

芥酸乙醇酰胺的微型有机合成及其抑制 BEL-7404 细胞作用的研究

高明星, 秦 箐, 莫德欢, 王闯楚, 林 华, 卞晓聪, 林翠梧

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目编号:30560186);教育部“春晖计划”项目(项目编号:教外司[2003]593);广西壮族自治区科技厅科学基金项目(编号:桂科自 0728128);2007 年广西研究生教育创新计划项目

作者单位: 530021 南宁,广西医科大学(高明星,莫德欢,王闯楚,林 华);广西医科大学天然药物化学教研室(秦 箐),病理生理教研室(卞晓聪);广西大学化学化工学院(林翠梧)

作者简介: 高明星(1984-),女,广西医科大学 2007 级药理学硕士,硕士学位,研究方向:抗肿瘤药物的研究。E-mail: Arshum_20713@yahoo. com. cn

通讯作者: 卞晓聪(1970-),男,硕士,讲师,研究方向:肿瘤干细胞与肿瘤耐药的研究。E-mail: bskxc@yahoo. com. cn

[摘要] 目的 探讨合成芥酸乙醇酰胺对人肝癌细胞 BEL-7404 的抑制作用。方法 (1)运用微型有机合成技术,以芥酸、甲醇和乙醇胺为原料、金属钠为催化剂合成芥酸乙醇酰胺,采用硅胶柱层析分离纯化,红外光谱和核磁共振谱确证结构;(2)用芥酸乙醇酰胺作用于 BEL-7404,用倒置显微镜镜下观察其对 BEL-7404 细胞的生长状况的影响,MTT 法观察其抑制作用。结果 合成出了芥酸乙醇酰胺并确证了其结构;芥酸乙醇酰胺浓度在 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上时,能很明显的抑制 BEL-7404 的增殖,抑制率均高于 40%, IC_{50} 为 101.77588 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结论 采用微型合成法能够快速、方便地合成出芥酸乙醇酰胺;芥酸乙醇酰胺对 BEL-7404 细胞的增殖有明显的抑制作用。

[关键词] 芥酸; 芥酸乙醇酰胺; BEL-7404; 抗肿瘤作用

[中图分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)03-0216-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.03.03

Microscale synthesis of N-alcohol erucamide and its inhibiting effect on BEL-7404 in vitro GAO Ming-xing, QIN Qing, MO De-huan, et al. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the synthesis of the N-alcohol erucamide and its activity of anti-tumor in vitro. **Methods** (1) Through the micro-organic synthesis technology, erucic acid and methanol were coupled with ethanolamine as raw materials, sodium as catalyst to synthesize the N-alcohol erucamide, isolation and purification achieved by silical gel column chromatography, and its structure was confirmed by infrared spectra and nuclear magnetic resonance spectrum; (2) BEL-7404 was cultured in media added to the N-ethanol erucamide. The cells' growth was observed in inverted microscope. The effect of inhibiting cancer cells was detected with MTT. **Results** The N-alcohol erucamide was synthesized successfully; Its strong inhibiting effect was recorded beyond 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The inhibiting rates were all beyond 40%, the inhibitory concentration 50% (IC_{50}) was 101.77588 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **Conclusion** Through the microscale organic synthesis, N-alcohol erucamide can be synthesized quickly and conveniently. N-alcohol erucamide has obvious inhibiting effect on BEL-7404 cells in vitro.

[Key words] Erucic acid; N-alcohol erucamide; BEL-7404; Anti-tumor

国内外学者从机制、临床意义等多方面对氮芥类药物抗肿瘤进行了大量的研究,目前临床上使用的氮芥类抗肿瘤药物有环磷酰胺、苯丁酸氮芥等^[1]。而大多数抗肿瘤药物在有效剂量范围内毒性比较大,主要有肾毒性和免疫抑制等不良反应。

为了寻找延长癌症病人的生存时间和提高生活质量的抗肿瘤药物,我们在前期工作已发现了具有免疫调节活性的板蓝根组酸(又名板蓝根高级不饱和脂肪酸)^[2]具有较好的体内外抗肿瘤活性^[3~5]并研究板蓝根组酸的抗肿瘤定量构效关系和合成了一系列

类似物的基础上^[6-9],以芥酸、甲醇和乙醇胺为原料,采用经典的酯交换和酰化反应,选择微型有机合成技术首次合成了芥酸乙醇酰胺。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 芥酸(由四川天宇油脂化学有限公司提供),乙酸乙酯、无水乙醇(AR,由广东汕头市西陇化工提供),二氯甲烷、石油醚、甲醇、乙醇胺(AR,均由广东光华化学厂有限公司提供),钠、MTT(sigma进品分装),36% HCl(由广西师范学院化学试剂厂提供),异丙醇(批号 20050410,由广东光华化学有限公司提供),薄层层析用硅胶 H(CP,由青岛海洋化工有限公司提供),RPMI-1640 培养基(成品装,规格 500 ml,由 HyClone 公司提供),胎牛血清(由 HyClone 公司提供)。

1.2 仪器 AE240 双量程分析天平(METTLER-TOLEDO),Spectrum One FT-IR 红外光谱仪(美国 Perkin-Elmer 公司),Nicolet NEXUS-470 红外光谱分光光度计(美国尼高力公司),ML-902 定时、恒温磁力搅拌器(上海浦江分析仪器厂),MERCK 板,倒置显微镜(Leica,301-185.104-000),Epics XL 流式细胞仪(美国 Coulter 公司)。

1.3 细胞株 BEL-7404 细胞株(由广西医科大学病理生理实验室提供)。

1.4 方法

1.4.1 芥酸甲酯的合成、分离纯化及结构鉴定 在二口烧瓶中加入 4.2033 g 芥酸(12.4 mmol),再加入 5 ml 甲醇(123.6 mmol),醇酸摩尔比为 10:1。摇动,使芥酸完全溶解。再滴入 6 滴浓硫酸(约为芥酸质量的 5%)。混合均匀后,放入搅拌磁子,装上回流冷凝管,以液体石蜡为浴液,加热搅拌反应。至 TLC 显示原料几乎完全转化时停止^[10](约 40 ~ 50 min)。反应混合物分成两相后,水洗,无水硫酸钠干燥^[11]。薄层层析用硅胶 H,改良的快速低压柱层析法,石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱。分段收集,薄层检查,相同部分合并、回收溶剂。分离得淡黄色油状液体 2.8730 g。产品易溶于石油醚、氯仿、乙醇,在薄层色谱中三种展开体系均呈单一斑点,乙酸乙酯-石油醚(1:20) R_f 值为 0.62,乙醚-石油醚(2:15) R_f 值为 0.60,乙酸乙酯-环己烷(1:20) R_f 值为 0.64。IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 2999 ($\nu_{\text{C-H}}$)、1653 ($\nu_{\text{C=C}}$)、719 ($\gamma_{\text{C-H}}$),表明了存在顺式 C=C 双键; 2924、2853 (C-H), 1743 (C=O)、1166 (C-O-C), 显示了酯基的信号; 719 也显示了一 $(\text{CH}_2)_n$ — ($n > 4$)

的存在。¹H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ ppm: 5.38 (2H, m, —CH=CH—), 3.69 (3H, s, —COOCH₃), 2.32 (2H, t, $J = 7.55$ Hz, —CH₂—COOC), 2.03 (4H, m, —CH₂—C=C—CH₂—), 1.64 (2H, m, —CH₂—C—COO—), 1.30 (30H, m, —(CH₂)_n—), 0.90 (3H, t, $J = 6.90$ MHz, CH₃—C—)。根据以上光谱数据并且通过与 Sadtler 标准图谱及文献图谱数据对照相符,鉴定该化合物为芥酸甲酯,结构式为: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOCH}_3$ 。

1.4.2 芥酸乙醇酰胺的合成、分离纯化及结构鉴定 在二口烧瓶中加入适量的甲苯(作溶剂),再加入 1.8 g (5.1 mmol) 芥酸甲酯和 0.987 g (16.2 mmol) 乙醇胺,两者摩尔比为 1:3,摇动,使芥酸甲酯和乙醇胺完全溶解于甲苯,再加入适量催化剂金属钠。放入搅拌磁子,装上回流冷凝管,以液体石蜡为浴液,加热搅拌反应(恒温于 70 °C),反应 2 h 后,至薄层层析显示原料几乎完全转化时停止。将取粗产物,加入酸性氧化铝,用常压硅胶 H 柱层析法,石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱。分段收集,薄层检查,合并相同流分、回收溶剂,分离得到白色固体 0.7506 g。在薄层色谱中三种展开体系均呈单一斑点,氯仿-甲醇(10:1) R_f 值为 0.50,石油醚-乙酸乙酯(1:5) R_f 值为 0.30,氯仿-丙酮(2:1) R_f 值为 0.45。IR ($\nu_{\max}$, KBr, cm^{-1}): 3295 (ν_{NH}), 1653 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1555 (δ_{NH}), 为明显的酰胺 I 带和酰胺 II 带,显示了仲酰胺的存在, 2925 (C—H), 726 (—(CH₂)_n—), 表明了甲基和长链亚甲基的信号,红外光谱数据符合芥酸乙醇酰胺的结构,根据反应物结构,综合以上光谱数据,鉴定该化合物为芥酸乙醇酰胺,其结构式为: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COONHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 。

1.4.3 芥酸乙醇酰胺抗肿瘤作用的研究 将对数生长期的 BEL-7404 细胞以 0.25% 的胰蛋白酶消化,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml,种于 96 孔培养板,100 μl /well,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将不同浓度的样品加入不同的孔,配好的样品微乳液的浓度依次为 800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78 μg /ml,阳性对照加入阿霉素,空白对照加等体积的 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,阴性对照加入与配药所用相同比例的溶剂和培养基,每个浓度做 4 个复孔。加完样品后混匀,于培养箱中培养 24 h,于倒置显微镜下观察细胞形态,弃上清,加入含 0.5 mg/ml MTT 工作液,100 μl /well,继续培养 4 ~ 6 h。弃上清,加 0.4 mol/

L 的盐酸化异丙醇,100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 。待结晶物溶解后,以 PBS、水或盐酸化异丙醇为空白调零,用酶标仪在波长 490 nm 下检测吸光度值(OD 值)。

2 结果

芥酸乙醇酰胺作用于 BEL-7404 细胞,镜下观

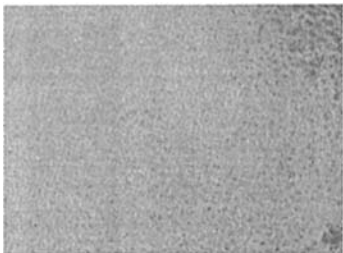


图1 阴性对照(100X)

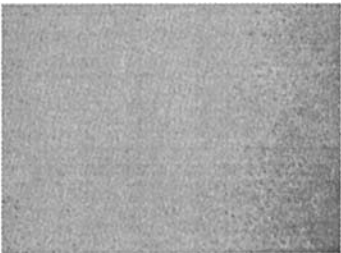


图2 芥酸乙醇酰胺(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(100X)



图3 芥酸乙醇酰胺(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(100X)

表1 化合物芥酸乙醇酰胺体外对 BEL-7404 细胞杀伤效应($n=4, \bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抑制率(%)
800	87.20 $\pm$ 3.14
400	84.66 $\pm$ 1.35
200	56.61 $\pm$ 5.69
100	47.62 $\pm$ 1.35
50	40.63 $\pm$ 1.65
25	23.70 $\pm$ 1.35
12.5	19.37 $\pm$ 1.80
6.25	18.52 $\pm$ 0.00
3.125	14.92 $\pm$ 2.10
1.56	8.57 $\pm$ 8.68
0.78	2.86 $\pm$ 0.00

3 讨论

3.1 与常量合成法相比较,本微型合成法具有以下优点:(1)设备简单。本法用定时、恒温磁力搅拌器代替常规搅拌器和电炉,简化了设备和操作,安全且节省实验空间。(2)试剂用量少、成本低、环境污染小。由于设备的简化和试剂用量的减少,使得成本大为降低,并且减少了对环境的污染和实验的危险性。(3)操作简便、节省时间。设备的简化也使得操作变得更为简便、缩短了实验时间。

3.2 本合成方法是一种充分显示了微型化学优势的、符合绿色化学思维 4R 原则的合成方法,比较适合在有机合成中摸索反应条件时采用。经核磁共振证实终化合物为目标产物。

3.3 在体外的抗肿瘤实验中,我们仅做了定性观察就可以达到初步的实验目的,首先化合物对癌细胞生长状态,包括细胞形态、生长方式进行观察,为后续的定量抑制实验检测做前期工作。芥酸乙醇酰胺

细胞的集落明显减少,细胞克隆生长状态受抑制(图1,2,3)。芥酸乙醇酰胺浓度在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上时,有较强的抑制作用,抑制率均超过 40%,IC50 为 101.77588 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。见表 1。

对 BEL-7404 细胞在 50.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上的浓度时有明显的抑制作用,对板蓝根高级不饱和脂肪酸构效关系仍需作更深入研究。实验结果表明,芥酸乙醇酰胺并不是直接杀死肿瘤细胞,而是使细胞的增殖速度受到影响,有可能是影响细胞周期的分布,也有可能是影响肿瘤增殖相关因子的表达。其作为一种新型抗肿瘤先导化合物,抗肿瘤机理尚未明确。该化合物的抗肿瘤效应及其构效关系都有进一步研究的价值,其结构也存在继续修饰的可能。

综上所述,芥酸乙醇酰胺对 BEL-7404 细胞具有很明显的抑制作用,其抗肿瘤的机制有待进一步全面深入的研究,具有一定的实际应用意义。对板蓝根高级不饱和脂肪酸构效关系有待进一步的研究。

(致谢:本研究得到广西大型仪器协作共用网的资助)

参考文献

1 Baraldi PG, Beria L, Cozzi P, et al. Cinnamoyl nitrogen mustard derivatives of Pyrazole analogues of tallimustine modified at the amidino moiety: design, synthesis, molecular modeling and antitumor activity studies[J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12(14): 3911-3921.

2 秦 箬, 贺海平, Soren Brogger Christensen, 等. 中药板蓝根中高级不饱和脂肪酸的分离鉴定及免疫活性成分的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11(1): 15-16.

3 侯华新, 黎丹戎, 韦长元, 等. 板蓝根高级不饱和脂肪酸对耐药肝癌细胞株 BEL-7404/ADM 逆转作用实验[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(5): 351-353.

4 侯华新, 秦 箬, 黎丹戎, 等. 板蓝根高级不饱和脂肪酸组分的体外抗人肝癌 BEL-7402 细胞活性[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(1): 16-19.

5 侯华新, 黎丹戎, 秦 箬, 等. 板蓝根高级不饱和脂肪酸体内抗肿瘤实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(3): 156-157.

6 秦 箬, 林 华, 刘雪梅, 等. 芥酸乙酯的微型有机合成[J]. 广西

- 科学院学报, 2006, 22(S): 399-400.
- 7 林 华, 秦 箫, 刘雪梅, 等. 芥酸苯甲酯的微型有机合成[J]. 广西科学院学报, 2006, 22(S): 401-402.
- 8 李海冬, 林 华, 秦 箫, 等. 芥酸异丙酯的微型有机合成[J]. 广西科学院学报, 2006, 22(S): 397-398.
- 9 莫德欢, 林 华, 邝晓聪, 等. 芥酸环己酯的微型有机合成及体外抗肿瘤活性研究[J]. 广东化工, 2009, 36(2): 20-22.
- 10 秦 箫, Christensen SB, Rasmussen HB. 3,5-二甲基苯甲酸 2-乙酮基苯酚酯的微型有机合成和结构测定[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2003, 18(1): 23.
- 11 周宁怀, 王德琳. 微型有机化学实验[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 15-16, 70-78.
- [收稿日期 2009-11-02][本文编辑 谭 毅 黄晓红]

论 著

城镇青年人高血压的临床研究

谢燕萍, 神安煌, 王少平, 何 鸿, 潘正星

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科研课题(编号: Z2008323)

作者单位: 530300 广西, 横县人民医院心内科

作者简介: 谢燕萍(1967-), 女, 大学本科, 学士学位, 副主任医师, 研究方向: 高血压和心律失常。E-mail: hxyynzyx28888@sina.com

[摘要] 目的 了解城镇青年人高血压的临床特点, 为城镇青年人高血压控制达标采取适合的措施提供依据。方法 对 2007-10~2008-05 在我院体检的青年人(18~44 岁)高血压患者 306 例进行心血管危险因素评估, 并与同期老年人(年龄 ≥ 60 岁)300 例进行对照, 分析城镇青年人高血压的临床特点以便针对其临床特点进行干预。结果 平均舒张压、高血压家族史、超重、吸烟、酗酒、空腹血糖调节受损、高胆固醇血症、高三酰甘油血症和高尿酸血症城镇青年人组均高于老年人对照组。城镇青年人高血压检出率 11.67%, 知晓率 11.44%, 治疗率 7.19%, 控制率 3.92%, 均较老年人组低。结论 对青年高血压患者进行健康生活方式教育, 并早期发现和早期防治才能提高青年高血压病知晓率、服药治疗率和血压控制率。

[关键词] 青年人; 高血压**[中图分类号]** R 544.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)03-0219-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.03.04

Clinical research on young hypertension patients in towns XIE Yan-ping, SHEN An-huang, WANG Shao-ping, et al. Hengxian People's Hospital, Guangxi 530300, China

[Abstract] **Objective** To find out the clinical characteristics of young hypertension patients in towns, and to provide the evidence for the measures to control hypertension in young people in towns in order to achieve the standard. **Methods** The cardiovascular risk factor of 306 young hypertension patients who received physical examination in our hospital from October, 2007 to May, 2008, were evaluated and their results were compared with those of the 300 elderly hypertension patients who were greater than or equal to 60 years old at the corresponding period and the clinical characteristics of young hypertension patients were analyzes in order to intervene it aiming at its characteristics. **Results** Compared with the aged, the young were higher in average diastole pressure, hypertensive family history, over-weight, smoking, excessive drinking, impaired fasting glucose, hypercholesterolemia, high triglyceride and hyperuricemia. The relevance rate of hypertension in young people in towns was 11.7 percent, the awareness rate of hypertension was 11.44 percent, treatment rates was 7.19 percent, control rate was 3.92 percent, which were lower than those of the aged. **Conclusion** Young hypertension patients should be educated in a healthy way of life in order to find and prevent and treat the disease earlier, and increase the awareness rate of hypertension, treatment rate and the control rate of blood pressure.

[Key words] Young people; Hypertension