

C-9 不同位阻取代小檗碱衍生物的合成及对 DNA 键合作用的影响*

黄绍智, 黎 珊, 庞冀燕, 陈文华
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以小檗碱为原料, 合成了小檗碱 C-9 位不同空间位阻取代的 9-乙氧基小檗碱、9-异丙氧基小檗碱, 通过 MS、¹H NMR 确认其结构。运用紫外可见吸收光谱法和荧光光谱法研究了化合物与 CT DNA 的结合作用。结果发现, 小檗碱 C-9 位上的不同空间位阻会影响小檗碱衍生物与 CT DNA 的相互作用, 随空间位阻增大结合强度减小, 结合模式也发生了变化, 初步证明了小檗碱类化合物可能是从环的 C-8, 9, 10 这一侧与 DNA 相互作用, 用实验验证了 Mazzini 计算机模拟的结合模型。

关键词: 小檗碱衍生物; C-9 取代; CT DNA; 相互作用

中图分类号: O621.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 02-0058-05

Synthesis and DNA-binding Activities of C-9 Substituted Berberines

HUANG Shaozhi, LI Shan, PANG Jiyan, CHEN Wenhua

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: 9-Ethoxyberberine and 9-isopropanoxyberberine bearing with different sterically hindered groups were synthesized from beberubine material. The interaction between these berberine derivatives and CT DNA were analyzed by UV-vis and fluorescence spectroscopies. The results indicated that increasing in the steric hindrance of the C-9 position of berberine derivatives leads to a decrease in the DNA-binding affinity, which may provide an evidence supporting the binding of berberine to DNA from its C5-C6-N⁺-C8 side.

Key words: berberines; C-9 substituted; CT DNA; binding

近年来, 以生物重要分子核酸, 特别是 DNA 为靶点的抗肿瘤抗病毒药物研究成为了生物有机化学、化学生物学以及药物化学中的一个倍受关注的研究领域^[1]。国内外研究表明, 对已知 DNA 结合作用与作用机理的天然产物进行结构修饰是寻找更为高效的 DNA 结合药物的一个极为有效的途径^[2]。小檗碱 (图 1A) 又名黄连素, 具有抗肿瘤、抗菌、抗心衰、降血糖等广泛药理作用^[3]。最近研究发现小檗碱抗肿瘤生物活性被认为是小檗碱与 DNA 之间相互作用的结果^[4-5]。因此近年来, 小檗碱及其衍生物作为 DNA 结合药物的研究引起了国内外研究人员广泛的兴趣。人们利用各种分析测

试手段^[6-12], 诸如吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱、核磁共振技术以及电喷雾质谱等技术手段研究其与 DNA 的作用方式和作用强度。对小檗碱与 DNA 相互作用的结合模式, 一直是争论的热点, 到现在这个问题仍旧没有很好的解决。在我们先前的研究中发现^[9-12], 小檗碱及其衍生物可能是通过嵌插的结合方式与 DNA 相互作用。Mazzini^[6]用核磁共振和光谱的方法研究小檗碱与短序列 DNA 的相互作用, 从他的计算机模拟小檗碱与 d (AA-GAATTCCT)₂ 的最小能量结合情况, 我们发现小檗碱是通过结构的一部分, 如图 1B 黑体部分与 DNA 相互作用的。因此, 假如增加小檗碱与 DNA 相互

* 收稿日期: 2008-07-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (5300905)

作者简介: 黄绍智 (1979 年生), 男, 硕士; 通讯作者: 庞冀燕; E-mail: cespjy@mail.sysu.edu.cn

作用部分(黑体部分)的空间位阻,将有可能影响小檗碱与 DNA 之间的相互作用。于是本文设计合成了具有 C-9 不同位阻的小檗碱衍生物(图 1C),研究增加 C-9 位空间位阻后化合物与 DNA 结合的影响,从另外一个角度,即用实验的方法去验证 Mazzini 计算机模拟的结合模型,为小檗碱类化合物与 DNA 结合的作用机理提供更多的证据。

1 结果和讨论

1.1 C-9 不同空间位阻取代的小檗碱衍生物的合成

参考文献 [13], 将小檗碱(1a, berberine)在 N_2 保护下,高温熔融裂解选择性去除 C-9 位甲基得到小檗红碱(2, berbrubine),小檗红碱再与溴代烷作用,烷基化得到目标化合物 1b, 1c(图 2)。合成产物分别经过 MS 和 NMR 得到确证。

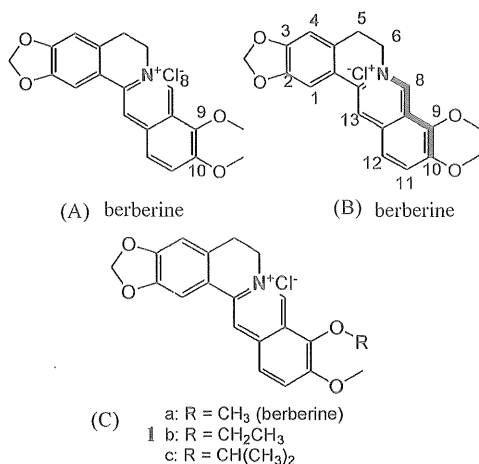


图 1 小檗碱类化合物的结构

Fig. 1 Structures of berberines

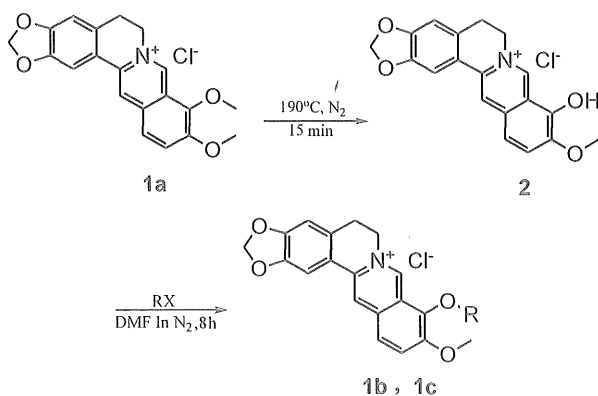


图 2 小檗碱衍生物 1b, 1c 合成路线

Fig. 2 Synthetic route of berberine derivatives

1.2 9-烷氧基小檗碱衍生物与 CT DNA 相互作用的光谱学研究

1.2.1 9-烷氧基小檗碱衍生物与 CT DNA 相互作用的荧光光谱研究 荧光光谱法也是一种常用于研究小分子化合物与 DNA 相互作用的方法,这种方法比紫外吸收光谱具有更高的灵敏度,其依据是小分子化合物与 DNA 相互作用后会发生荧光增强或者荧光淬灭现象。通过荧光数据可以定量的计算出药物与 DNA 的结合系数。在我们的实验中采用了滴定法进行荧光光谱研究,即保持药物浓度不变,不断的增加 DNA 的浓度,记录 9-烷氧基小檗碱衍生物的荧光光谱图(图 3)。

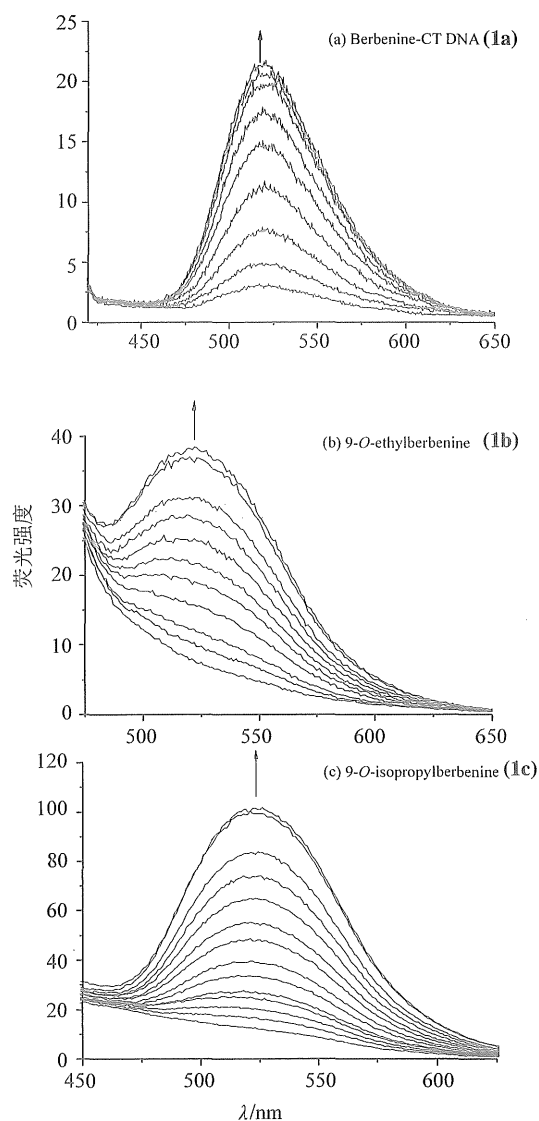


图 3 1a, 1b, 1c 与 CT DNA 荧光滴定图

Fig. 3 Spectrofluorimetric titration of 1a, 1b, 1c with CT DNA

通过非线性拟合方法计算 (图 4), **1a**、**1b** 和 **1c** 与 DNA 的结合常数分别为 $(1.12 \pm 0.043) \times 10^4$, $(4.85 \pm 0.0008) \times 10^3$ 和 $(1.34 \pm 0.0007) \times 10^3$ L/mol, 结合强度 $1a > 1b > 1c$, 可以发现随着小檗碱衍生物 C-9 位的空间位阻的增大, 小檗碱衍生物与 CT DNA 的相互作用结合强度明显减小, 小檗碱与 CT DNA 的结合常数为 9-异丙氧基小檗碱与 CT DNA 的结合常数的 8.4 倍, 这说明小檗碱衍生物 C-9 位的空间位阻会影响其与 CT DNA 的相互作用, 位阻越大, 结合能力越小。

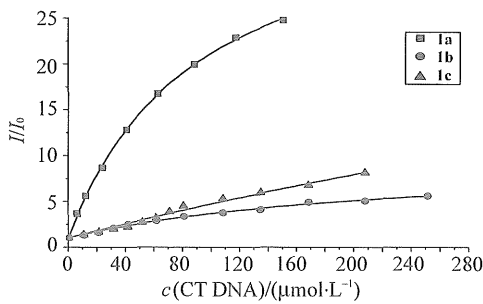


图 4 **1a**、**1b** 和 **1c** 与 CT DNA 作用的拟合图

Fig. 4 The relationship between the relative fluorescence intensities (I/I_0) and the concentration of CT DNA

表 1 **1a**、**1b** 和 **1c** 与 CT DNA 的结合常数和光谱学性质

Table 1 Apparent association constants and photophysical properties of **1a**, **1b** and **1c** bound to CT DNA

化合物	波长红移量/nm	吸收度变化/%	$K_{app}/(L \cdot mol^{-1})^{1)}$	结合常数
1a	0.8	减色 8.23	$(1.15 \pm 0.00045) \times 10^3$	1
1b	0.6	减色 3.49	$(4.50 \pm 0.00091) \times 10^3$	3.6
1c	0.4	增色 3.31	$(0.73 \pm 0.00036) \times 10^3$	8.4

1) 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 6.35), 常温

1.2.2 9-烷氧基小檗碱衍生物与 CT DNA 相互作用的紫外吸收光谱研究 紫外可见吸收光谱法是研究小分子化合物与 DNA 的相互作用的一种常用方法, 小分子化合物与 DNA 相互作用后会发生最大吸收峰的偏移——紫移或者红移, 也会发生吸收强度的变化——增色或者减色。一般认为, 小分子化合物与 DNA 相互作用后如果紫外光谱图发生减色红移, 则小分子化合物是以嵌插的方式与 DNA 相互作用的; 如果是发生增色紫移认为小分子化合物是与 DNA 的小沟槽部位发生相互作用的, 紫外光谱减色率的大小以及红移程度可以初步反应小分子

化合物与 DNA 相互作用的强弱。在本文合成化合物与 CT DNA 相互作用的紫外可见吸收光谱研究中, 始终保持药物的浓度不变, 然后不断的加入 CT DNA, 记录随 DNA 浓度的不断增加的紫外吸收光谱图 (图 5)。

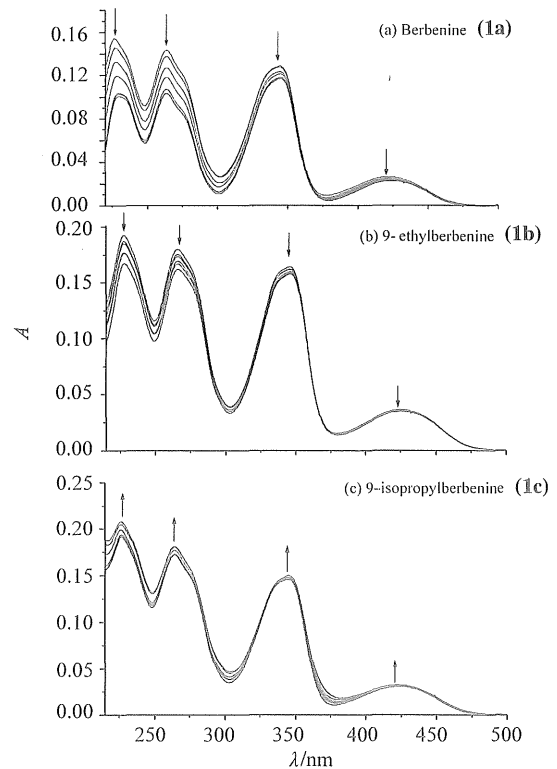


图 5 **1a**、**1b** 和 **1c** 与 CT DNA 的紫外可见吸收光谱图

Fig. 5 UV-vis spectra of **1a**, **1b** and **1c** with CT DNA

结果发现, 小檗碱及其衍生物与 CT DNA 相互作用后紫外可见光光谱发生了一定的变化 (表 1)。从图 5 来看, 化合物 **1a** 和 **1b** 的变化比较明显, 而化合物 **1c** 则不明显, 由此可以得出的结论是化合物 **1c** 与 DNA 结合较弱, 与荧光滴定的结果一致, 说明 C-9 位上的空间位阻会在一定程度上影响小檗碱类化合物与 DNA 之间的键合作用, 空间位阻越大键合作用可能越小。

结合紫外光谱和荧光光谱的结果可以初步证明, 小檗碱类化合物可能是从环的 C-8, 9, 10 这一侧与 DNA 相互作用, 用实验验证了 Mazzini 计算机模拟的结合模型。另外, 引入乙基和异丙基后化合物的疏水性增加, 理论上结合能力应该增强, 而实验结果是降低。这从另一个角度说明是空间位阻在起作用。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

^1H NMR 用 Varian 公司 INOVA 300NB 超导核磁共振谱仪测定, CDCl_3 、 CD_3OD 为溶剂, TMS 为内标; MS 用 Finnigan 公司 LCQ^{DECA} XP 高效液相色谱-质谱联用仪; 其它试剂均为市售化学纯或分析纯试剂。

2.2 小檗红碱 (2) 的制备

盐酸小檗碱 (434 mg, 1.167 mmol, **1a**), 在 190~210 °C 真空裂解 20 min, 然后在冷却至室温, 用硅胶柱分离提纯 (洗脱剂: $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}) = 8:1$), 得红色晶体 263 mg (0.735 mmol, 产率 63%)。

2.3 9-乙氧基小檗碱 (1b) 的制备

将 65 mg (0.182 mmol) 小檗红碱溶于 3 mL DMF 中, 然后滴加 0.5 mL (730 mg, 6.704 mmol) 溴乙烷, 氮气保护, 40 °C 反应 8 h, 减压蒸除溶剂, 用硅胶柱 (洗脱剂: $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}) = 10:1$) 分离提纯, 过阴离子交换树脂, 得到黄色粉末 46 mg (0.119 mmol, 产率 65.5%)。

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$, 300 MHz): δ_{H} 1.520 (t, 3 H, $J = 6.9$ Hz), 3.255 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz), 4.094 (s, 3 H), 4.450 (q, 2 H, $J = 6.9$ Hz), 4.938 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz), 6.095 (s, 2 H), 6.917 (s, 1 H), 7.599 (s, 1 H), 7.983 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 8.088 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 8.639 (s, 1 H), 9.693 (s, 1 H); ESI-MS $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClNO}_4$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 计算值为 350, 实验值为 350。

2.4 9-异丙氧基小檗碱 (1c) 的制备

将 53 mg (0.148 mmol) 小檗红碱溶于 3 mL DMF 中, 然后滴加 0.5 mL (5.503 mmol) 2-溴丙烷, 氮气保护, 60 °C 反应 8 h, 减压蒸除溶剂, 用硅胶柱 (洗脱剂: $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇}) = 10:1$) 分离提纯, 过阴离子交换树脂, 得黄色粉末 43 mg (0.1080 mmol, 产率 75%)。

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$, 300 MHz): δ_{H} 1.413 (d, 6 H, $J = 6.3$ Hz), 3.256 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz), 4.084 (s, 3 H), 4.954 (t, 2 H, $J = 6.3$ Hz), 5.106 (q, 2 H, $J = 6.3$), 6.085 (s, 2 H), 6.890 (s, 1 H), 7.561 (s, 1 H), 7.970 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 8.036 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 8.595 (s, 1 H), 9.638 (s, 1 H); ESI-MS $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ $[\text{M}-\text{Cl}]^+$: 计算值为 364, 实验值为

364。

2.5 紫外和荧光滴定实验

2.5.1 CT DNA 的摩尔吸光系数 每条核苷的摩尔吸光系数为 $6\,600\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 测定 CT DNA 溶液在 260 nm 的吸收强度, 用 L-B 定律来计算 CT DNA 的浓度。滴定 CT DNA 的浓度为 $8.548 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 。

2.5.2 紫外滴定试验 所用的药物是用 pH = 6.34, 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制, **1a**、**1b** 和 **1c** 的浓度分别为 8.05, 7.80, 8.00 $\mu\text{mol/L}$ 。取配好的药物溶液 2 mL 加入检测池, 参比池加入 2 mL 上述缓冲溶液, 然后不断往参比池加 CT DNA 和等体积的缓冲溶液, 往检测池加入等体积的 CT DNA 和等体积的药物 (此药物浓度为初始加入检测池药物浓度的 2 倍), 直至吸收强度不再变化。

2.5.3 荧光滴定实验 所用的药物是用 pH = 6.34, 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制, **1a**、**1b** 和 **1c** 的浓度分别为 2.248 1, 2.248 5, 2.336 2 $\mu\text{mol/L}$, 激发波长为 355 nm, 激发和发散光栅都为 5 nm, 室温下进行。取配好的药物溶液 21 000 μL 加入检测池, 不断加入 CT DNA、药物的混合滴定液 (在滴定液中必须保证药物的浓度与初始加入检测池的药物浓度一致), 直至荧光强度不变。

2.6 结合强度的定量分析

结合常数的计算公式为^[14]:

$$I = I_0 + \frac{\Delta I'}{2[D]_0} \left\{ ([\text{DNA}]_0 + [D]_0 + K_d) - \sqrt{([\text{DNA}]_0 + [D]_0 + K_d)^2 - 4[\text{DNA}]_0[D]_0} \right\}$$

其中, $[\text{DNA}]_0$ 代表 CT DNA 的加入浓度; $[D]_0$ 代表药物的浓度; I_0 代表未加入 CT DNA 时体系的荧光强度; I 代表加入 CT DNA 后体系的荧光强度; K_d 代表药物分子与 CT DNA 作用的解离常数, 即结合常数 K_a 的倒数。

根据上面的数据以及结合常数的计算公式, 进行非线性拟合。

参考文献:

- [1] WOLKENBERG S E, BOGER D L. Mechanisms of in situ activation of DNA targeting antitumor agents [J]. Chem Chem Rev, 2002, 102:2477.
- [2] LOWN J W. Lexitropsins: rational design of DNA sequence reading agents as novel anti-cancer agents and potential cellular probes [J]. Anti-Cancer Drug Des, 1988, 3:25.

- [3] 郑洪艳,徐为人. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 中草药, 2003, 35: 708.
ZHENG Hongyan, XU Weiren. Advance in research on pharmacology of Berberine [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2003, 35: 708.
- [4] WU H L, HSU C Y, LIU W H, et al. Berberine-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells is associated with down-regulation of nucleophosmin/B23 and telomerase activity [J]. Int J Cancer, 1999, 81: 923.
- [5] LI T K, BATHOTY E, LAVOIE E J, et al. Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: Potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions [J]. Biochemistry, 2000, 39: 7101.
- [6] MAZZINI S, BELLUCCI M C, MONDELLI R. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the double helix oligonucleotide d (AAGAATTCTT)₂ [J]. Bioorg & Med Chem, 2003, 11: 505.
- [7] KLUZA J, BAODEYRON B, COLSON P, et al. Cytotoxicity and DNA binding properties of the plant alkaloid burasaine [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 20: 383.
- [8] YADAV R C, KUMAR G S, BHADRA K, et al. Berberine, a strong polyriboadenylic acid binding plant alkaloid: spectroscopic, viscometric and thermodynamic study [J]. Bioorg & Med Chem, 2005, 13: 165.
- [9] CHEN Wenhua, PANG Jiyan, QIN Y, et al. Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 14: 2689.
- [10] PANG Jiyan, QIN Y, CHEN Wenhua, et al. Synthesis and DNA-binding affinities of monomodified berberines [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13: 5835.
- [12] PANG Jiyan, LONG Y H, CHEN Wenhua, et al. Amplification of DNA-binding affinities of protoberberine alkaloids by appended polyamines [J]. Bioorg & Med Chem Lett, 2007, 17: 1018 - 1021.
- [13] IWASA K, KIM H S, WATAYA Y, et al. Antimalarial activity and structure-activity relationships of protoberberine alkaloids [J]. Eur J Med Chem, 1998, 33: 65.
- [14] ZHEN X, GRAHAM B J, GHASSAN Q, et al. Synthesis and DNA Binding of spirocyclic model compounds related to the neocarzinostatin chromophore [J]. Org Lett, 1999, 1: 1375.

(上接第 57 页)

- [8] WANG Y Y, WANG L H, ZHU X H, et al. Efficient electroluminescent tertiary europium (III) β -diketonate complex with functional 2, 2'-bipyridine ligand [J]. Synth Met, 2007, 157: 165.
- [9] LIU Z, WEN F, LI W. Synthesis and electroluminescence properties of europium (III) complexes with new second ligands [J]. Thin Solid Films, 2005, 478: 265.
- [10] MCGEHEE M D, BERGSTEDT T, ZHANG C, et al. Narrow bandwidth luminescence from blends with energy transfer from semiconducting conjugated polymers to europium complexes [J]. Adv Mater, 1999, 11: 1349.
- [11] FANG J, MA D. Efficient red organic light-emitting devices based on a europium complex [J]. Appl Phys Lett, 2003, 83: 4041.
- [12] NAKAMURA K, HASEGAWA Y, KAWAI H, et al. Enhanced lasing properties of dissymmetric Eu (III) complex with bidentate phosphine ligands [J]. J Phys Chem: A, 2007, 111: 3029.
- [13] LI S, LU J, LIANG H, et al. Synthesis, crystal structure and properties of a Zn (II) complex with a new N, N, O-tridentate chelate ligand [J]. Inorg Chem Comm, 2008, 11: 662.
- [14] WONG T C, KOVAC J, LEE C S, et al. Transient electroluminescence measurements on electron-mobility of *N*-arylbenzimidazoles [J]. Chem Phys Lett, 2001, 334: 61.
- [15] CHEN X Y, YANG X, HOLLIDAY B J. Photoluminescent europium-containing inner sphere conducting metallopolymer [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130: 1546.
- [16] YU J, ZHOU L, ZHANG H, et al. Efficient electroluminescence from new lanthanide (Eu³⁺, Sm³⁺) complexes [J]. Inorg Chem, 2005, 44: 1611.
- [17] FERNANDES J A, SA FERREIRA R A, PILLINGER M, et al. Spectroscopic studies of europium (III) and gadolinium (III) tris- β -diketonate complexes with diazabutadiene ligands [J]. Eur J Inorg Chem, 2004, 19: 3913.