

以天然产物吴茱萸碱为先导结构的抗肿瘤药物设计策略研究进展

夏哲炜[#], 孙驭航[#], 黄天乐, 孙 华, 陈玉平, 盛春泉^{*}, 武善超^{*}

(中国人民解放军第二军医大学(海军军医大学)药学院, 教育部医药基础研究创新中心, 上海 200433)

摘要: 天然产物是发现抗肿瘤药物的重要来源, 吴茱萸碱作为传统中药吴茱萸的有效成分, 具有微弱的抗肿瘤活性, 近年来, 以其为先导结构开展的药物研究发现了多个高活性抗肿瘤候选药物, 取得了较为显著的研究进展。本文综述了以吴茱萸碱为先导结构开展的抗肿瘤药物设计策略的研究进展, 以期为以天然产物为先导结构的新药开发提供借鉴和参考。

关键词: 天然产物; 吴茱萸碱; 药物设计; 结构优化; 抗肿瘤

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0532-11

Research progress of natural product evodiamine-based antitumor drug design strategies

XIA Zhe-wei[#], SUN Yu-hang[#], HUANG Tian-le, SUN Hua, CHEN Yu-ping,
SHENG Chun-quan^{*}, WU Shan-chao^{*}

(The Center for Basic Research and Innovation of Medicine and Pharmacy (MOE), School of Pharmacy, Second Military Medical University (Naval Medical University), Shanghai 200433, China)

Abstract: Natural products are important sources for the discovery of anti-tumor drugs. Evodiamine is the main alkaloid component of the traditional Chinese herb Wu-Chu-Yu, and it has weak antitumor activity. In recent years, a number of highly active antitumor candidates have been discovered with a significant progress. This article reviews the research progress of evodiamine-based antitumor drug design strategies, in order to provide reference for the development of new drugs with natural products as leads.

Key words: natural product; evodiamine; drug design; structural optimization; antitumor

天然产物是发现抗肿瘤药物的重要来源, 大约有三分之二的抗肿瘤药物来源于天然产物^[1-3]。然而, 未经修饰的天然产物往往存在活性不足、结构复杂、不良反应大等明显缺陷, 很难直接成药^[4], 因而需要开展药物设计以提升其成药性、改善理化性质, 最终发现抗肿瘤候选新药。

吴茱萸碱 (evodiamine, 图1) 是传统中药芸香科植

物吴茱萸的主要活性成分, 是一个含有吲哚结构的五环生物碱天然产物, 具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤^[5-11]、抗炎^[12]、抗阿尔茨海默症^[13]等。特别是在抗肿瘤方面, 吴茱萸碱能够有效抑制肺癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌、骨肉瘤、甲状腺癌等肿瘤细胞的生长^[5-11]。然而, 未经修饰的吴茱萸碱存在抗肿瘤活性弱、水溶性差、药代动力学性能不佳等缺陷, 不仅影响了其体内外抗肿瘤活性, 也进一步限制了其临床开发和应用。为了克服这些缺点, 近年来, 以吴茱萸碱为先导结构开展了大量的药物设计工作, 大幅提升了吴茱萸碱的抗肿瘤药效。鉴于此, 本文将从药物设计策略视角综述近年来以吴茱萸碱为先导结构的抗肿瘤药物研发的典型

收稿日期: 2023-06-20; 修回日期: 2023-08-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22377145, 22077138, 22107115, 81725020); 上海市青年科技启明星项目 (22QA1411300).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-21-81871242, E-mail: wushanchao07_2@126.com;

Tel: 86-21-81871201, E-mail: shengcq@smmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0764

案例, 以期为以天然产物为先导结构的药物开发提供借鉴和参考。

目前, 以天然产物吴茱萸碱为先导结构的抗肿瘤药物设计策略主要有四种: 骨架修饰、分子杂交、骨架跃迁、改善理化性质的结构优化或材料包载。

1 骨架修饰

1.1 吴茱萸碱骨架 A 环结构修饰典型案例

近年来, 人们在吴茱萸碱的 A 环上引入了各种取代基 (如卤素、烷基、烷氧基、硝基、氨基、羟基等^[14,15]) (图 2), 以研究不同取代基对吴茱萸碱的理化性质和抗肿瘤活性的影响。此外, 在 A 环上引入了长链烷基、酰基和芳香侧链^[16], 以消除对 A 环所在活性腔的空间位阻效应。目前报道修饰最多的主要是通过引入不同取代基对 A 环 C-10 位进行修饰。其中, 活性最好的是 Sheng 课题组^[14]报道的 10-羟基吴茱萸碱 (**1a**, 图 2)。该化合物能显著提升吴茱萸碱的体外抗肿瘤活性, 对大多数肿瘤细胞的半数生长抑制率 (half maximal inhibitory, IC_{50}) 低于 $0.003 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。作用机制研究发现, 化合物 **1a** 是 DNA 拓扑异构酶 (topoisomerase, Top) I 和 Top II 双重抑制剂; 分子对接显示, A 环 C-10 位引入的羟基的氧原子能与 Top I 的 Arg 364 形成氢键相互作用, 并且 D-环羰基氧原子与 Asn 352 也能形成额外的氢键, 此外, A 环 C-10 位羟基也能与 Top II 的 Ile 88 酰胺形成氢键。

1.2 吴茱萸碱骨架 B 环结构修饰典型案例

吴茱萸碱骨架 B 环的结构修饰主要集中在吡啶氮原子上, 通过引入烷基、苯甲酰基、苄基、酯、长链烷氧基、甲磺酰基等基团, 开展 B 环取代构效关系研究^[17-20]。分子对接显示, 在吴茱萸碱与 Top I-DNA 复合物的对接构象中, 吴茱萸碱的 A、B 和 C 环具有嵌入 DNA 碱基对的独

特的 L 型空间构象, 因而 B 环上的 N-13 与 Top I 的 Arg 364 通过氢键和 π - π 相互作用。发现只有部分吴茱萸碱插入到 DNA 碱基对中, B 环的 N-13 位置指向 DNA 的大凹槽, 表明结构优化仍有空间。因此, 合理优化 N-13 可显著提高吴茱萸碱的抗肿瘤效果。尤其是当苯甲酰基作为取代基时, 抗肿瘤活性显著提升, 其中, 4-氯-苯甲酰衍生物 **2a** (图 3) 对人乳腺癌细胞 MDA-BA-435 细胞的体外抗肿瘤活性最佳, IC_{50} 值为 $0.049 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对肺癌 A549 细胞和人结肠癌 HCT116 细胞也具有良好的体外抑制活性, IC_{50} 值分别为 0.86 和 $2.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在衍生物 **2a** 的 A 环 C-10 位引入羟基取代基 (**2b**, 图 3) 可显著增强 **2a** 对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞 ($IC_{50} < 0.002 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和人结肠癌 HCT116 细胞 ($IC_{50} = 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的抗肿瘤活性, 但对人肺癌 A549 细胞的抗肿瘤活性 ($IC_{50} = 26.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下降较为明显。以上研究表明, B 环吡啶 N 原子为活性必需基团, 引入保持氢键相互作用基团时有助于吴茱萸碱抗肿瘤活性提升。

1.3 吴茱萸碱骨架 C 环结构修饰典型案例

目前对吴茱萸碱的 C 环的改造主要集中在 C-7 位。研究人员受喜树碱结构启发, 通过将含羰基的基团引入 C 环中合成了一系列吴茱萸碱衍生物^[21], C7 取代的羧基能与 Top I 的 Lys 751 和 Asn 722 形成氢键, 但抗癌活性明显降低。而 C-7 位引入 -COOH 可以显著增加对沉默调节蛋白 3 (silent mating type information regulation 2 homolog 3, SIRT3) 的抑制活性, 在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下抑制率达到 61%, 而 -COOCH₃ 取代基 (图 4, **3a**, **3b**) 可以显著增加 SIRT2 的抑制活性, 在 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下的抑制率分别达到 78% 和 80%, 并且研究发现 S-构

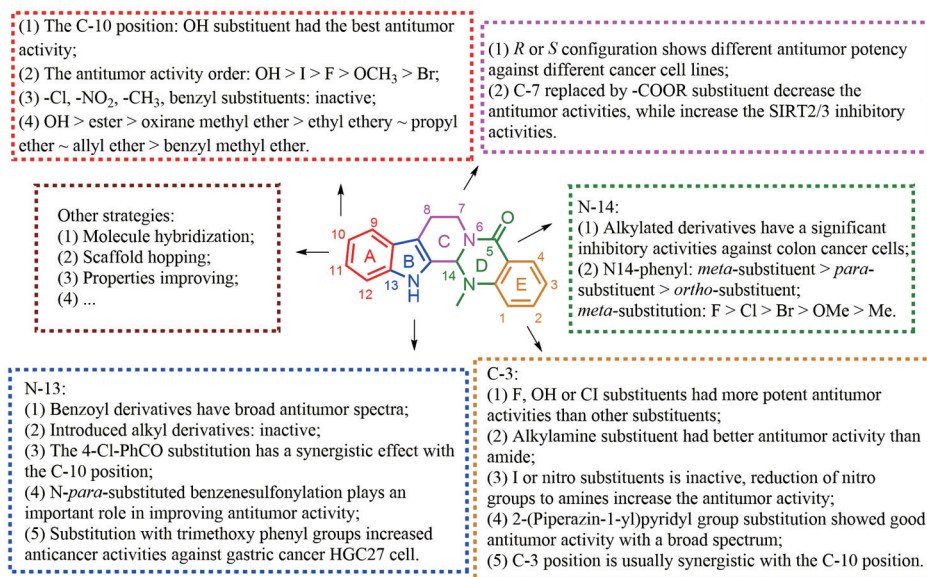


Figure 1 Chemical structure of evodiamine and its antitumor drug design strategies

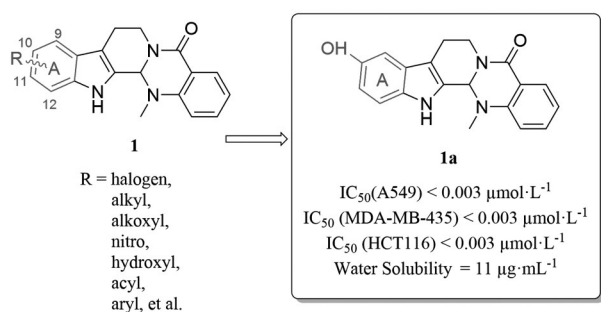


Figure 2 Structural optimization strategies of evodiamine A-ring and its representative derivatives

型**3b**比R-构型**3a**表现出更好的针对SIRT2的抑制活性。这些研究结果表明, 吴茱萸碱可以作为SIRT抑制剂先导化合物。

1.4 吴茱萸碱骨架D环结构修饰典型案例 近年来, 对D环的骨架修饰主要集中在N-14位上, 对N-14位进行去甲基化修饰能显著提高抗肿瘤活性^[22-29]。Lei等^[22]也对吴茱萸碱进行了构效关系研究, 在D环上进行取代基修饰, 最终发现了两个化合物有较强的抑制肝癌的作用。体外抗增殖活性表明, 化合物**4a**和**4b**(图5)对肝癌HUH7细胞(IC_{50} 值分别为0.05和0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和SK-Hep-1细胞(IC_{50} 值分别为0.07和0.06 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均有明显的抑制作用。化合物**4a**和**4b**还可以双重抑制Top I和Top II, 抑制细胞的侵袭和迁移, 将细胞周期阻断在G2/M期, 并诱导细胞凋亡。分子对接显示, **4a**的吡啶NH与Top I的Asn 352形成氢键, **4b**的侧链羰基与Top I的Lys 452形成氢键, **4a**和**4b**的A环与Lys 425形成 π -阳离子相互作用。然而, 吴茱萸碱与Top I-DNA复合物之间没有形成氢键, 这可能是其活性低的原因之一。**4a**的吡啶NH与Top II-DNA的

Asn 95形成氢键。对于化合物**4b**, 在侧链羰基与Top II-DNA的Arg 98之间和D环的羰基与Asn 120之间形成了三个氢键。与Top I-DNA复合物一样, 吴茱萸碱和Top II-DNA复合物之间没有形成氢键。此外, 化合物**4a**和**4b**还可以抑制大鼠肝星细胞HSC-T6的激活, 减少I型胶原的分泌, 从而延缓肝纤维化的进展。最重要的是, 在相同给药剂量和给药途径下化合物**4b**在裸鼠体内对肿瘤生长抑制作用比阳性药物索拉非尼更强, 化合物**4b**和索拉非尼的肿瘤生长抑制率(tumor growth inhibition rate, TGI)分别为60.36%和46.27%。上述结果表明, 化合物**4b**是一个潜在治疗肝癌的候选化合物。

1.5 吴茱萸碱骨架E环结构修饰典型案例 在吴茱萸碱E环上进行结构修饰, C-3位的取代基对抗肿瘤活性的影响最大^[14,30-32]。Sheng课题组^[14]将C-3位用-F、-Cl、-OH、-NH₂取代均提高了化合物的抗肿瘤活性, 其中C-3位被氟原子取代(**5a**, 图6)的抗肿瘤活性最好, 对人乳腺癌细胞MDA-BA-435细胞、肺癌A549细胞、人结肠癌HCT116细胞的 IC_{50} 值都小于0.003 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在E环上的取代基与A环上C-10的羟基具有协同效应, 在HCT116异种移植模型每日腹腔注射2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 四个化合物**5a**、**5b**、**5c**、**5d**都有良好的体内活性, 其中**5d**的体内活性最高。

2 分子杂交

2.1 ROS触发单元-吴茱萸碱偶联策略 活性氧(ROS)是正常氧代谢的天然副产物, 例如, 在细胞信号传导和稳态中起关键作用的过氧化氢(H_2O_2)等。肿瘤细胞微环境中呈现ROS浓度高的特点, 硼酸盐是ROS的应激性官能团, 因而利用硼酸盐作为触发单元能提高抗肿瘤药物的靶向性。Li等^[33]针对吴茱萸碱衍生物

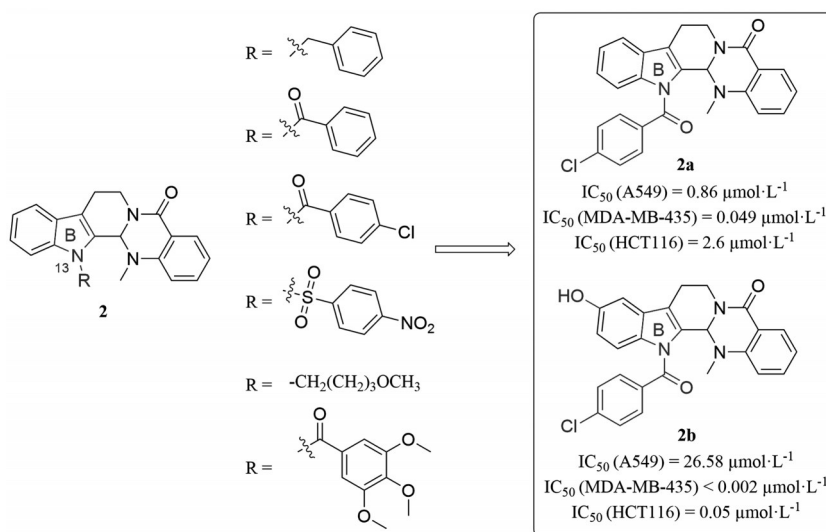


Figure 3 Structural optimization strategies of evodiamine B-ring and its representative derivatives

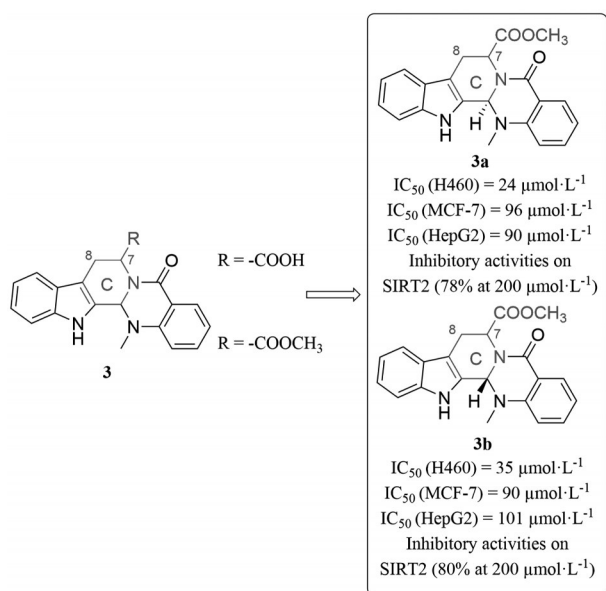


Figure 4 Structural optimization strategies of evodiamine C-ring and its representative derivatives

5a 体内抗肿瘤活性不佳的问题, 通过各种可断裂的连接子在吴茱萸碱衍生物的 C-10 位引入硼酸盐作为触发单元, 合成了一系列化合物, 并筛选其抗肿瘤活性。其中, 化合物 **6a** (图 7) 在体外抗肿瘤活性测试中, 对结肠癌细胞 HCT116、乳腺癌细胞 MCF-7 和肺癌细胞 A549 的 IC₅₀ 值分别为 0.016、0.033 和 0.037 μmol·L⁻¹, 在裸鼠结肠癌 HCT116 异种移植模型中, 腹腔注射剂量

为 10 mg·kg⁻¹, 每天 2 次, 表现出良好的体内抗肿瘤活性 (TGI = 64.4%)。作用机制研究发现, 化合物 **6a** 可以剂量依赖性诱导肿瘤细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G2 期。化合物 **6a** 作为活性氧触发的吴茱萸碱硼酸盐衍生物, 与母体吴茱萸碱相比, 其体内抗肿瘤活性大幅提升, 毒性有所降低, 表明采用硼酸盐作为触发单元能够提高吴茱萸碱体内抗肿瘤活性。

2.2 H₂S 供体-吴茱萸碱偶联策略 H₂S 具有抗肿瘤活性, 但由于 H₂S 的剂量不可控、毒性大, 临床上并不能直接使用 H₂S, 因而, 研究人员经常使用 H₂S 释放剂 (H₂S 供体) 来调节 H₂S 的水平, 用以抗肿瘤。Hu 等^[34] 将吴茱萸碱与 H₂S 供体偶联以发现高选择性抗肿瘤药物, 分别以 5-对羟基苯基-3H-1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮 (ADT-OH) 和 α-硫辛酸两种外源性 H₂S 供体为原料合成了 16 种衍生物。体外抗肿瘤活性测试发现, 化合物 **7a** (图 8) 对人白血病 HL-60 和上皮性大肠腺癌 Caco-2 细胞的抑制作用最强, IC₅₀ 值分别为 0.58 和 2.02 μmol·L⁻¹, 进一步的作用机制研究证实 **7a** 可诱导 HL-60 细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G2/M 期。**7a** 还可以上调 Bax、细胞色素 C、caspase-3、caspase-9 和 p53 蛋白表达, 下调 Bcl-2 的相对水平, 诱导线粒体内源性凋亡, 导致线粒体功能紊乱。

2.3 氮芥-吴茱萸碱偶联策略 氮芥是 DNA 烷基化剂, 因具有广谱抗肿瘤活性和强抗增殖能力而被广泛应用于肿瘤化疗中。然而, 缺乏选择性导致严重的

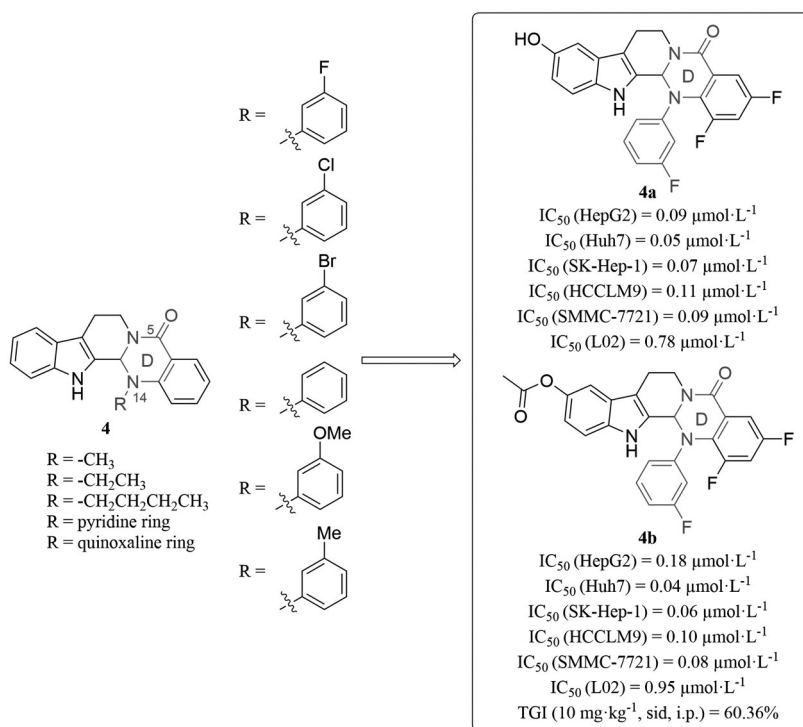


Figure 5 Structural optimization strategies of evodiamine D-ring and its representative derivatives

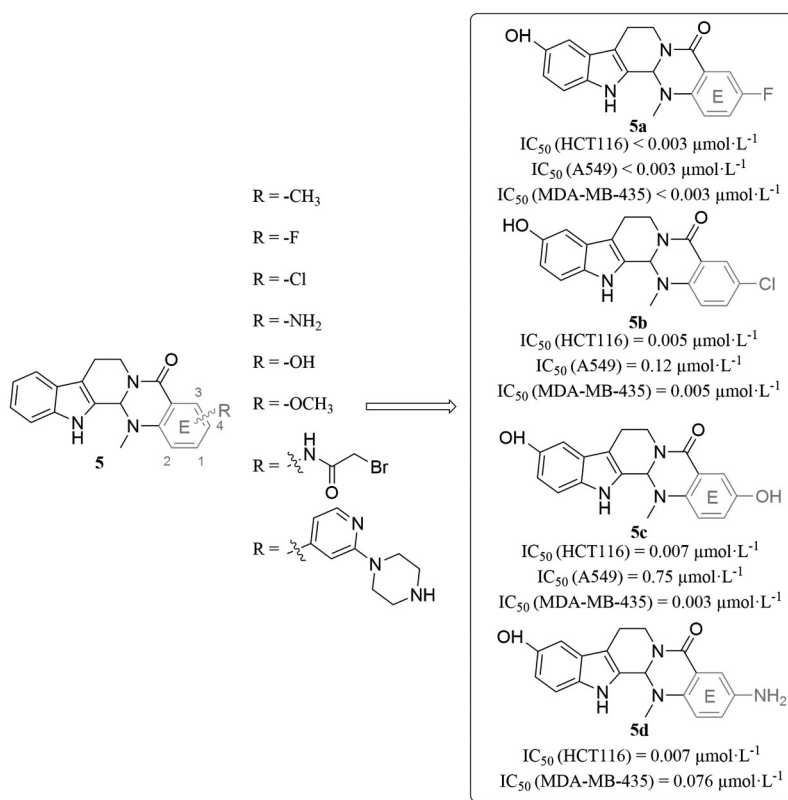


Figure 6 Structural optimization strategies of evodiamine E-ring and its representative derivatives

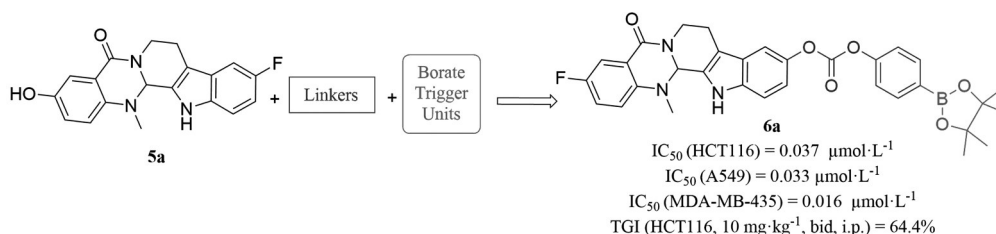


Figure 7 ROS-triggering unit-evodiamine coupling strategy and its representative compound 6a

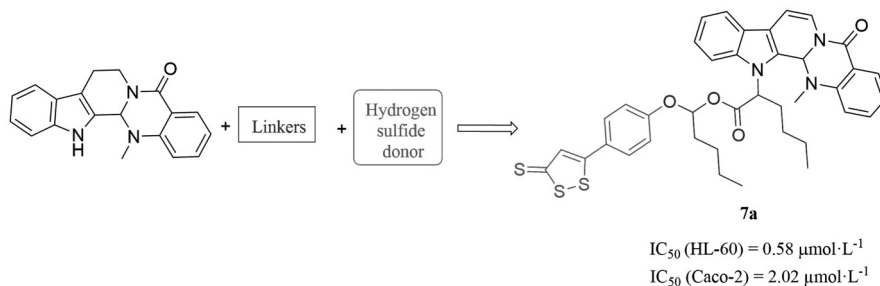


Figure 8 H₂S donor-evodiamine coupling strategy and its representative compound 7a

良反应, 以及获得的耐药性限制了氮芥在临床上的使用。烷基化剂与理想的天然产物骨架结构相结合是提高氮芥类药物活性和减少不良反应的一种较好策略。Hu 等^[35]将氮芥与吴茱萸碱偶联, 合成了一系列吴茱萸碱衍生物。利用 4 种不同类型的人肿瘤细胞株 (前列腺癌细胞 PC-3、肝癌细胞 HepG2、人单核细胞白血病

细胞 THP-1 和人早幼粒白血病细胞 HL-60) 及正常人外周血单个核细胞 PBMC 对衍生物进行了抗增殖活性测试, 发现所有目标化合物对人肿瘤细胞株均有一定的抗增殖活性, 对正常人 PBMC 细胞无抑制作用。其中, 目标化合物 8a (图 9) 对两种肿瘤细胞株 (THP-1 和 HL-60) 表现出最强的细胞毒性, 其 IC₅₀ 值分别为 4.05

和 $0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步研究其作用机制, 结果表明, **8a** 可通过线粒体相关途径诱导 HL-60 细胞凋亡, 并在纳摩尔浓度下阻滞细胞周期于 G2 期。

2.4 HDAC 抑制剂-吴茱萸碱偶联策略 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 在肿瘤细胞诱导分化、抑制生长、促进凋亡、增强化疗敏感性和抑制血管生成等生物学过程中具有重要作用。HDAC 抑制剂与各种抗肿瘤药物 (如 DNA 损伤剂和抗微管蛋白药物)

联合使用时, 会导致 HDAC 致敏肿瘤细胞, 协同细胞凋亡, 提高治疗效果。拓扑异构酶 (Top I 和 Top II) 是多靶向药物设计的一个很好的起点, 因为异构体 HDAC 和 Top II 共同定位在功能复合物中。基于 DNA 拓扑异构酶和 HDAC 抑制剂之间的协同效应, 在上述研究的基础上, 本课题组扩大了吴茱萸碱生物库, 并发现部分吴茱萸碱的衍生物表现出对 Top I 和 Top II 的双重抑制作用, 如衍生物 **9a** (图 10)。基于此, 作者采取药效团

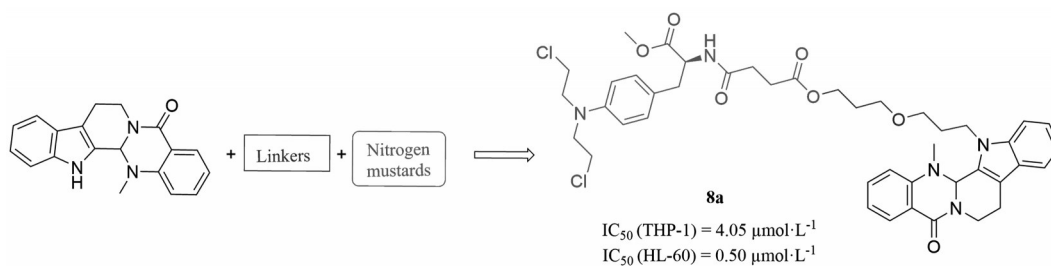


Figure 9 Nitrogen mustard-evodiamine coupling strategy and its representative compound **8a**

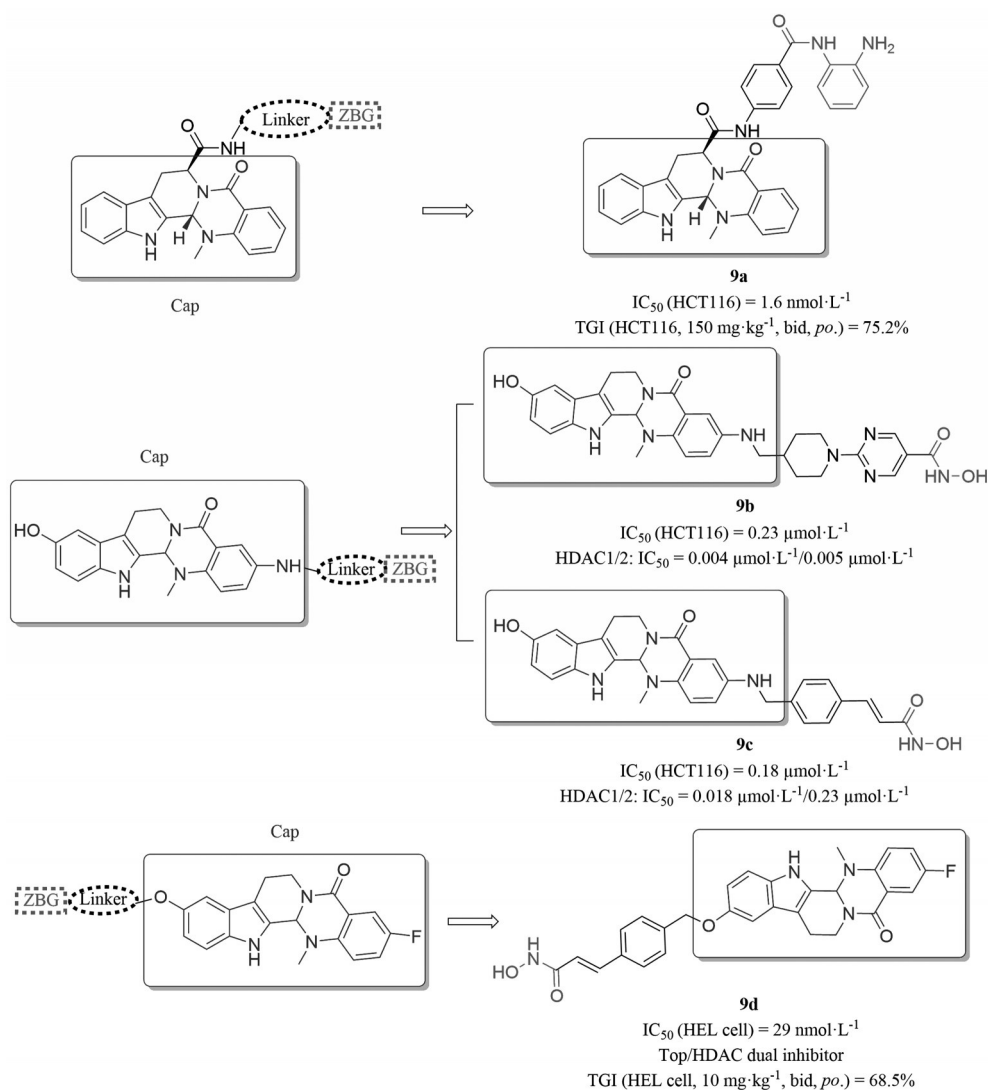


Figure 10 Histone deacetylase (HDAC) inhibitor-evodiamine coupling strategies and their representative compounds

融合策略设计合成了一系列化合物。大多数HDAC抑制剂通常由三部分构成:位于疏水隧道外并与HDAC表面残基相互作用的疏水帽区(Cap)、占据活性部位疏水隧道的连接基团(linker)以及在HDAC活性部位底部与催化性锌离子螯合的锌结合基团(ZBG)。因此在后续研究中将前期发现的活性优秀的吴茱萸碱衍生物作为Cap基团,羟胺结构作为ZBG,通过疏水linker将两者连接构建了一系列具有Top/HDAC双重抑制作用的新型衍生物,并成功筛选出了高选择性的组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)和拓扑异构酶II(Top II)双抑制剂化合物**9a**、**9b**、**9c**及**9d**^[36-38](图10)。

化合物**9a**在体内外均显示出优秀的抗肿瘤活性,体外抗结肠癌细胞HCT116增殖活性的IC₅₀值为1.6 nmol·L⁻¹,体内结肠癌HCT116移植瘤模型中,口服150 mg·kg⁻¹**9a**,每天2次,肿瘤生长抑制率为75.2%,且无明显毒性,抗肿瘤效果优于HDAC抑制剂伏立诺他、Top抑制剂吴茱萸碱单独给药及其联合用药。作用机制研究发现,该类衍生物能够同时抑制Top和HDAC,阻滞细胞周期于G2期并能有效诱导细胞凋亡。深入的构效关系研究发现,化合物**9d**具有优秀的广谱抗肿瘤活性,有效阻滞白血病细胞HEL细胞周期于S期,并浓度依赖性地诱导细胞凋亡。在HEL异种移植模型中具有比**9a**更好的口服活性,显示出良好的体内抗肿瘤效果(TGI = 68.5%, 10 mg·kg⁻¹),以上工作表明吴茱萸碱类Top/HDAC双靶点抑制剂可以作为新型抗肿瘤候选药物用于白血病、结肠癌的治疗。

3 骨架跃迁策略

骨架跃迁是天然产物结构优化中常用的手段,Wang等^[39]采用骨架跃迁策略将吴茱萸碱骨架中的C环进行翻转,设计得到了吡啶并哌嗪并喹啉酮抗肿瘤新分子骨架,进一步通过构效关系研究发现了抗肿瘤活性优秀的**10a**(图11),该化合物具有较好的体外抗肿瘤活性,尤其是对结肠癌细胞HCT116的抗肿瘤活性达到了2 nmol·L⁻¹,抗肿瘤作用机制研究发现,化合物**10a**具有Top I和微管蛋白(tubulin)的双重抑制作用,能诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于G2期。由于**10a**在体内生理条件下的水溶性较差(pH值为7.4时为1.5 μg·mL⁻¹),化合物**10a**被改造成季铵盐**10b**(图11),

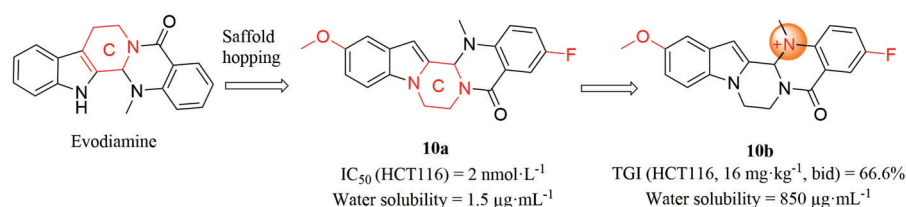


Figure 11 Scaffold hopping strategy to obtain novel indolopyrazinoquinazolinone scaffold and its representative compounds **10a** and **10b**

其水溶性大幅提升(pH值为7.4时为850.4 μg·mL⁻¹),将化合物**10b**以16 mg·kg⁻¹的剂量连续腹腔注射给药21天后,表现出显著的抗肿瘤活性,肿瘤生长抑制率(TGI)为66.6%,与临床抗肿瘤药物拓扑替康(TGI = 68.5%)相当,同时,受试裸鼠没有明显体重下降,证明化合物**10b**安全有效。以上研究表明,吡啶并哌嗪并喹啉酮衍生物**10b**作为抗肿瘤候选药物极具开发前景。

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是一种具有侵袭性的乳腺癌亚型,其治疗方式有限。Xu等^[40]也采用骨架跃迁的方式设计了一系列新型的吴茱萸碱稠杂环衍生物(图12),最有效的化合物**11a**(图12)的机制研究表明,Top I是**11a**的靶点,直接不可逆地诱导Top I与DNA共价复合体的形成或通过活性氧介导的间接机制引发氧化损伤。更重要的是,体内研究表明,**11a**在TNBC患者来源的肿瘤异种移植模型中显示出优秀的抗肿瘤活性,在20 mg·kg⁻¹剂量下抑制肿瘤生长,小鼠体重无明显变化。这些结果提示**11a**可能是治疗难治性TNBC的一个有希望的候选药物,值得进一步研究。

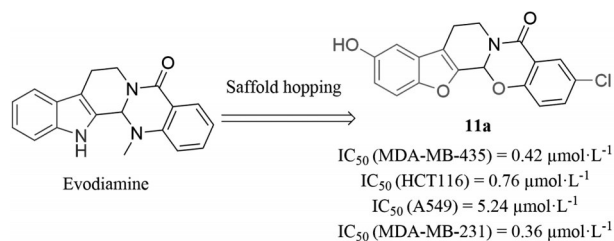


Figure 12 Scaffold hopping strategy to obtain novel polycyclic heterocycles scaffold and its representative compound **11a**

除此之外,Nie等^[41]采用吴茱萸碱与噻吩并[2,3-*d*]嘧啶酮杂合的方式进行骨架跃迁,合成了数十种吴茱萸碱与噻吩并[2,3-*d*]嘧啶酮杂合的衍生物(图13)。体外肿瘤细胞抗增殖实验发现,化合物**12a**对人非小细胞肺癌细胞A549、PC-9、人前列腺癌细胞PC-3和人乳腺癌细胞系MCF-7具有较强的细胞毒性,且对A549细胞具有较强的集落形成抑制作用,表明噻吩并[2,3-*d*]嘧啶酮和吴茱萸碱的杂交衍生物在抗肿瘤治疗方面具有一定潜在价值。

Yang等^[42]发现具有类似吴茱萸碱五环结构的化

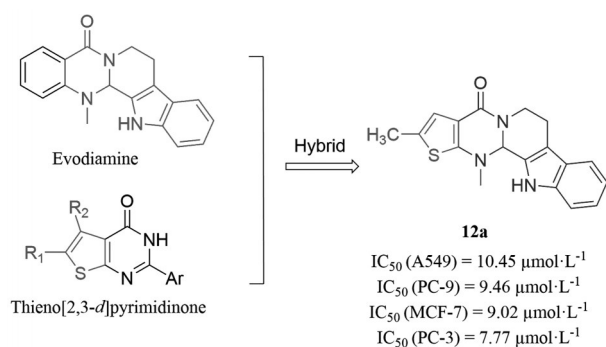


Figure 13 Thieno-[2,3-*d*] pyrimidinone is hybridized with evodiamine to obtain novel molecular scaffold and its representative compound **12a**

合物 calothrixin A (CAA) 也同样具有 Top I 和 Top II 的双重抑制作用, 但 CAA 的水溶性较差 ($< 5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 故以提高水溶性设计了化合物 **13a** (图 14), 其水溶性得到显著的提升 ($> 5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 与此同时其抗肿瘤活性也得到了数十倍的提升, 细胞实验表明, 在 Top I 和 Top II 高表达的细胞株 A375 和 HCT116 具有较强的抗增殖活性 (IC_{50} 分别为 20 和 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **13a** 在 10 和 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下可以明显抑制肿瘤生长, 对小鼠体重无明显影响, 而临床使用的 Topo II 抑制剂 VP-16 显著降低了小鼠体重。以上研究表明, **13a** 有望成为开发新型双 Top I 和 Top II 类抗肿瘤药物的先导分子。

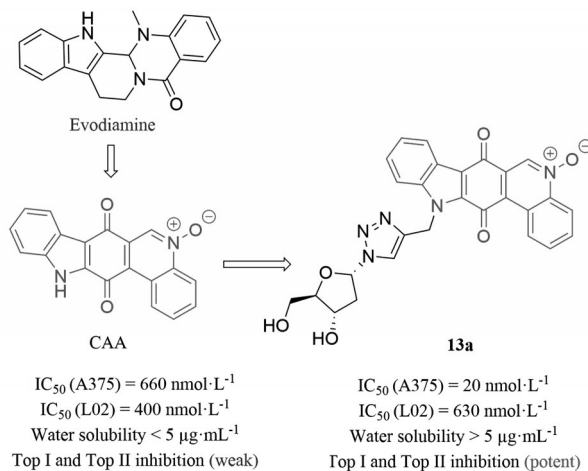


Figure 14 Indolequinoline was similar to evodiamine scaffold and its representative compound **13a**

4 改善理化性质的结构优化或材料包载

化合物 10-羟基吴茱萸碱 **1a** 腹腔注射有效^[14], 但其口服抗肿瘤药效有限, 阻碍了其临床应用。为了克服这一障碍, 本课题组又陆续设计合成了一系列含有水溶性基团的 10-羟基吴茱萸碱衍生物 (氨基酸、磷酸、磺酰胺和琥珀酸) 以改善其水溶性增加体内抗肿瘤活性^[16],

其中, 在 A 环 10 位用磷酸基团和磺胺基团取代的衍生物 **14a** (水溶性由 **1a** 的 $11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提升至 $36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、**14b** (水溶性由 **1a** 的 $11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提升至 $37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的水溶性提升较为明显, 且对多种肿瘤细胞具有优秀的体外抗增殖活性, 尤其是对结肠癌细胞 HCT116 抑制效果最好 (**14a**, $IC_{50} = 0.066 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **14b**, $IC_{50} = 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 图 15)。在结肠癌肿瘤 HCT116 裸鼠异种移植瘤模型中 10-磷酸吴茱萸碱 (**14a**, 图 15) 在灌胃给药 $150 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 每天 2 次的情况下, 肿瘤生长抑制率为 57%, 显示出良好的口服活性。抗肿瘤机制研究表明, 化合物 **14a** 具有 Top I /Top II/微管蛋白三重抑制作用, 并可以浓度依赖性诱导细胞凋亡, 阻滞细胞周期于 G2/M 期, 磷酸盐吴茱萸碱衍生物 **14a** 可以作为抗肿瘤先导化合物, 具有深入研究的价值, 同时, 这些研究也进一步扩展了吴茱萸碱的构效关系。

材料包载是一种提升药物药效常用的策略。利用纳米脂质体去包载药物有很多优势, 例如, 由磷脂双分子层包封水相囊泡构成, 脂质体弹性大, 生物相容性好。并且对所载药物有广泛的适应性, 水溶性药物载入内水相、脂溶性药物溶于脂膜内, 两亲性药物可插于脂膜上, 而且同一个脂质体中可以同时包载亲水和疏水性药物。磷脂本身是细胞膜成分, 因此纳米脂质体注入体内无毒, 生物利用度高, 不引起免疫反应。能够保护所载药物, 防止体液对药物的稀释, 及被体内酶的分解破坏。Han 课题组^[43]为了整合诊断成像和组合疗法, 将吴茱萸碱和吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) (美国食品和药物管理局批准的近红外光谱光敏剂) 封装到纳米脂质体系统 (即 EI@Lipo, 图 16, **15a**) 中。由于纳米脂质体载体, 吴茱萸碱较差的水溶性得到了显著改善, 并且还实现了基于增强渗透性和滞留效应的肿瘤被动靶向能力。在吴茱萸碱和 ICG 的存在下, EI@Lipo 对腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 具有化学抗肿瘤作用和光动力疗法作用。此外, 吴茱萸碱被发现能够催化辣根过氧化物酶, 将其内源性肿瘤 H_2O_2 转化为 ROS, 作为辅助化学动力学疗法的抗肿瘤模式。他们也进行了雄性裸鼠 OSCC 模型的实验, 肿瘤体积达 20mm^3 后, 每 3 天进行一次治疗, 等效吴茱萸碱剂量为 $2.0 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 ICG 剂量为 $2.0 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。其中, EI@Lipo 释放的吴茱萸碱能够触发化疗, 持续破坏光动力疗法后残留的肿瘤细胞, 从而达到化学光动力治疗的协同治疗效果, 具有很强的抗肿瘤能力。并且通过 ICG 完成体内光学成像, 通过 ^{68}Ga 标记的吴茱萸碱 (图 16, **15b**) 进行正电子发射断层摄影术/计算机断层摄影术 (positron emission tomography/computed tomography, PET/CT) 成像, 这使得能够早期发现全身性肿

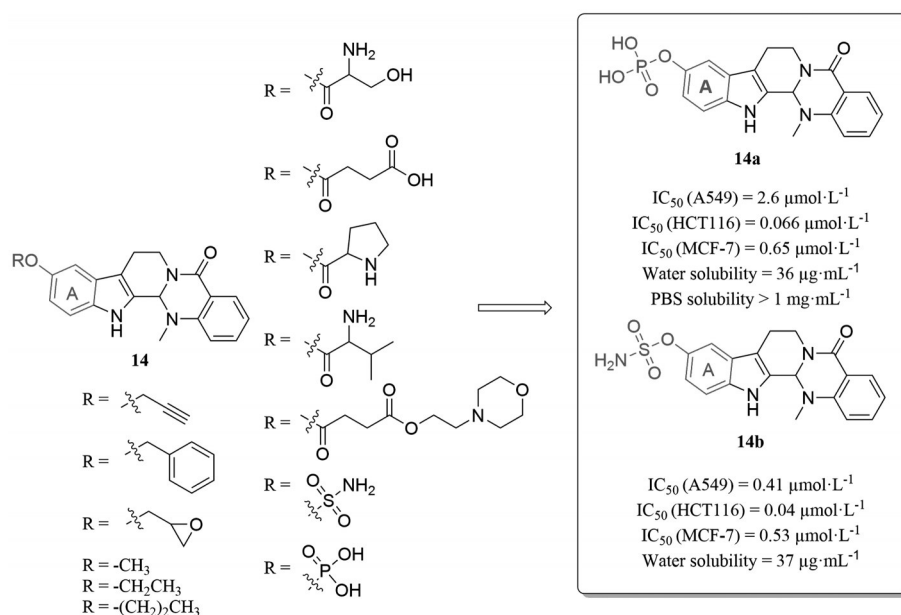


Figure 15 Strategies to improve the water solubility of evodiamine and its representative compounds **14a** and **14b**

瘤并有效评估肿瘤代谢。在光学成像和 PET/CT 成像的指导下, EI@Lipo 通过三模式组合——化学/化学动力学/光动力学组合疗法显示出优秀的肿瘤生长抑制作用。这些结果也为吴茱萸碱的抗肿瘤机制研究以及未来治疗 OSCC 的潜在药物开发提供了新见解。

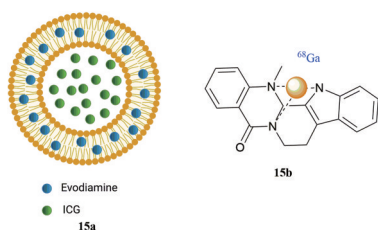


Figure 16 Evodiamine material encapsulation strategy, schematic diagram of evodiamine/indocyanine green nanoliposomes, and the chelated structure between evodiamine and ⁶⁸Ga

5 总结和展望

以天然产物为先导物的抗肿瘤药物开发在新药研究中占据了重要的地位。天然产物吴茱萸碱在体外表现出广谱抗肿瘤活性, 可以很好地抑制多种肿瘤细胞的生长、迁移和侵袭, 是一个不可多得的抗肿瘤先导化合物, 然而, 其水溶性较差、生物利用度低、体内抗肿瘤活性不佳等仍是目前限制其开发成新药所面临的巨大挑战。

为克服以上缺陷所开展的吴茱萸碱药物研究手段日益增多, 越来越多的吴茱萸碱类似物抗肿瘤候选新药被发现, 尤其是近年来, 主要通过骨架修饰策略、分子杂交策略、骨架跃迁策略以及改善其理化性质和材料

包载策略对吴茱萸碱进行改造和优化。骨架修饰策略是最传统的药物化学设计策略。分子杂交策略是一种经典的药物设计方法, 它是依据现有的结构特征, 将具有不同生物活性的药效团片段通过“强强联合”组合得到的新化学实体的过程。优势片段的杂交策略可提高化合物的生物活性和药代性质, 相比于传统的药物研发, 这种基于优势结构相结合的方法成功率更高, 具有较为广阔的应用前景。骨架跃迁策略通常以已知的活性化合物为起点, 通过改变分子的核心结构获得新颖的化学结构, 不仅应用于具有已知配体的项目, 骨架跃迁也广泛应用于先导化合物优化。改善其理化性质和材料包载策略能提高生物利用度, 降低毒副作用。通过这四种策略, 在一定程度上发现了活性和选择性更优的新型分子, 显著增强了体内药理活性, 改善了不良理化性质, 并且基于肿瘤微环境开发具有肿瘤靶向性的吴茱萸碱衍生物也是当前研究的热点, 有助于天然产物来源药物的临床应用和推广。

同时, 吴茱萸碱的作用机制、作用靶点的不明确限制了吴茱萸碱类的新药开发, 作者认为包括吴茱萸碱在内的天然产物的研究重点除了改善性质 (毒性大、理化性质不佳、给药剂量大等) 外, 目前的研究重心应向“靶标确证”的药物化学生物学转移, 例如, 可以基于亲和性蛋白组分析 (affinity-based protein profiling, AfBPP) 策略, 采用原位 (*in situ*) 的光亲和标记 (photoaffinity labeling, PAL) 技术进行 Pull-Down 实验, 开展靶标垂钓, 寻找可能的作用靶点; 采用转录组及蛋白质组联合分析的方法, 探究化合物作用于肿瘤细胞后引起的蛋

白质组变化, 筛选作用前后丰度差异较大的蛋白, 通过聚类分析寻找可能的作用通路和关键蛋白, 初步分析化合物可能的作用蛋白; 结合以上两种方法分析确定可能的作用靶标, 进一步采用化学生物学方法 (如分子水平活性测试、Western blot 实验、实时荧光定量聚合酶链锁反应实验、siRNA 敲除实验、计算机模拟等) 对可能的作用靶标进行验证, 并在此基础上对靶蛋白所在通路进行分析, 深入揭示目标化合物的生物功能。在确证靶标和作用机制的前提下, 再通过本文中的研究策略将极大助力吴茱萸碱类药物的开发进程。不仅如此, 也将为更多天然产物的新药开发提供借鉴和参考。

到目前为止, 还没有吴茱萸碱类药物上市, 相信随着吴茱萸碱成药性结构优化的不断开展, 作用机制研究的不断深入, 将会有以其为先导结构的抗肿瘤药物上市。

作者贡献: 所有作者都参与了文献调研、手稿设计与撰写。夏哲炜、孙驭航、黄天乐、孙华、陈玉平开展文献调研和手稿撰写; 武善超、盛春泉获取经费资助并指导整个研究。所有作者都认可手稿的最终版本。

利益冲突: 本文的发表不存在任何利益冲突。

References

- [1] Seca AML, Pinto DCGA. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 263.
- [2] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 629-661.
- [3] Joshi P, Vishwakarma RA, Bharate SB. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 273-292.
- [4] Yao H, Liu J, Xu S, et al. The structural modification of natural products for novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12: 121-140.
- [5] Jiang ZB, Huang JM, Xie YJ, et al. Evodiamine suppresses non-small cell lung cancer by elevating CD8⁺T cells and downregulating the MUC1-C/PD-L1 axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 249.
- [6] Yang F, Shi L, Liang T, et al. Anti-tumor effect of evodiamine by inducing Akt-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485: 54-61.
- [7] Hong Z, Wang Z, Zhou B, et al. Effects of evodiamine on PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways in pancreatic cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56: 783-793.
- [8] Kan SF, Yu CH, Pu HF, et al. Anti-proliferative effects of evodiamine on human prostate cancer cell lines DU145 and PC3 [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101: 44-56.
- [9] Kim SH, Kang JG, Kim CS, et al. Evodiamine in combination with histone deacetylase inhibitors has synergistic cytotoxicity in thyroid carcinoma cells [J]. *Endocrine*, 2019, 65: 110-120.
- [10] Zhou Y, Hu J. Evodiamine induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and inhibition of cell migration and invasion in human osteosarcoma cells via Raf/MEK/ERK signalling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5874-5880.
- [11] Hyun SY, Le HT, Min HY, et al. Evodiamine inhibits both stem cell and non-stem-cell populations in human cancer cells by targeting heat shock protein 70 [J]. *Theranostics*, 2021, 11: 2932-2952.
- [12] Zhao Z, Gong S, Wang S, et al. Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28: 588-595.
- [13] Wang D, Wang C, Liu L, et al. Protective effects of evodiamine in experimental paradigm of Alzheimer's disease [J]. *Cogn Neurodyn*, 2018, 12: 303-313.
- [14] Dong G, Wang S, Miao Z, et al. New tricks for an old natural product: discovery of highly potent evodiamine derivatives as novel antitumor agents by systemic structure-activity relationship analysis and biological evaluations [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 7593-7613.
- [15] Wang T, Qi D, Hu X, et al. A novel evodiamine amino derivative as a PI3K/AKT signaling pathway modulator that induces apoptosis in small cell lung cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906: 174215.
- [16] Chen SQ, Bi KJ, Wu SC, et al. Water-soluble derivatives of evodiamine: discovery of evodiamine 10-phosphate as an orally active antitumor lead compound [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 220: 113544.
- [17] Dong GQ, Sheng C, Wang S, et al. Selection of evodiamine as a novel topoisomerase I inhibitor by structure-based virtual screening and hit optimization of evodiamine derivatives as antitumor agents [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 7521-7531.
- [18] Liang C, Xia J, Song H, et al. Synthesis *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity and docking studies of new evodiamine derivatives [J]. *J Chem Pharmaceut Res*, 2014, 6: 1161-1171.
- [19] Song S, Chen Z, Li S, et al. Design, synthesis and evaluation of N13-substituted evodiamine derivatives against human cancer cell lines [J]. *Molecules*, 2013, 18: 15750-15768.
- [20] Peng Y, Xiong R, Li Z, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3',4',5'-trimethoxy evodiamine derivatives as potential antitumor agents [J]. *Drug Dev Res*, 2021, 82: 1021-1032.
- [21] Christodoulou MS, Sacchetti A, Ronchetti V, et al. Quinazoline-carboline alkaloid evodiamine as scaffold for targeting topoisomerase I and sirtuins [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 6920-6928.
- [22] Lei F, Xiong YX, Hao XY, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel evodiamine derivatives as potential anti-hepatocellular carcinoma agents [J]. *J Med Chem*, 2022, 65:

- 7975-7992.
- [23] Chien CC, Wu MS, Shen SC, et al. Activation of JNK contributes to evodiamine-induced apoptosis and G2/M arrest in human colorectal carcinoma cells: a structure-activity study of evodiamine [J]. PLoS One, 2014, 9: e99729.
- [24] Wu WS, Chien CC, Liu KH, et al. Evodiamine prevents glioma growth, induces glioblastoma cell apoptosis and cell cycle arrest through JNK activation [J]. Am J Chin Med, 2017, 45: 879-899.
- [25] Deng JD, Lei S, Jiang Y, et al. A concise synthesis and biological study of evodiamine and its analogues [J]. Chem Commun, 2019, 55: 3089-3092.
- [26] Fan X, Deng J, Shi T, et al. Design, synthesis and bioactivity study of evodiamine derivatives as multifunctional agents for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Bioorg Chem, 2021, 114: 105154.
- [27] Hao X, Deng J, Zhang H, et al. Design synthesis and bioactivity evaluation of novel *N*-phenyl-substituted evodiamine derivatives as potent anti-tumor agents [J]. Bioorg Med Chem, 2021, 55: 116595.
- [28] Liang Z, Wang Y, Zhang H, et al. Design, synthesis and bioactivity evaluation of favorable evodiamine derivative scaffold for developing cancer therapy [J]. Eur J Med Chem, 2022, 239: 114530.
- [29] Chien CC, Wu MS, Chou SW, et al. Roles of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and p53 in evodiamine-induced apoptosis and G2/M arrest of human anaplastic thyroid carcinoma cells [J]. Chin Med, 2021, 16: 134.
- [30] Fang K, Dong GQ, Gong H, et al. Design, synthesis and biological evaluation of E-ring modified evodiamine derivatives as novel antitumor agents [J]. Chin Chem Lett, 2014, 25: 978-982.
- [31] Liang Z, Lei F, Deng J, et al. Design, synthesis and bioactivity evaluation of novel evodiamine derivatives with excellent potency against gastric cancer [J]. Eur J Med Chem, 2022, 228: 113960.
- [32] Yang RL, Ma JJ, Guo H, et al. Synthesis and antitumor activity of evodiamine derivatives with nitro, amino, and methoxy groups [J]. Nat Prod Commun, 2022, 17: 1-7.
- [33] Li X, Wu S, Dong G, et al. Natural product evodiamine with borate trigger unit: discovery of potent antitumor agents against colon cancer [J]. ACS Med Chem Lett, 2020, 28: 439-444.
- [34] Hu X, Jiao R, Li H, et al. Antiproliferative hydrogen sulfide releasing evodiamine derivatives and their apoptosis inducing properties [J]. Eur J Med Chem, 2018, 10: 376-388.
- [35] Hu X, Wang Y, Xue J, et al. Design and synthesis of novel nitrogen mustard-evodiamine hybrids with selective antiproliferative activity [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27: 4989-4993.
- [36] Huang YH, Chen SQ, Wu SC, et al. Evodiamine-inspired dual inhibitors of histone deacetylase 1 (HDAC 1) and topoisomerase 2 (Top 2) with potent antitumor activity [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 1294-1308.
- [37] Zhu FG, Meng XG, Liang HX, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of evodiamine-based topoisomerase (Top)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors [J]. Bioorg Chem, 2022, 122: 105702.
- [38] Wu SC, Huang YH, Wang T, et al. Evodiamine-inspired topoisomerase-histone deacetylase dual inhibitors: novel orally active antitumor agents for leukemia therapy [J]. J Med Chem, 2022, 65: 4818-4831.
- [39] Wang L, Fang K, Cheng J, et al. Scaffold hopping of natural product evodiamine: discovery of a novel antitumor scaffold with excellent potency against colon cancer [J]. J Med Chem, 2020, 63: 696-713.
- [40] Xu ST, Yao H, Qiu YY, et al. Discovery of novel polycyclic heterocyclic derivatives from evodiamine for the potential treatment of triple-negative breast cancer [J]. J Med Chem, 2021, 64: 17346-17365.
- [41] Nie LF, Wang SS, Cao JG, et al. Straightforward synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation of hybrids of natural alkaloid evodiamine/rutaecarpine and thieno[2, 3-*d*]pyrimidinones [J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22: 69-82.
- [42] Yang XH, Wang ZP, Zhang SL, et al. Optimization of the natural product calothrixin A to discover novel dual topoisomerase I and II inhibitors with improved anticancer activity [J]. J Med Chem, 2022, 65: 8040-8061.
- [43] Wei Z, Zou H, Liu G, et al. Peroxidase-mimicking evodiamine/indocyanine green nanoliposomes for multimodal imaging-guided theranostics for oral squamous cell carcinoma [J]. Bioact Mater, 2021, 6: 2144-2157.