效作用于 PDGF 受体、VEGF 受体等靶点,通过抑制酪氨酸激酶的磷酸化,阻止其与底物蛋白分子结合,从而达到阻断细胞内信号转导通路的目的^[17,18]。乙磺酸尼达尼布具有苯胺亚甲基结构,可以竞争性地结合于受体激酶结构域上的三磷酸腺苷结合位点,阻滞胞内信号转导^[19,20]。结合 PDB 数据库中 PDGF 受体的三维

晶体结构 (PDB: 1SHA),运用分子模拟对接方法分析了已知 PDGF 受体小分子抑制剂与靶酶的相互作用,解析靶蛋白发挥活性作用的关键氨基酸残基片段,确定能够和关键位点结合的活性基团 (图 1),并将部分抑制剂结构中的活性基团片段创新性地引入到五环三萜母体中,主要结构改造集中在 2 位引入相应活性基团 (图 2)。设计合成了 10 个新型齐墩果酸类似物,并进行了体外抗肿瘤活性测试和 PDGF 受体抑制活性测试。

本文通过计算机模拟分析出已上市的两抗肿瘤药物的关键活性结构 (图 1),并将其与前期 Meng's 课题组对五环三萜化合物的结构修饰相结合,将活性基团引入齐墩果酸 2 位。通过计算机分子对接模拟分析 **I₃**、**II₅** 与 PDGF 靶蛋白的结合方式,均显示出较为紧密的结合能力。通过体外抗肿瘤活性测试,结果表明化合物 **I₃**、**II₅** 在抗 SGC-7901 和 A549 细胞上比阳性对照物吉非替尼具有更为突出的抗肿瘤活性,与多柔比星相当。通过 PDGF 受体抑制活性测试,结果表明化合物 **II₅** 与 PDGF 受体有较好的结合能力。

结果与讨论

1 化学合成

以 OA 为原料,设计并合成了两类共 10 个化合物,其结构经 NMR、MS 确认,数据见表 1 和表 2。首先采用 Jones' 试剂将齐墩果酸 3 位羟基氧化成酮,

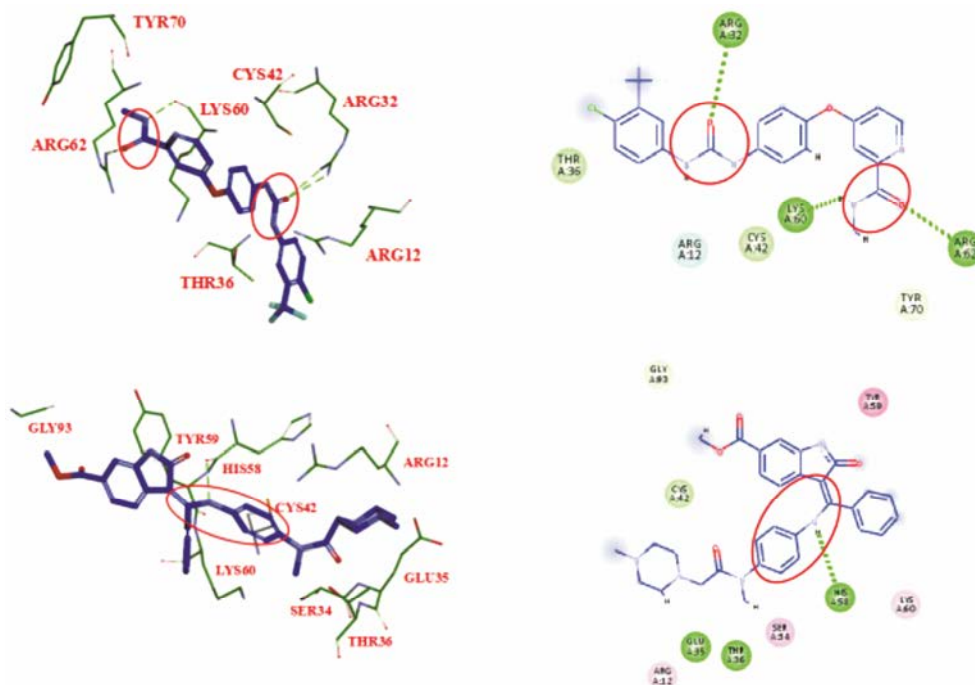


Figure 1 Analysis of the interaction of nintedanib esylate and sorafenib with 1SHA, the key amino acids: ARG32, HIS58

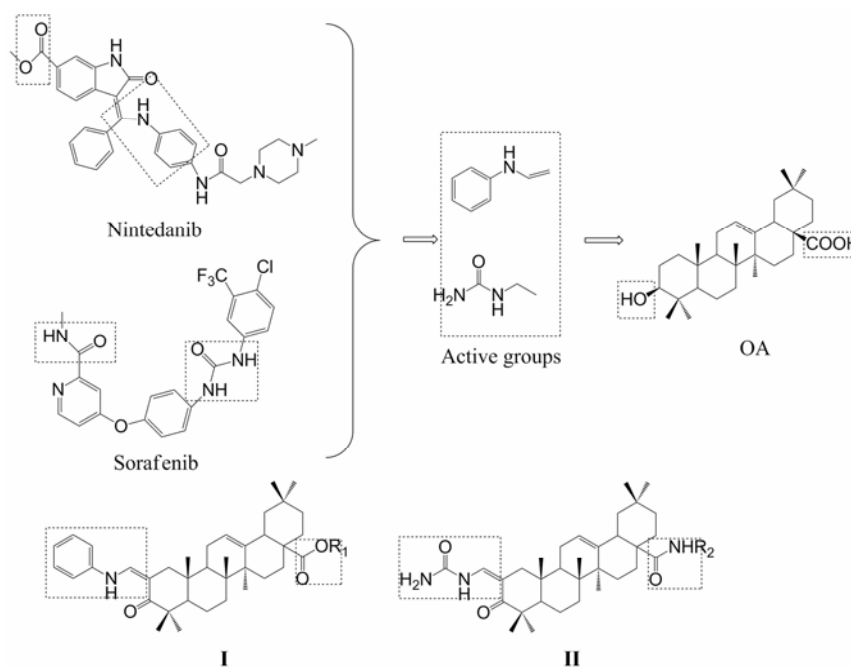


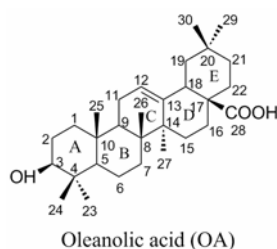
Figure 2 The analytical active groups introduce oleanolic acid and design new derivatives

Table 1 The NMR date of target compounds **I**₁₋₅, **II**₁₋₅

Compd.	¹ H NMR (CDCl ₃ , 600 MHz)	¹³ C NMR (CDCl ₃ , 150 MHz)
I ₁	12.05 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H, C ₆ H ₅ NH), 7.29–7.01 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.36 (s, 1H, H-12), 4.07–4.11 (m, 2H, OCH ₂ CH ₃), 1.94–1.99 (m, 3H, OCH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.13 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.85 (s, 3H).	204.2, 176.9, 145.2, 142.5, 139.6, 129.7, 123.6, 122.2, 116.7, 105.5, 62.1, 53.6, 51.4, 47.4, 46.7, 44.6, 42.8, 42.2, 42.1, 39.8, 38.7, 38.2, 34.4, 33.1, 32.9, 30.8, 29.3, 26.5, 26.3, 23.2, 22.4, 21.9, 20.5, 17.2, 14.4
I ₂	12.07 (d, <i>J</i> = 12.4 Hz, 1H, C ₆ H ₅ NH), 7.30–7.02 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.35 (s, 1H, H-12), 3.11–3.07 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.79–1.84 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.12 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.83 (s, 3H).	204.7, 178.6, 143.2, 140.0, 127.9, 124.2, 121.4, 117.8, 107.1, 66.1, 52.9, 50.2, 49.1, 46.1, 41.9, 41.1, 40.1, 38.2, 37.6, 34.1, 32.7, 32.1, 31.4, 29.2, 26.2, 25.6, 24.5, 23.1, 22.7, 21.0, 20.1, 16.9, 10.1
I ₃	12.04 (d, <i>J</i> = 11.9 Hz, 1H, C ₆ H ₅ NH), 7.28–7.03 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.33 (s, 1H, H-12), 3.08–3.13 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.75–1.79 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.14 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.86 (s, 3H).	203.2, 176.1, 144.9, 141.9, 139.7, 127.6, 121.9, 121.3, 116.2, 107.2, 67.2, 55.1, 50.9, 49.2, 47.2, 45.1, 41.1, 40.9, 40.1, 38.9, 38.0, 35.1, 33.9, 33.2, 32.1, 31.5, 28.1, 26.1, 25.7, 24.7, 23.2, 22.4, 20.2, 18.2, 16.2, 12.1
I ₄	12.06 (d, <i>J</i> = 12.2 Hz, 1H, C ₆ H ₅ NH), 7.27–7.00 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.34 (s, 1H, H-12), 4.07–4.12 (m, 2H, OCH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃), 1.71–1.74 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃), 1.13 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.82 (s, 3H).	204.5, 176.3, 144.8, 139.1, 128.2, 122.9, 116.9, 107.1, 66.1, 53.9, 52.1, 47.2, 46.9, 44.2, 42.6, 42.8, 40.9, 38.7, 38.0, 34.3, 32.2, 31.8, 30.1, 29.2, 28.1, 27.1, 26.1, 25.2, 24.9, 23.7, 23.2, 22.5, 22.3, 20.1, 17.6, 14.3
I ₅	12.02 (d, <i>J</i> = 12.1 Hz, 1H, C ₆ H ₅ NH), 7.25–6.98 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.33 (s, 1H, H-12), 4.02–4.08 (m, 2H, OCH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃), 1.42–1.44 (m, 2H, OCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃), 1.15 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.85 (s, 3H).	204.4, 176.9, 144.4, 142.4, 139.7, 129.0, 122.9, 122.3, 116.5, 105.4, 65.2, 53.2, 51.1, 47.3, 46.1, 44.2, 42.9, 42.7, 40.2, 38.7, 38.3, 34.6, 32.6, 32.4, 30.4, 29.2, 28.7, 26.2, 26.1, 25.1, 23.5, 23.4, 22.6, 22.4, 20.5, 17.1, 14.5
II ₁	9.34 (s, 1H, NHC ₆ H ₅), 7.80 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H, H ₂ NCONHCH), 7.79–7.22 (m, 5H, C ₆ H ₅ NH), 5.36 (s, 1H, H-12), 1.23 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.85 (s, 3H).	205.3, 174.9, 157.4, 144.3, 138.5, 128.1, 128.0, 127.4, 123.8, 121.4, 110.2, 53.7, 51.2, 46.8, 45.6, 44.2, 42.5, 41.9, 40.2, 38.6, 37.9, 33.2, 32.3, 30.9, 30.2, 28.8, 27.3, 26.8, 26.4, 23.8, 22.2, 17.7
II ₂	9.33 (s, 1H, NHC ₆ H ₄ F), 7.97–7.25 (m, 4H, NHC ₆ H ₄ F), 7.76 (d, <i>J</i> = 10.2 Hz, 1H, H ₂ NCONHCH), 5.34 (s, 1H, H-12), 1.29 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.83 (s, 3H).	204.9, 176.1, 158.2, 144.5, 127.6, 122.9, 109.2, 66.1, 52.1, 51.4, 47.9, 46.9, 43.9, 42.6, 42.2, 41.9, 41.2, 38.9, 37.5, 34.0, 31.5, 31.2, 30.1, 29.5, 26.1, 25.8, 24.2, 23.5, 22.4, 21.2, 20.1, 17.0, 11.1
II ₃	9.34 (s, 1H, NHC ₆ H ₄ Cl), 7.78–7.20 (m, 4H, NHC ₆ H ₄ Cl), 7.79 (d, <i>J</i> = 10.9 Hz, 1H, H ₂ NCONHCH), 5.38 (s, 1H, H-12), 1.39 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.75 (s, 3H).	205.2, 178.1, 137.2, 128.3, 123.4, 122.9, 116.9, 105.1, 65.9, 53.1, 50.9, 47.3, 46.9, 44.2, 42.8, 42.5, 41.1, 38.9, 38.0, 35.0, 32.1, 31.4, 30.1, 28.7, 27.0, 26.2, 24.2, 23.5, 22.4, 20.1, 18.1, 17.9
II ₄	9.31 (s, 1H, NHC ₆ H ₄ CH ₃), 7.63 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H, H ₂ NCONHCH), 7.23–7.10 (m, 4H, NHC ₆ H ₄ CH ₃), 5.36 (s, 1H, H-12), 2.31 (s, 3H, NHC ₆ H ₄ CH ₃), 1.40 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.84 (s, 3H).	205.2, 176.5, 158.1, 144.3, 127.3, 123.4, 110.9, 65.2, 53.6, 51.9, 47.3, 46.2, 44.9, 42.5, 42.0, 41.0, 38.9, 37.1, 34.9, 32.1, 31.7, 30.1, 28.5, 28.2, 27.3, 26.5, 25.9, 24.2, 23.1, 22.1, 21.7, 19.8, 16.5, 14.7
II ₅	9.29 (s, 1H, NHC ₆ H ₄ OCH ₃), 7.82 (d, <i>J</i> = 10.2 Hz, 1H, H ₂ NCONHCH), 7.21–7.07 (m, 4H, NHC ₆ H ₄ OCH ₃), 5.34 (s, 1H, H-12), 3.80 (s, 3H, NHC ₆ H ₄ OCH ₃), 1.44 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.80 (s, 3H).	204.8, 177.6, 157.2, 144.5, 127.2, 122.9, 111.2, 65.2, 53.2, 51.9, 47.2, 46.9, 44.1, 42.9, 42.2, 40.2, 38.6, 37.2, 34.1, 32.9, 32.3, 31.1, 30.2, 29.3, 28.1, 25.2, 25.1, 24.1, 23.5, 22.2, 21.9, 20.2, 17.2, 13.9

Table 2 The MS and elemental analysis date of target compounds **I**₁₋₅, **II**₁₋₅

Compd.	ESI-MS (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺	Elemental anal./found (calcd.)			
		C	H	N	O
I ₁	586.42	79.93 (79.95)	9.48 (9.46)	2.37 (2.39)	8.16 (8.19)
I ₂	600.43	80.12 (80.09)	9.56 (9.58)	2.31 (2.33)	8.02 (8.00)
I ₃	614.45	80.22 (80.21)	9.71 (9.69)	2.24 (2.28)	7.80 (7.82)
I ₄	628.47	80.31 (80.33)	9.78 (9.79)	2.26 (2.23)	7.68 (7.64)
I ₅	642.48	80.43 (80.45)	9.96 (9.89)	2.29 (2.18)	7.53 (7.48)
II ₁	600.91	76.06 (76.09)	8.93 (8.91)	7.03 (7.01)	8.06 (8.00)
II ₂	618.40	73.83 (73.87)	8.50 (8.48)	6.79 (6.80)	7.75 (7.77)
II ₃	634.37	71.94 (71.96)	8.24 (8.26)	6.65 (6.62)	7.58 (7.57)
II ₄	614.42	76.35 (76.31)	9.05 (9.03)	6.81 (6.85)	7.80 (7.82)
II ₅	630.42	74.36 (74.37)	8.77 (8.80)	6.69 (6.67)	10.18 (10.16)



得到 OA-1, 在此基础上, 将 28 位的羧基成酰胺或酯, 得到化合物 OA-2 或 OA-4, 然后与甲酸乙酯反应, 在碱性条件下反应 12 h 得到化合物 OA-3 和 OA-5, 进一步在 2 位上引入苯胺和脲基, 形成 2-苯胺亚甲基-3-羰基-齐墩果烷-12-烯-28-羧酸酯类化合物 **I**_{1~5} 和

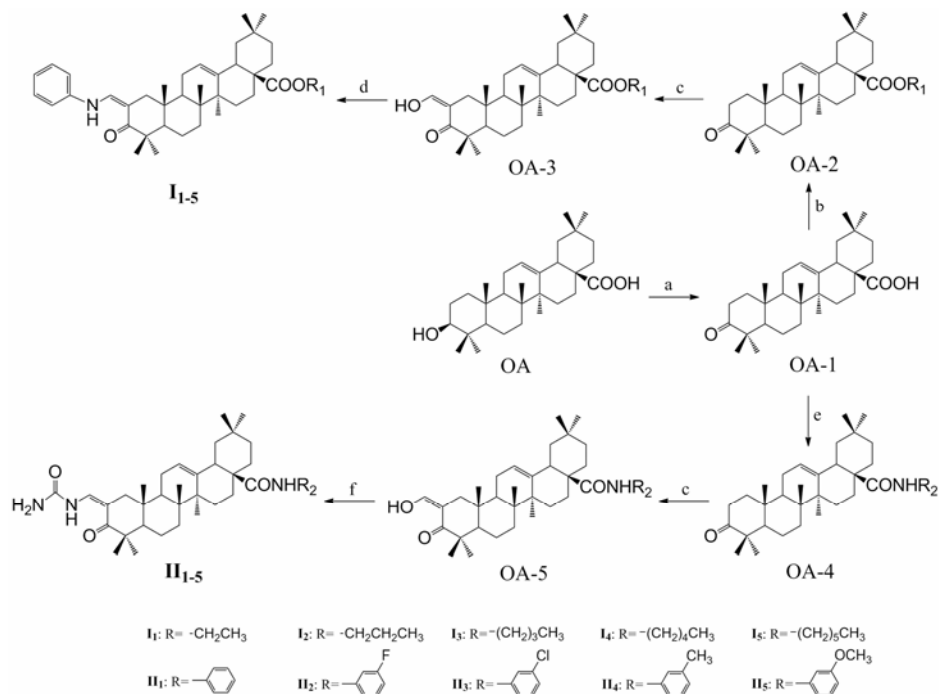
2-脲亚甲基-3-羰基-齐墩果烷-12-烯-28-羧酸酰胺类 **II**_{1~5}, 目标化合物的合成见合成路线 1。

2 生物活性评价

以吉非替尼和多柔比星为阳性对照物, 采用四甲基偶氮唑盐法 (MTT 比色法) 对合成的化合物进行初步的体外抗肿瘤活性测试, 实验结果见表 3。

3 分子对接

通过分子对接模拟显示齐墩果酸衍生物 **I**₁₋₅、**II**₁₋₅ 与 PDGF 受体 (PDB 编号: 1SHA) 的结合都具有较强的亲和力。Molegro virtual docker (MVD) 软件能够预测和计算蛋白质与大分子的配体相互作用和能量, 通过函数打分将结果通过数值直观表达, 分



Reagents and conditions: (a) Jones, acetone, r.t., 2.5 h; (b) DMF, K₂CO₃, R₁Br, 5 h; (c) Toluene, *t*BuOK, r.t., 12 h; (d) EtOH, aniline, reflux, 4 h; (e) DCM, (COCl)₂, r.t., 4 h; amins, DCM, r.t., 24 h; (f) EtOH, urea, reflux, 4 h.

Scheme 1 The synthesis routes of target compounds

Table 3 Inhibitory activity of the target compounds on the SGC7901 and A549 cells proliferation. Inhibitory percentage of cells treated with each compound at a concentration of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 72 h

Compd.	Inhibition rate/%		$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	SGC7901	A549	SGC7901	A549
OA	17.01	21.20	>50	>50
I₁	29.22	31.41	>50	>50
I₂	44.88	35.23	28.09	25.16
I₃	72.66	71.71	4.46	5.77
I₄	47.23	50.21	10.11	10.08
I₅	45.91	55.39	24.12	20.01
II₁	43.17	41.51	21.23	20.11
II₂	31.14	35.27	>50	>50
II₃	47.43	49.11	21.79	20.12
II₄	60.12	59.78	9.24	9.01
II₅	77.23	75.10	4.01	4.49
Gefitinib	50.91	41.49	19.11	25.47
Adriamycin	80.09	88.19	2.89	2.07

数表示为结合自由能 (E_{score} kcal·mol⁻¹), (MloDock Score, $E_{\text{score}}=E_{\text{inter}}+E_{\text{intra}}$, E_{inter} 表示配体-蛋白质相互作用

用能量, E_{intra} 表示配体内部能量)。MVD 评估 1SHA 与分子之间的连接情况。能量分数 (kcal·mol⁻¹) 的绝对值越大, 结合亲和力越强。使用 MVD6.0, 结合分数显示化合物 **I₃**: -105.036, 化合物 **II₅**: -114.987, 自身小分子配体 (-100.450)。

通过 Discovery Studio 4.0 直观分析对化合物和靶点的结合情况, 发现所设计的齐墩果酸类似物能够插入到 PDGF 受体靶标中并与周围一些氨基酸紧密连接 (图 3 和图 4), 化合物 **I₃** 和 **II₅** 牢固地嵌入了靶点的活性口袋中, 它们通过疏水键和 H-键与氨基酸相互作用 (与之相互作用的氨基酸残基分别为 **I₃**: ARG12、LYS60、ILE71、SER73、ARG74、TYB59、HIS58、LYS57; **II₅**: ILE71、CEU94、TYR59、LYS60、CYS42、ARG32、SER73、THR72)。如图 5 和图 6, 化合物 **I₁** 和 **II₂** 也可与活性口袋中的氨基酸残基相互作用 (与之相互作用的氨基酸残基分别为 **I₁**: LYS60、CYS42、TYR70、ARG12; **II₂**: TYR59、LYS60、THR36、SER73), 但相互作用的氨基酸数量明显减少, 可能

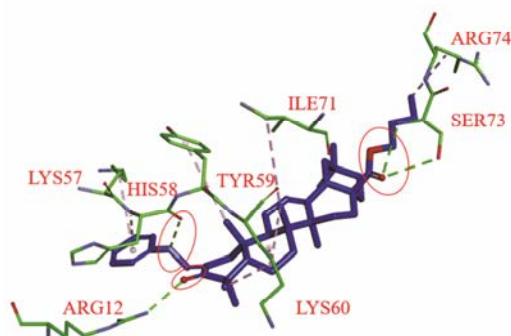


Figure 3 Binding of compound **I₃** to the active site of PDGFR, it exhibited 1 H-bond with HIS58, the hydrogen bonds formed colored in green

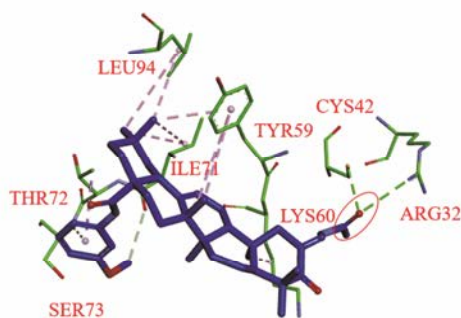
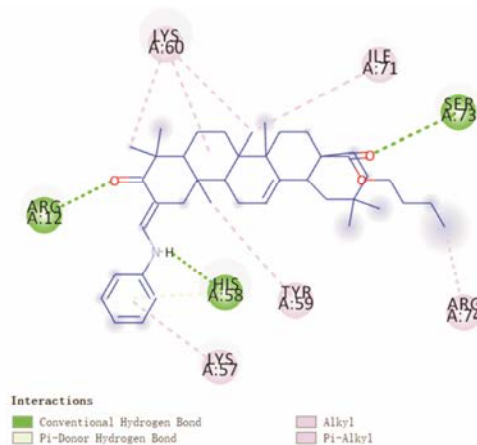
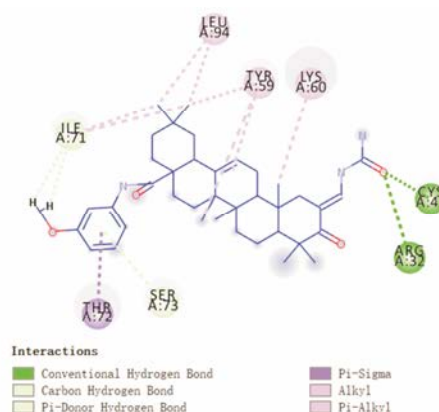


Figure 4 Binding of compound **II₅** to the active site of PDGFR, it exhibited 1 H-bond with ARG32 and 1 H-bond with CYS42, the hydrogen bonds formed colored in green



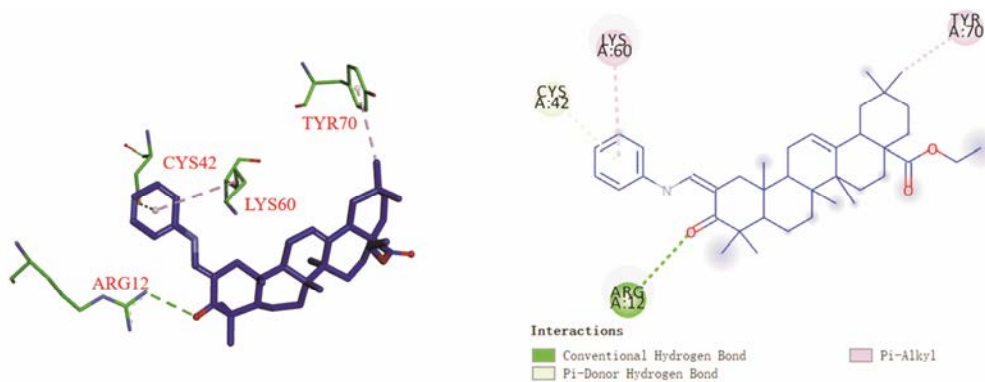


Figure 5 Binding of compound **I**₁ to the active site of PDGFR

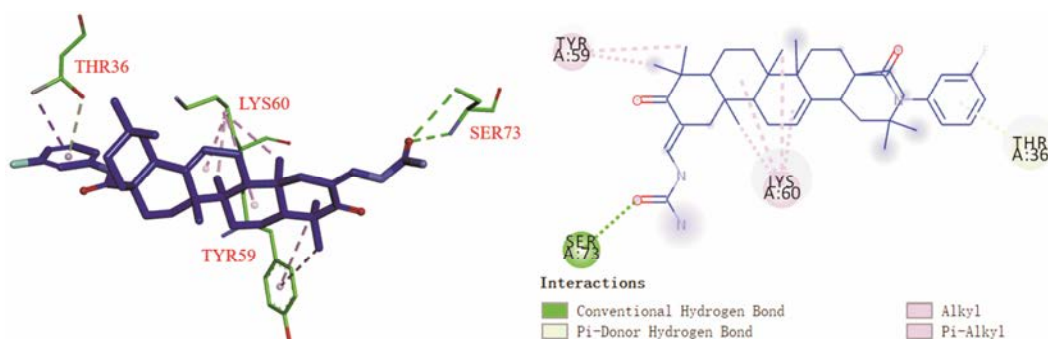


Figure 6 Binding of compound **II**₂ to the active site of PDGFR

导致化合物与 PDGF 受体的相互作用减弱, 影响其抗肿瘤活性。所有化合物的 MolDock 评分如表 4 所示。

Table 4 Comparison of energy scores for different compounds with PDGFR

Compd.	MolDock score	Compd.	MolDock score
I ₁	-83.855	II ₁	-90.709
I ₂	-86.450	II ₂	-89.871
I ₃	-105.036	II ₃	-93.345
I ₄	-96.764	II ₄	-99.538
I ₅	-90.403	II ₅	-114.987
Molecule	-100.450	OA	-79.759

4 PDGF 受体抑制实验

采用荧光偏振免疫法 (FPPIA), 对通过计算机辅助设计模拟结合力较好且体外生物活性较好的化合物 **I**₃ 和 **II**₅ 进行 PDGF 受体抑制活性测试, 通过 GraphPad Prism 5 计算得 **I**₃ 和 **II**₅ 在 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的 IC_{50} 分别为 3.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.57 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

5 小结

运用计算机辅助药物设计方法, 分析已知抗肿瘤靶点 PDGF 受体和抑制剂相互作用, 设计拟合成化合物, 经母体 (OA) 结构优化后得到 10 个新的 OA 衍生物, 目标化合物结构经 NMR 和 MS 确认, 将其与 PDGF 受体进行对接, 并通过 Molegro Virtual Docker

计算预测合成的所有化合物与 PDGF 受体的结合情况, 结果表明合成的化合物与 PDGF 受体均具有良好的结合能力。同时, 体外药理实验表明所合成的化合物对人胃癌细胞 (SGC-7901) 和人肺癌细胞 (A549) 均具有抑制活性。初步构效关系表明在齐墩果酸的 2 位引入苯胺亚甲基和脲亚甲基均可增强活性, C-28 位酰胺化也具有一定的增强活性的作用, 且苯环上的吸电子基团不利于抗肿瘤活性 (**II**₅ > **II**₄ > **II**₁ > **II**₃ > **II**₂), 将 C-28 位羧基成酯并改变酯链长度, 随着链长度的增加抗肿瘤活性随之增加, 但碳链过长不利于抗肿瘤活性 (**I**₃ > **I**₄ > **I**₅ > **I**₂ > **I**₁), 如图 7, 其中 **I**₃ 和 **II**₅ 对肿瘤细胞显示出较强的抑制作用, SGC-7901 细胞 ($\text{IC}_{50} = 4.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 4.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 A549 细胞 ($\text{IC}_{50} = 5.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{IC}_{50} = 4.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。PDGF 受体蛋白抑制实验表明化合物 **II**₅ 对 PDGF 受体表现出较强的抑制活性。本研究结果对进一步优化设计齐墩果酸衍生物作为 PDGF 受体抑制剂的研究具有参考价值。

实验部分

Büchi B-540 熔点测定仪; Bruker ARX-600 型核磁共振分析仪, CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标; 热电-菲尼根 LCQ 型质谱仪; SPECTRA MAX plus 型酶标仪;

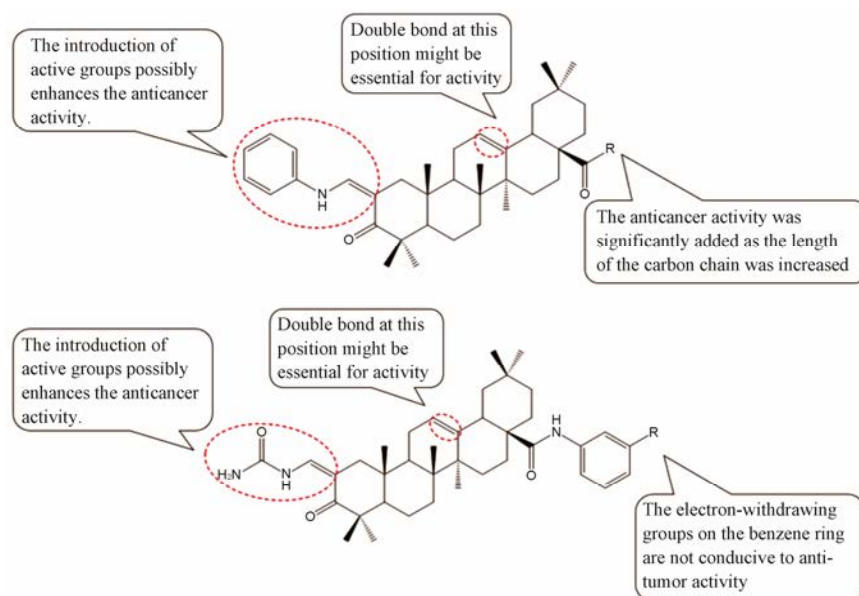


Figure 7 Summarized structure-activity relationships of novel compounds with regard to cancer inhibition

XDS-1B 倒置显微镜; TGL-16B 低速台式离心机。齐墩果酸 (质量分数 >98%) 购于陕西森弗生物技术有限公司; 柱色谱用 200~300 目硅胶、薄层色谱硅胶 GF254, 购于深圳市宇恒橡胶制品有限公司; 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液 (实验室自制); 活性测试所用的 RPMI-1640 培养基 (含 10% 胎牛血清, $100 \text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素)、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、胰蛋白酶 (Trypsin) 和标准胎牛血清 (FBS), 购于上海图赫实业有限公司; 活性测试所用 SGC-7901 和 A549 细胞均由沈阳药科大学药理教研室提供。阳性对照物阿霉素和吉非替尼, 购于阿斯利康制药有限公司。所有试剂均为分析纯或化学纯。

1 目标化合物合成

1.1 3-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸 (OA-1) 的制备 取 OA (0.500 g, 1.10 mmol) 充分溶解于 50 mL 丙酮中, 在冰浴条件下缓慢滴加新配制的 Jones' 试剂 0.64 mL (5.78 mmol), 10 min 后将温度升为室温反应 2.5 h, TLC 跟踪检测终点 [展开剂: 石油醚-丙酮 5 : 1 (V/V)], 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液, 反应结束后, 加入异丙醇 20 mL 淬灭, 室温搅拌 45 min。待反应完毕后, 加入适量饱和食盐水和乙酸乙酯, 萃取 3 次, 合并有机相。无水 MgSO_4 干燥过夜, 过滤, 减压蒸馏浓缩得粗品, 粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 10 : 1 (V/V)], 得 0.486 g 白色粉末状固体 OA-1, 产率 97.2%, mp 221.1~222.5 °C。

1.2 3-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-羧酸乙酯 (OA-2) 的制备 取中间体 OA-1 (0.500 g, 1.10 mmol) 充分

溶于 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺中, 加入无水碳酸钾 0.30 g, 冰浴下缓慢滴加溴乙烷 0.24 mL (5.02 mmol), TLC 检测反应终点 [展开剂: 石油醚-乙酸乙酯 5 : 1 (V/V)]。反应结束后, 加入饱和食盐水和乙酸乙酯, 萃取 3 次, 合并有机相。用无水 MgSO_4 干燥过夜, 过滤, 粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得 0.445 g 白色片状固体 OA-2, 产率 89.0%, mp 208.3~209.5 °C。

1.3 2-羟亚甲基-3-羰基-齐墩果烷-12-烯-28-羧酸乙酯 (OA-3) 的制备 取上一步中间体 OA-2 (0.400 g, 0.8 mmol), 溶于 10 mL 无水甲苯溶液中, 在冰浴条件下加入叔丁醇钾 0.30 g, 并缓慢滴加甲酸乙酯 1 mL, 20 min 后将温度升为室温反应 12 h, TLC 检测反应终点 [展开剂: 石油醚-乙酸乙酯 5 : 1 (V/V)]。反应结束后, 减压蒸发除去溶剂, 得淡黄色油状固体, 产物经稀盐酸洗涤后, 加入饱和食盐水和乙酸乙酯, 萃取 3 次, 合并有机相。用无水 MgSO_4 干燥过夜, 过滤, 粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得 0.305 g 淡黄色片状固体 OA-3, 产率 76.25%, mp 195.5~197.6 °C。

1.4 3-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰-苯胺 (OA-4) 的制备 取中间体 OA-1 (0.500 g, 1.10 mmol), 加入干燥的二氯甲烷 (DCM) 25 mL, 室温下搅拌, 待中间体完全溶解后, 加入草酰氯 (1.20 mmol), 加热回流, 4 h 后反应完毕, 生成 3-羰基-12-烯-齐墩果烷-28-酰氯, 旋蒸除去反应溶剂和未反应的草酰氯, 残余物加入环己烷 10 mL, 随后减压蒸除环己烷, 反复操作

3 次。酰氯中加入 DCM 15 mL, 并加三乙胺调 pH 为 9~10, 搅拌 5 min 后, 加入苯胺 (2.2 mmol), 室温下反应 6 h, 以 TLC 检测反应终点。反应结束后, 向反应液中加入 15 mL 食盐水, 以 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀盐酸调至 pH 3~4, 静置分层, 分离有机相, 向水中再加入 20 mL DCM, 萃取 3 次, 合并有机相, 加入无水 MgSO_4 干燥。减压蒸馏, 得白色固体。粗品经硅胶柱色谱分离纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得目标产物 0.346 g 淡黄色晶体 OA-4, 产率 69.2%, mp 124.4~126.7 °C。

1.5 2-羟亚甲基-3-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰-苯胺 (OA-5) 的制备 按照 OA-3 的制备方法, 由 OA-4 (0.8 mmol) 与甲酸乙酯 12 mmol 反应。最后粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得 0.294 g 淡黄色片状固体 OA-3, 产率 73.50%, mp 113.5~114.6 °C。

1.6 2-苯胺亚甲基-3-羰基-齐墩果烷-12-烯-28-羧酸乙酯 (I₁) 的制备 取上一步中间体 OA-3 (0.400 g, 0.78 mmol), 溶解于 15 mL 无水乙醇中, 并加入苯胺 (0.87 g, 9.34 mmol) 0.80 mL 溶液, 加热至回流, TLC 检测反应终点 [展开剂: 石油醚-乙酸乙酯 5 : 1 (V/V)], 4 h 反应结束。减压蒸出溶剂, 加入饱和食盐水和乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相。用无水 MgSO_4 干燥过夜, 过滤, 粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得 0.284 g 淡黄色粉末状固体 I₁, 产率 71.0%, mp 200.9~203.3 °C。

按照 I₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与溴丙烷 (4.95 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得到 0.279 g 白色粉末状固体 I₂, 产率 69.8%, mp 212.3~213.9 °C。

按照 I₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与溴丁烷 (4.95 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得到 0.261 g 白色粉末状固体 I₃, 产率 65.3%, mp 221.4~224.0 °C。

按照 I₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与溴戊烷 (4.95 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得到 0.277 g 白色粉末状固体 I₄, 产率 69.3%, mp 231.0~232.8 °C。

按照 I₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与溴己烷 (4.95 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱

纯化 [洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20 : 1 (V/V)], 得到 0.250 g 白色粉末状固体 I₅, 产率 62.5%, mp 239.2~240.8 °C。

1.7 2-脲亚甲基-3-羰基-齐墩果烷型-12-烯-28-酰-苯胺 (II₁) 的制备 取中间体 OA-5 (0.400 g, 0.67 mmol), 溶解于 15 mL 无水乙醇中, 并加入尿素 (0.30 g, 5.03 mmol) 溶液, 加热至回流, TLC 检测反应终点 [展开剂: 石油醚-丙酮 2 : 1 (V/V)], 4 h 反应结束。减压蒸出溶剂, 加入饱和食盐水和二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相。用无水 MgSO_4 干燥过夜, 过滤, 粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 50 : 1 (V/V)], 得 0.261 g 淡黄色粉末状固体 II₁, 产率 65.3%, mp 113.5~114.6 °C。

按照 II₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与间氟苯胺 (2.20 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 50 : 1 (V/V)], 得到 0.250 g 淡黄色粉末状固体 II₂, 产率 50.0%, mp 101.5~102.2 °C。

按照 II₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与间氯苯胺 (2.20 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 50 : 1 (V/V)], 得到 0.248 g 淡黄色粉末状固体 II₃, 产率 49.6%, mp 93.8~94.7 °C。

按照 II₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与间甲基苯胺 (2.20 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 50 : 1 (V/V)], 得到 0.251 g 淡黄色粉末状固体 II₄, 产率 50.2%, mp 104.1~105.7 °C。

按照 II₁ 的制备方法, 由中间体 OA-1 (1.10 mmol) 与间甲氧基苯胺 (2.20 mmol) 反应。最终粗品经硅胶柱色谱纯化 [洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 50 : 1 (V/V)], 得到 0.247 g 淡黄色粉末状固体 II₅, 产率 49.4%, mp 115.3~1116.7 °C。

2 初步体外活性测试

选择人肺癌 A549 细胞和人胃癌 SGC7901 细胞为靶细胞, 用吉非替尼和多柔比星为阳性对照, 采用 MTT 比色法对合成的齐墩果酸衍生物进行体外抗肿瘤活性测试。取 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养的细胞, 用含 10% 小牛血 RPML1640 培养液调整细胞数为每毫升 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 的单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板内。将培养板放入 CO₂ 培养箱, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 待培养细胞贴壁后, 给药组加入含有不同浓度 (将起始浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 药品依次稀释成 500、50、5、0.5、0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的测试物,

至少 3 个平行孔, 实验的空白对照组继续放入 CO₂ 培养箱, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 72 h。培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 50 μL, 37 °C 继续培养 4 h, 离心弃去上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解甲臜颗粒, 振荡溶解。在酶联免疫检测仪波长为 490 nm 条件下测定光密度值 (OD), 计算所测化合物对细胞的抑制率和 IC₅₀ 值。

$$\text{抑制率}\% = \frac{\text{对照组平均OD值} - \text{给药组平均OD值}}{\text{对照组平均OD值} - \text{空白组平均OD值}} \times 100\%$$

3 PDGF 受体抑制实验

采用荧光偏振免疫分析法对合成的齐墩果酸衍生物 **I₃** 和 **II₅** 进行 PDGF 受体抑制活性测试。在 384 孔板依次加入 PDGFR-β 蛋白 30 μL 和被稀释成不同浓度的化合物 (将起始浓度为 10 μg·mL⁻¹ 药品依次稀释成 5、2.5、2、1、0.5 μg·mL⁻¹), 以不加 PDGFR-β 蛋白为阳性对照, 在 25 °C、140 r·min⁻¹ 振荡条件下培养 1 h。1 h 后向每孔加入 FILC 溶液 30 μL, 继续避光振荡培养 15 min, 用酶标仪检测不同浓度的两个样品的偏振值, 计算所测化合物对靶蛋白的抑制率和 IC₅₀ 值。

References

- [1] Mo WB, Su CH, Huang JY, et al. Synthesis of acyl oleanolic acid-uracil conjugates and their anti-tumor activity [J]. *Chem Central J*, 2016, 10: 69.
- [2] Cheng KG, Su CH, Huang JY, et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of several oleanolic acid-uracil/thymine conjugates [J]. *Medchemcomm*, 2016, 7: 972–981.
- [3] Tian T, Liu XY, Lee ES, et al. Synthesis of novel oleanolic acid and ursolic acid in C-28 position derivatives as potential anticancer agents [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40: 458–468.
- [4] Silva FS, Oliveira PJ, Duarte MF. Oleanolic, ursolic and betulinic acids as food supplements or pharmaceutical agents for type 2 diabetes-promise or illusion [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 2991–3008.
- [5] Nkeh-Chungag BN, Oyedeji OO, Oyedeji AO, et al. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing properties of two semisynthetic derivatives of oleanolic acid [J]. *Inflammation*, 2015, 38: 61–69.
- [6] Tsao SM, Yin MC. Antioxidative and anti-inflammatory activities of asiatic acid, glycyrrhizic acid, and oleanolic acid in human bronchial epithelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63: 3196–3204.
- [7] Meng YQ, Zhang LF, Liu DY, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of novel ursolic acid derivatives [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2016, 18: 280–288.
- [8] Meng YQ, Zhao YW, Kuai ZY, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of novel oleanolic acid derivatives [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19: 1000–1010.
- [9] Meng YQ, Cui HB, Zhang WC, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of asiatic acid derivatives as survivin inhibitor [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20: 1–12.
- [10] Meng YQ, Xing W, Kuai ZY, et al. Synthesis and anti-tumor activities of ring A derived analogues of oleanolic acid [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2017, 37: 1417–1425.
- [11] Niu G, Sun L, Pei Y, et al. Oleanolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis by blocking the VEGFR2 signaling pathway [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18: 583–590.
- [12] Maneesai P, Bunbupha S, Kukongviriyapan U, et al. Effect of asiatic acid on the Ang II-AT1R-NADPH oxidase-NF-κB pathway in renovascular hypertensive rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2017, 390: 1073–1083.
- [13] Singh J, Sharma K, Pillai P, et al. PDGFR inhibition mediated intracellular signalling in C6 glioma growth and migration: role of ERK and ROCK pathway [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70: 465–477.
- [14] Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, et al. Impact of p53 and PDGFR-β expression on metastasis and prognosis of patients with pancreatic cancer [J]. *World J Surg*, 2016, 40: 1977–1984.
- [15] Jeibmann A, Halama K, Witte HT, et al. Involvement of CD9 and PDGFR in migration is evolutionarily conserved from *Drosophila* glia to human glioma [J]. *J Neurooncol*, 2015, 124: 373–383.
- [16] Moawad EY. Predicting effectiveness of imatinib mesylate in tumors expressing platelet-derived growth factors (PDGF-AA, PDGF-BB), stem cell factor ligands and their respective receptors (PDGFR-α, PDGFR-β, and c-kit) [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2015, 46: 272–283.
- [17] Chu JS, Ge FJ, Zhang B, et al. Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 1–8.
- [18] Wang ZH, Hu PC, Fang T, et al. HDAC6-mediated EGFR stabilization and activation restrict cell response to sorafenib in non-small cell lung cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2016, 33: 1–9.
- [19] Rossi A, Latiano TP, Parente P, et al. The potential role of nintedanib in treating colorectal cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18: 1153–1162.
- [20] Steinemann G, Jacobsen C, Gerwing M, et al. Activity of nintedanib in germ cell tumors [J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2016, 27: 89–98.