

文章编号 1006-8147(2019)01-0018-06

论 著

土槿乙酸 C-18 醇酯衍生物的合成及其体外免疫抑制活性研究

曾宪杰¹, 张 猜², 陈守强², 陈 虹²

(1.天津医科大学药学院, 天津 300070; 2.武警后勤学院军事药学教研室, 天津 300309)

摘要 目的: 将土槿乙酸 C-18 位进行结构改造, 筛选出具有高效、低毒、水溶性好等优点的新型免疫抑制化合物。方法: 将 C-18 位还原为醇羟基, 通过缩合酰化反应引入苯环、呋喃环、吡啶环羧酸, 得到土槿乙酸 C-18 醇酯衍生物。经 MTT 法对小鼠 T、B 淋巴细胞的免疫抑制活性和对小鼠正常脾细胞毒性体外细胞实验筛选。结果: 合成得到 10 个未见文献报道的土槿乙酸 C-18 醇酯衍生物 B1-B10, 所合成的目标化合物均经 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HR-ESI 进行结构确定, 并测定了其体外免疫抑制活性, 结果显示其中衍生物 B2、B6、B7 对 T 淋巴细胞增殖抑制活性强于土槿乙酸, 衍生物 B6、B7 对 B 淋巴细胞抑制活性明显强于土槿乙酸。尤其是大多数化合物对正常细胞作用很弱, 远低于阳性对照药, 呈现高效低毒特性。结论: 土槿乙酸 C-18 醇酯衍生物, 引入呋喃环, 抑制 T、B 淋巴细胞增殖活性明显增加, 引入具有共轭体系的呋喃环时活性更佳, 并且毒性降低。

关键词 土槿乙酸; 免疫抑制活性; 高效; 低毒

中图分类号 R914

文献标志码 A

Synthesis and immunosuppressive activity of C-18 alcoholic hydroxylesters derivatives of pseudolaric acid B

ZENG Xian-Jie, ZHAN Cai, CHEN Shou-qiang, CHEN Hong

(1.College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Logistics College of PAPF Military Pharmacy Teaching Office, Tianjin 300309, China)

Abstract Objective: To obtain immunosuppressive compounds with high efficiency, low toxicity and good water solubility by modifying Pseudolaric acid B at the C-18 site. **Methods:** The carboxylic acid group at the C-18 position of pseudolaric acid B was reduced to the corresponding alcohol. The alcohol which was further converted through condensation acylation reaction into the esters of pseudolaric acid B with the benzene ring, furan ring, and pyridine ring carboxylic acid. The immunosuppressive activity of these compounds in mouse T and B lymphocytes and the normal spleen cytotoxicity were tested by MTT assay in vitro. **Results:** Ten C-18 alcoholic hydroxylesters derivatives of pseudolaric acid B were synthesized, which were not reported in the literature. The structures of these compounds were confirmed by spectropic analysis of HR-ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR, and the immunocompetence of all the synthesized compounds was tested. The results showed that among the derivatives, the B2, B6 and B7 were better than pseudolaric acids B on the immunosuppressive activity in T lymphocyte proliferation while B6 and B7 on B lymphocytes inhibitory activity were significantly stronger than pseudolaric acids B. Particularly, most compounds had very weak effects on normal cells, which were much lower than the positive control drugs, showing high efficiency and low toxicity. **Conclusion:** The C-18 alcoholic hydroxylesters derivatives of pseudolaric acid B which were introduced into the furan ring, shows better inhibiting effect in proliferation of T and B lymphocytes, but the activity of the furan ring with conjugated system is higher, and the toxicity could be decreased.

Key words pseudolaric acids B; immunosuppressive activity; efficiency; low toxicity

土槿皮(pseudolarixkaempferi, PAB)是我国南方特有松科植物金钱松(Pseudolarixamabilis)的根皮或近根部树皮, 最早见于清代赵学敏所著《本草纲目拾遗》, 性辛、温、有毒; 归肺、脾经; 功能杀虫止痒, 用于疥癣瘙痒^[1-2]。土槿乙酸(pseudolaric acid B, PAB, 图 1)为土槿皮的主要活性成分^[3], 其基本母核是特殊的萘类结构, 并具有内酯环和共轭双烯酸侧

链的结构, 这类结构在天然产物中是很少见的。我们课题组研究显示土槿乙酸能显著改善迟发型超敏反应小鼠的耳肿胀并呈剂量依赖, 其作用机制通过抑制与 MAPK 与 PPAR 信号通路相关的 p38MAPK、ATF-2、MK2、HSP27 及 TNF- α 活性^[4-5]。土槿乙酸还具有抗肿瘤^[6]、抗白血病^[7]、抗真菌^[8]、抗血管生成等作用。PAB 是很好的免疫抑制活性先导化合物。为寻找高效、低毒, 具有良好水溶性的免疫抑制剂, 对土槿乙酸进行进一步的结构改造。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(812028431)

作者简介 曾宪杰(1991-), 男, 硕士在读, 研究方向: 天然产物结构改造; 通信作者: 陈虹, E-mail: chen hongtian06@163.com。

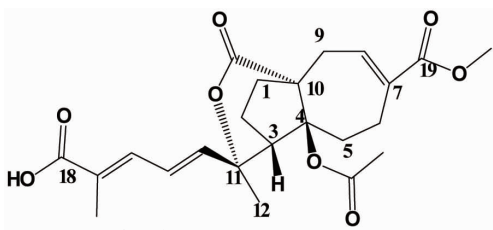


图 1 土槿乙酸结构

Fig 1 Pseudolaric acid B

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 Varian Mercury Vx400 核磁共振光谱仪;Agilent 6210 LC-TOF 质谱测定仪;XT 显微熔点仪(温度未校正);DHG-9000A 电热恒温鼓风干燥箱;ZK-30BS 真空干燥箱;BÜCHI R-124 旋转蒸发仪。薄层色谱和柱色谱所用硅胶(青岛海洋化工公司);土槿乙酸系实验室自提取提纯得到,纯度大于 95%;无水二氯甲烷用五氧化二磷回流 4 h 后蒸出备用;无水四氢呋喃以二苯甲酮做检测试剂,用金属钠回流制得,当溶液变为深蓝色后蒸出备用;无水甲醇用 CaO(250 g/L)回流 6 h,过夜,加至 3A 型分子筛中贮存备用。除特殊说明外,本实验所用试剂均从北京百灵威试剂公司购得。

1.2 合成方法 土槿乙酸 C18 羧酸的还原:在 25 mL 三颈瓶中依次加入土槿乙酸(PB,0.432 g,1 mmol),10 mL 无水二氯甲烷,移至冰浴,冷却反应液温度至 0℃。在此温度下,将过量草酰氯(0.94 mL,10 mmol)用恒压滴液漏斗缓慢滴加至反应瓶中,滴加完毕,移至室温 搅拌反应 2 h。减压蒸馏除去过量草酰氯,得泡沫状固体粗产物。将 10 mL 无水 四氢呋喃(THF)迅速加入反应瓶中,移至冷阱冷却反应液温度至-40℃,在 N₂ 保护下,分两次缓慢加入 LiAlH[OC(CH₃)₃]₃(3.6 mL,4 mmol),滴加完毕,室温搅拌反应。TLC 检测至反应完全。将反应移至冰浴,15 min 后,加无水乙醇 20 mL 淬灭还原剂。然后用 10% HCl 洗涤,20 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机层,加入无水 Na₂SO₄ 脱水,过滤,减压蒸馏得到粗品,粗品经柱色谱(二氯甲烷:乙酸乙酯)纯化得白色固体粉末 0.338 g,收率 81%。

土槿乙酸 C18 酯衍生物的合成:在 15 mL 干燥的反应瓶中依次加入土槿乙醇(PB-OH,0.062 g 0.15 mmol),10 mL 干燥 DCM 和小分子酸类(0.15 mmol),冰浴下加入 HOBt(0.18 mmol),EDCI(0.18 mmol),2 滴三乙胺,15 min 后移至室温反应,TLC 点板检测。反应完毕,分别加入 15 mL 10% HCl,饱和 NaHCO₃,蒸馏水,饱和 NaCl 洗涤,萃取,取二氯甲烷层,加入无水 Na₂SO₄ 脱水,过滤,滤液回收,

减压蒸馏溶剂得到粗品,粗品以不同比例的二氯甲烷和乙酸乙酯为流动相,经柱色谱法纯化得产品。以此路线共合成 10 个化合物,B1-B10。化合物 B1-B10 合成路线及所引入基团见图 2。

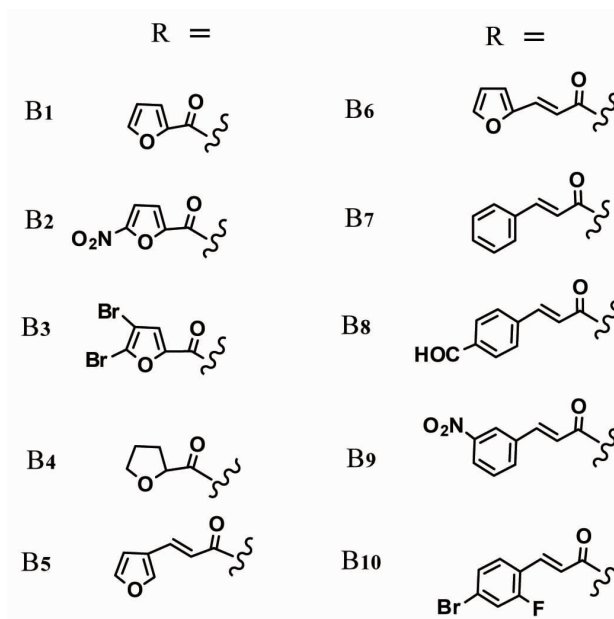
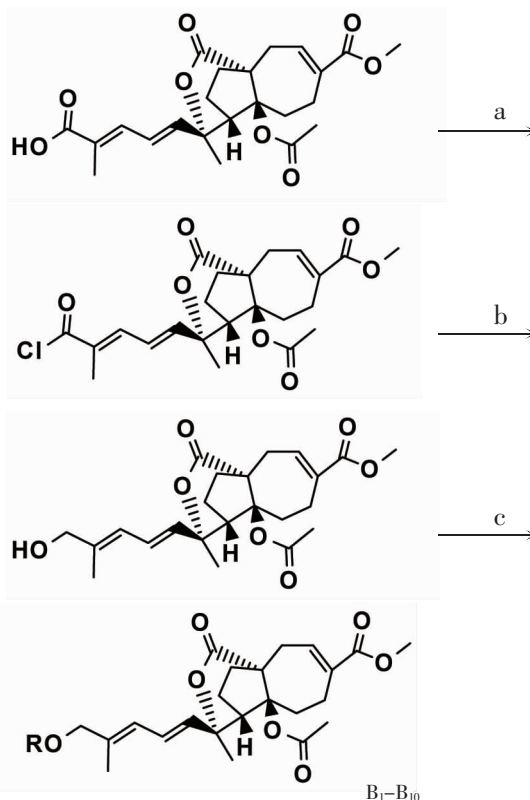


图 2 土槿乙酸衍生物 B1-B10 的合成路线

Fig 2 The synthesis of pseudolaric acid B derivatives B1-B10

Conditions and reagents: (a) anhydrous DCM, oxalyl chloride, 0℃-rt; (b) anhydrous THF, LiAlH[OC(CH₃)₃]₃, N₂, -40℃; (c) anhydrous DCM, R-COOH, HOBt, EDCI, 0℃-rt.

1.3 药理实验部分

1.3.1 MTT 法检测目标化合物对小鼠脾淋巴细胞的毒性作用^[9]

(1) 在超净台中取昆明小鼠脾脏,并按上述方法制备单细胞悬浮液。

(2) 将土槿乙酸衍生物和阳性药霉酚酸酯分别溶于 DMSO,用培养液稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$,其中 DMSO 含量均低于 0.1%,空白培养基同样处理。

(3) 于 96 孔板中以每孔 100 μL (约 1×10^5 个细胞)进行培养,同时加入土槿乙酸衍生物和阳性药霉酚酸酯,每种药物设置 4 个浓度(10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度设置 3 个复孔,并以 RPMI1640 培养液为调零孔。向阴性对照组中加入与给药组相同体积的溶剂。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳温箱中。

(4) 48 h 后每孔加 20 μL 5mg/mL MTT 溶液(PBS 配制)。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件继续孵育 4 h,吸取上清液 80 μL ,每孔加入 100 μL 三联液用于溶解甲簪颗粒,轻度振荡充分溶解。

(5) 在波长 570 nm 下,用酶标仪测定光密度值(OD),以溶剂处理的细胞为阴性对照组,用以下公式计算药物对细胞的抑制率,并计算 IC₅₀:抑制率=(阴性对照组 OD 值-加药组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.2 MTT 法检测目标化合物对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖的抑制作用

(1) 在超净台中取昆明小鼠脾脏,制备淋巴细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 – $5 \times 10^6/\text{mL}$,加入 ConA 或 LPS 至终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 以每孔 100 μL 培养于 96 孔板中,同时加入土槿乙酸衍生物与阳性药霉酚酸酯 100 μL ,每个药物设置 4 个浓度(10 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$),每个浓度设置 3 个复孔,并以 RPMI1640 培养液为调零孔。向阴性对照组中加入与给药组相同体积的溶剂,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 温箱中。

(3) 48 h 后每孔加 20 μL 5mg/mL MTT 溶液(PBS 配制)。37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h,吸取上清液 80 μL ,每孔加入三联液 100 μL 溶解甲簪颗粒,轻度振荡溶解。

(4) 在波长 570 nm 下,用酶标仪测定光密度值(OD),以溶剂处理的细胞为阴性对照组,以 RPMI1640 培养液为空白对照组,用以下公式计算抑制率:抑制率=(阴性对照组 OD 值-加药组 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 本文共合成了 10 个目标化合物,均为未见文献报道的新化合物,经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HR-ESI-MS 确证了这些化合物的结构。这些化合物的理化数据如下。

B1: 乳白色粉末,66 mg,86% yield,¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.59(dd, J= 1.7, 0.8 Hz, 1H, H-5'), 7.24–7.16(m, 2H, H-8, H-4'), 6.52(dd, J= 3.5, 1.7 Hz, 1H, H-6'), 6.46(dd, J= 15.1, 11.0 Hz, 1H, H-14), 6.12(d, J= 11.0 Hz, 1H, H-15), 5.57(d, J= 15.1 Hz, 1H, H-13), 4.75(s, 2H, H-18), 3.72(s, 3H, -OCH₃), 3.26(m, 1H, H-3), 3.07(dd, J= 13.9, 6.0 Hz, 1H, H-5a), 2.89(dd, J= 15.6, 6.3 Hz, 1H, H-6a), 2.75(dd, J= 15.0, 8.8 Hz, 1H, H-9a), 2.61(ddd, J= 15.1, 3.9, 1.7 Hz, 1H, H-9b), 2.13(s, 3H, -OCOCH₃), 2.05(s, 1H, H-6b), 1.86(s, 3H, CH₃-17), 1.81–1.66(m, 5H, H-1, 2, 5), 1.57(s, 3H, CH₃-12)。

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.1, 169.4, 168.1, 158.5, 146.5, 144.5, 141.8, 137.8, 134.4, 133.1, 126.9, 121.7, 118.1, 111.9, 90.3, 83.8, 69.7, 55.2, 52.0, 49.5, 33.3, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7。

HR-ESI-MS m/z: 535.1918 (M+Na)⁺, 理论值: 535.1944 [M+Na]⁺

B2: 乳白色粉末,74 mg,89% yield,¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.36(d, J= 3.7 Hz, 1H, H-4'), 7.31(d, J= 3.8 Hz, 1H, H-3'), 7.24–7.17(m, 1H, H-8), 6.45(dd, J= 15.1, 11.0 Hz, 1H, H-14), 6.14(d, J= 11.0 Hz, 1H, H-14), 5.60(d, J= 15.1 Hz, 1H, H-13), 4.81(s, 2H, H-18), 3.72(s, 3H, -OCH₃), 3.27(m, 1H, H-3), 3.07(dd, J= 14.1, 6.1 Hz, 1H, H-5a), 2.89(dd, J= 15.5, 6.3 Hz, 1H, H-6a), 2.75(dd, J= 15.0, 8.8 Hz, 1H, H-9a), 2.61(dd, J= 15.0, 2.4 Hz, 1H, H-9b), 2.13(s, 3H, -OCOCH₃), 2.05(s, 1H, H-6b), 1.87(s, 3H, CH₃-17), 1.82–1.62(m, 5H, H-1, 2, 5), 1.58(s, 3H, CH₃-12)。

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.1, 173.0, 169.4, 168.1, 156.8, 144.7, 141.8, 138.5, 134.5, 132.1, 128.0, 121.5, 119.0, 111.5, 90.3, 83.8, 71.1, 55.2, 52.0, 49.5, 33.4, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7。

HR-ESI-MS m/z: 580.1801 (M+Na)⁺, 理论值: 580.1795 [M+Na]⁺

B3: 乳白色粉末,87 mg,91% yield,¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.20(s, 2H, H-8, 3'), 6.44(dd, J=15.1,

11.0 Hz, 1H, H-14), 6.10 (d, $J = 10.9$ Hz, ^1H , H-15), 5.58 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.74 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.26 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J = 14.2, 6.3$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J = 15.5, 6.2$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, 1H, H-9a), 2.61 (dd, $J = 15.1, 3.4$ Hz, 1H, H-9b), 2.12 (s, 3H, $-\text{OCOCH}_3$), 2.04 (s, 1H, H-6b), 1.84 (s, 3H, CH_3 -17), 1.80 - 1.68 (m, 5H), 1.57 (s, 3H, CH_3 -12).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 173.1, 169.4, 168.1, 156.7, 145.9, 141.8, 138.2, 134.5, 132.6, 128.6, 127.4, 122.0, 121.6, 103.8, 90.3, 83.8, 70.3, 55.2, 52.0, 49.6, 33.4, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7.

HR-ESI-MS m/z : 669.1309 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 理论值: 669.0257 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

B4: 乳白色粉末, 217 mg, 87% yield, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.20 (m, 1H, H-8), 6.43 (dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 1H, H-14), 6.05 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-15), 5.54 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, H-13), 5.30 (s, 1H, H-2'), 4.59 (s, 2H, H-5'), 4.49 (dd, $J = 8.3, 5.1$ Hz, 1H, H-3a'), 4.03 (dd, $J = 14.4, 7.2$ Hz, 1H, H-4a'), 3.93 (dd, $J = 13.8, 7.3$ Hz, 1H, H-4b'), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.26 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J = 14.2, 6.3$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J = 15.5, 6.0$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, 1H, H-9a), 2.61 (dd, $J = 15.1, 3.4$ Hz, 1H, H-9b), 2.26 (m, 1H, H-3b'), 2.12 (s, 3H, $-\text{OCOCH}_3$), 2.06 - 1.83 (m, 6H, H-6b, 1, 2, 5), 1.79 (s, 3H, CH_3 -17), 1.57 (s, 3H, CH_3 -12).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 173.1, 169.4, 168.1, 141.8, 137.8, 134.5, 133.1, 126.8, 121.7, 90.3, 83.8, 69.8, 69.7, 69.4, 55.2, 52.0, 49.6, 33.3, 30.7, 30.2, 28.8, 27.8, 25.3, 24.3, 21.8, 20.2, 14.6.

HR-ESI-MS m/z : 539.2263 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 理论值: 539.2257 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

B5: 乳白色粉末, 67 mg, 83% yield, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.66 (s, 1H, H-5'), 7.60 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, H-3'), 7.44 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-7'), 7.21 (m, 1H, H-8), 6.59 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-8'), 6.45 (dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 1H, H-14), 6.19 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, H-2'), 6.08 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.55 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.64 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.25 (m, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J = 14.3, 5.6$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J = 15.6, 6.3$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, 1H, H-9a), 2.60 (ddd, $J = 15.0, 4.0, 1.7$ Hz, 1H, H-9b), 2.12 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 1.88 (m,

1H, H-6), 1.84 (s, 3H, CH_3 -17), 1.81-1.68 (m, 5H, H-1, 2, 5), 1.57 (s, 3H, CH_3 -12).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 173.2, 169.4, 168.1, 166.7, 144.6, 144.5, 141.8, 137.6, 135.1, 134.4, 133.7, 126.3, 122.6, 121.8, 117.6, 107.4, 90.3, 83.9, 69.3, 55.2, 52.0, 49.6, 33.3, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7.

HR-ESI-MS m/z : 561.2070 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 理论值: 561.2101 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

B6: 乳白色粉末, 73 mg, 90% yield, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.49 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.45 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-3'), 7.24 - 7.18 (m, 1H, H-8), 6.62 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H, H-8'), 6.49 - 6.46 (dt, $J = 7.0, 2.8$ Hz, 2H, H-14, H-7'), 6.35 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.08 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.55 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.64 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.25 (m, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J = 14.3, 5.6$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J = 15.6, 6.3$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, 1H, H-9a), 2.61 (ddd, $J = 15.0, 4.0, 1.7$ Hz, 1H, H-9b), 2.12 (s, 3H, $-\text{COCH}_3$), 1.88 (m, 1H, H-6b), 1.83 (s, 3H, CH_3 -17), 1.80 - 1.68 (m, 5H, H-1, 2, 5), 1.57 (s, 3H, CH_3 -12).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 173.2, 169.4, 168.10, 166.8, 150.9, 144.9, 141.9, 137.5, 134.4, 133.7, 131.4, 126.2, 121.8, 115.5, 115.0, 112.3, 90.3, 83.9, 69.3, 55.2, 52.0, 49.6, 33.3, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7.

HR-ESI-MS m/z : 561.2057 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 理论值: 561.2101 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

B7: 淡黄色粉末, 72 mg, 88% yield, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.72 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.58-7.49 (m, 2H, H-5', 9'), 7.45-7.35 (m, 3H, H-6', 7', 8'), 7.24-7.17 (m, 1H, H-8), 6.53-6.40 (m, 2H, H-14, 2'), 6.10 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.56 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.66 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.26 (m, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J = 14.3, 5.6$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J = 15.6, 6.3$ Hz, 1H, 6a), 2.75 (dd, $J = 15.0, 8.8$ Hz, 1H, 9a), 2.61 (ddd, $J = 15.1, 3.9, 1.7$ Hz, 1H, 9b), 2.12 (s, 3H, $-\text{OCOCH}_3$), 1.89 (m, 1H, 6b), 1.85 (s, 3H, CH_3 -17), 1.82-1.59 (m, 5H), 1.58 (s, 3H, CH_3 -12).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 173.1, 169.4, 168.1, 166.7, 145.2, 141.8, 137.6, 134.4, 134.3, 133.7, 130.4, 128.9, 128.1, 126.4, 121.8, 117.8, 90.3, 83.9, 69.4, 55.2, 52.0, 49.6, 33.3, 30.7, 29.7, 28.8, 27.8,

24.3, 21.8, 20.2, 14.8.

HR-ESI-MS m/z : 571.2278 ($M+Na$)⁺, 理论值: 571.2308 [$M+Na$]⁺

B8: 淡黄色粉末, 67 mg, 78% yield, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.04 (s, 1H, CHO-7'), 7.91 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, H-6', 8'), 7.74 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.69 (d, $J=8.1$ Hz, 2H, H-5', 9'), 7.25 - 7.17 (m, 1H, H-8), 6.59 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.47 (dd, $J=15.1, 11.0$ Hz, 1H, H-14), 6.11 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.57 (d, $J=15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.68 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.26 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J=14.1, 6.1$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J=15.5, 6.2$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J=15.0, 8.8$ Hz, 1H, H-9a), 2.61 (dd, $J=15.0, 2.5$ Hz, 1H, H-9b), 2.13 (s, 3H, -OCOCH₃), 1.88 (s, 1H, H-6b), 1.86 (s, 3H, CH₃-17), 1.82 - 1.67 (m, 5H, H-1, 2, 5), 1.58 (s, 3H, CH₃-12).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 191.4, 173.1, 169.4, 168.1, 166.1, 143.4, 141.8, 140.0, 137.8, 137.3, 134.5, 133.4, 130.2, 128.6, 126.7, 121.8, 121.1, 90.3, 83.8, 69.8, 55.2, 52.0, 49.6, 33.4, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7.

HR-ESI-MS m/z : 599.2277 ($M+Na$)⁺, 理论值: 599.2257 [$M+Na$]⁺

B9: 淡黄色粉末, 75 mg, 85% yield, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.39 (t, $J=1.8$ Hz, 1H, H-5'), 8.30 - 8.19 (m, 1H, H-7'), 7.84 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H-9'), 7.74 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-3'), 7.60 (t, $J=8.0$ Hz, 1H, H-8'), 7.22 - 7.20 (m, 1H, H-8), 6.60 (d, $J=16.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.47 (dd, $J=15.1, 11.0$ Hz, 1H, H-14), 6.11 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.58 (d, $J=15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.69 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.27 (d, $J=5.9$ Hz, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J=14.0, 6.0$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J=15.5, 6.3$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J=15.0, 8.7$ Hz, 2H, H-9a), 2.61 ((dd, $J=15.0, 2.5$ Hz, 1H, H-9b), 2.13 (s, 3H, -OCOCH₃), 2.05 (s, 1H, H-6b), 1.86 (s, 3H, CH₃-17), 1.82 - 1.62 (m, 5H, H-1, 2, 5), 1.58 (s, 3H, CH₃-12).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173.1, 169.4, 168.1, 165.8, 148.7, 142.2, 141.8, 137.9, 136.1, 134.5, 133.7, 133.3, 130.0, 126.7, 124.6, 122.4, 121.7, 121.1, 90.3, 83.8, 69.9, 55.2, 52.0, 49.6, 33.3, 30.7, 28.8, 27.8, 24.3, 21.8, 20.2, 14.7.

HR-ESI-MS m/z : 616.2170 ($M+Na$)⁺, 理论值: 616.2159 [$M+Na$]⁺

B10: 淡黄色粉末, 86 mg, 89% yield, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.02 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H-3'), 7.61 (dd, $J=8.7, 5.9$ Hz, 1H, H-6'), 7.37 (dd, $J=8.1, 2.2$ Hz, 1H, H-8'), 7.21 (m, 1H, H-8), 7.07 (td, $J=8.4, 2.3$ Hz, 1H, H-9'), 6.46 (dd, $J=15.1, 11.0$ Hz, 1H, H-14), 6.36 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, H-2'), 6.10 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, H-15), 5.56 (d, $J=15.1$ Hz, 1H, H-13), 4.67 (s, 2H, H-18), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.26 (d, $J=5.9$ Hz, 1H, H-3), 3.07 (dd, $J=14.2, 6.3$ Hz, 1H, H-5a), 2.89 (dd, $J=15.4, 6.1$ Hz, 1H, H-6a), 2.75 (dd, $J=15.0, 8.8$ Hz, 1H, 9a), 2.60 (dd, $J=15.1, 3.5$ Hz, 1H, 9b), 2.12 (s, 3H, -OCOCH₃), 2.04 (s, 1H, H-6b), 1.85 (s, 3H, CH₃-17), 1.81 - 1.68 (m, 5H, H-1, 2, 5), 1.58 (s, 3H, CH₃-12).

HR-ESI-MS m/z : 667.1325 ($M+Na$)⁺, 理论值: 667.1319 [$M+Na$]⁺.

2.2 本实验采用 MTT(噻唑蓝)法测试了目标化合物对小鼠 T、B 淋巴细胞的增殖抑制活性和正常细胞的细胞毒作用。体外活性筛选实验以霉酚酸酯 (MMF) 为阳性对照药, 实验结果如表 1 所示。

表 1 新型土槿乙酸醇酯衍生物的体外抑制作用和细胞毒性 [¹IC₅₀ (10⁻⁶ mol·L⁻¹)]

Tab 1 *In vitro* inhibitory effects and cytotoxicities of novel PB and indoles derivatives [¹IC₅₀ (10⁻⁶ mol·L⁻¹)]

化合物	T 淋巴细胞	B 淋巴细胞	正常细胞
B1	45.42	43.15	>100
B2	9.85	49.32	>100
B3	11.02	>100	>100
B4	>100	>100	12.31
B5	>100	>100	>100
B6	7.83	27.05	>100
B7	9.25	15.22	>100
B8	23.41	42.81	54.64
B9	34.52	56.31	>100
PB	10.12	40.35	>10
MMF ^b	6.71	11.83	41.00

^aIC₅₀: 导致细胞增殖抑制一半的浓度, 数值均是两次独立实验的平均值, IC₅₀>100 被定义为无活性; ^b霉酚酸酯

3 讨论

结果显示土槿乙酸 C-18 醇酯系列衍生物多数具有显著的免疫抑制活性, 其中衍生物 B2, B6, B7 对 T 淋巴细胞增殖抑制活性强于土槿乙酸, 衍生物 B3 与土槿乙酸的抑制活性类似, 尤其是 B6 抑制活性接近阳性对照药霉酚酸酯。衍生物 B6, B7 对 B 淋巴细胞抑制活性明显强于土槿乙酸, 衍生物 B1, B2, B8, B9 对 B 淋巴细胞抑制活性与土槿乙酸活性

接近。大多数化合物对正常细胞作用很弱,远低于阳性对照药,呈现高效低毒特性。

呋喃系列衍生物:对 T 淋巴细胞的增殖抑制活性,当引入呋喃环时其活性降低,当 5-位有吸电子基硝基的存在时其活性明显提高,引入卤素溴原子时其活性较土槿乙酸虽有提高,但比硝基取代时活性低,引入四氢呋喃酸时其活性则完全丧失。由此而推测当引入有吸电子基取代呋喃环时,形成了迈克尔反应受体,这种呋喃环的电子共轭体系导致了药理活性增加。B6 化合物活性接近于阳性对照药,而 B5 则完全失去活性,二者结构区别仅仅是-烯酸的取代位置不同,由此推测,引入呋喃丙烯酸有助于提高其药理活性,且 2 位取代优于 3 位。

芳香共轭体系系列衍生物:对 T 淋巴细胞的增殖抑制活性,其化合物活性 B7>B8>B9,而 B10 无活性。表明肉桂酸的引入有助于提高活性,当其芳环上有吸电子基取代时其活性降低,至于 B10,F 和 Br 原子的引入则导致完全丧失活性。据此而推测,吸电子基团不利于活性的提高,可能是通过吸电子基的引入降低了芳香环的电子云密度,进而影响与靶标的结合。

乙酸 C-18 醇成酯类化合物,引入呋喃环,抑制 T、B 淋巴细胞增殖活性明显增加,引入具有共轭体

系的呋喃环时活性更佳,并且毒性降低。对土槿乙酸构效关系的研究将促进新型免疫抑制剂的开发。

参考文献:

- [1] 崔青云,王小德.金钱松研究进展与展望[J].北方园艺,2010(20):202
- [2] 李晓翠,苗爱东,张洪峰,等.土荆皮的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2014,23(29):3301
- [3] 李珠莲,陈科,潘德济,等.土槿皮新二萜成分的研究Ⅲ.土槿甲萜和土槿乙酸萜的分离及化学结构测定[J].化学学报,1985,43(8):786
- [4] Li T,Wang W,Zhao J H,et al. Pseudolaric acid B inhibits T-cell mediated immune response in vivo via p38MAPK signal cascades and PPAR γ activation[J]. Life Sciences,2015, 121:88
- [5] 李覃,董小青,王翼腾,等.土槿乙酸抑制接触性超敏反应的药效学研究及机制探讨[J].中国药理学通报,2014,30(11):1552
- [6] 孟爱国,刘春艳.土槿乙酸诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究[J].肿瘤,2010,30(6):495
- [7] Ma G Y, Li C, Li X C.Selective inhibition of human leukemia cell growth and induction of cell cycle arrest and apoptosis by pseudolaric acid B[J]. J Cancer Res ClinOncol, 2010, 136(9): 1333
- [8] Gan L S,Yang S P, Fan C Q. Lignans and Their Degraded Derivatives from Sarcostemmaacidum [J]. J Natural Products, 2005, 68(2): 221
- [9] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司西安公司,2004:379

(2018-04-20 收稿)

(上接第 9 页)

- [21] Jin C, Zheng Y, Huang Y, et al. Long non-coding RNA MIAT knockdown promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Cell Biol Int,2017, 41(1):33
- [22] Cui Y, Lu S, Tan H, et al. Silencing of long non-coding RNA NONHSAT009968 ameliorates the staphylococcal protein a-inhibited osteogenic differentiation in human bone mesenchymal stem cells[J]. Cell Physiol Biochem,2016, 39(4):1347
- [23] Jin C, Jia L, Huang Y, et al. Inhibition of lncRNA MIR31HG promotes osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. Stem Cells,2016, 34(11):2707
- [24] Liang W C, Fu W M, Wang Y B, et al. H19 activates Wnt signaling and promotes osteoblast differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Sci Rep, 2016,6:20121
- [25] Zhen L, Yun-Hui L, Hong-Yu D, et al. Long noncoding RNA NEAT1 promotes glioma pathogenesis by regulating miR-449b-5p/c-Met axis[J]. Tumour Biol,2016,37(1):673
- [26] 张飞飞,深南,唐元家.LncRNA NEAT1 参与 TLR2 介导的炎症因子的表达[J].现代免疫学,2015,35(4):316

(2018-07-04 收稿)