

雷公藤红素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

王鑫,周婷,陈倩虹,孙学成,李坤杰,李荣东,王福东*

(湖南中医药大学 药学院,湖南 长沙 410208)

摘要:设计、合成一系列新型雷公藤红素衍生物,并研究及衍生物体外抗肿瘤活性。以雷公藤红素为原料,经过对其 C-28 位羧基的酰胺化及 C-3 位羟基的酯化得到目标化合物 3a~3h。利用 CCK-8 法,采用人非小细胞肺癌 A549 细胞和人肝癌 HepG2 细胞对目标化合物进行体外抗肿瘤细胞增殖活性研究。利用分子对接技术对目标化合物与表皮生长因子受体 (EGFR) 蛋白的结合模式进行模拟。合成了一系列新型雷公藤红素衍生物,均是首次报道的新化合物,其结构通过 HRMS (ESI)、¹H NMR 和 ¹³C NMR 等表征分析确证。体外抗肿瘤细胞活性研究结果显示,目标化合物都表现出优于阳性对照药顺铂的抑制活性,其中 (9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-苯甲酰氧基-9,13-二甲基-29-(1-吡咯烷基)-24,25,26-三去甲齐墩果-1(10),3,5,7-四烯-2,29-二酮 (3c) 和 (9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-苯甲酰氧基-9,13-二甲基-29-(1-哌啶基)-24,25,26-三去甲齐墩果-1(10),3,5,7-四烯-2,29-二酮 (3f) 对 HepG2 细胞 (3c:IC₅₀ = 2.97 μ mol/L,3f:IC₅₀ = 3.18 μ mol/L) 和 A549 细胞 (3c:IC₅₀ = 0.57 μ mol/L,3f:IC₅₀ = 0.61 μ mol/L) 表现出显著的抑制活性。分子对接结果表明化合物 3c 和 3f 均能通过氢键和疏水作用等与 EGFR 蛋白较好的结合。合成的新型雷公藤红素衍生物结构中,活性最好的两个化合物均在 C-3 位引入了苯甲酰氧基,可推测这一结构修饰对提高雷公藤红素的抗肿瘤活性具有重要影响,值得进一步深入研究。

关键词:雷公藤红素;衍生物;合成;抗肿瘤活性;表皮生长因子受体

中图分类号:062 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2026)11--07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2026.0168

Study on Synthesis and Antitumor Activity of Celastrol Derivatives WANG Xin, ZHOU Ting, CHEN Qian-hong, SUN Xue-cheng, LI Kun-jie, LI Rong-dong, WANG Fu-dong* (The Department of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: Cancer has become a severe global public-health threat with continuously rising morbidity and mortality rates. Despite the remarkable advances in antitumor drug development, conventional clinical chemotherapeutic drugs still suffer from inherent limitations, including poor tumor selectivity, obvious toxic side effects, and frequent multidrug resistance, which severely restrict their clinical application and therapeutic efficacy. Celastrol, a naturally occurring pentacyclic triterpene derived from the medicinal plant named *Tripterygium wilfordii* Hook.f., exhibits diverse pharmacological activities. Nevertheless, its poor water solubility, rapid in vivo metabolism, and narrow therapeutic window considerably hinder its clinical transformation; thus, reasonable structural modification was required to optimize its druggability. Epidermal growth factor receptor (EGFR) was a core therapeutic target for multiple malignancies, including liver cancer and non-small cell lung cancer, whose abnormal overexpression or mutation drives tumor proliferation and metastasis; thus, it was an ideal target for antitumor drug research. In this study, several novel celastrol derivatives were designed and synthesized, and the in vitro antitumor activities of celastrol and its derivatives were examined. Celastrol was used as the starting material to synthesize target compounds 3a~3h through the amidation reaction at the 28-carboxyl group and the esterification reaction at the 3-hydroxyl group of celastrol. The in vitro antitumor activities of the target compounds were determined using a CCK-8 assay against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells and A549 human lung cancer cells. Additionally, molecular docking was performed to simulate the binding mode between the target compounds and EGFR. A series of novel celastrol derivatives were successfully synthesized and reported for the first time. The chemical structures of the synthesized compounds were characterized by performing high-resolution mass spectrometry (electrospray ionization), proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results of in vitro antitumor activity assays showed that all compounds exhibited better inhibitory abilities than the positive control, cisplatin. Compounds (9 β ,13 α ,14 β ,

收稿日期:2026-07-07;修回日期:2026-08-28;接受日期:2026-09-02

基金项目:2023 年度湖南省大学生创新创业训练计划一般项目(湘教通[2023]237 号-S202310541073)。

作者简介:王鑫(2002-),女,湖南邵阳人,硕士生,主要研究方向为新药研究与开发。

共同第一作者:周婷(2002-),女,湖南临湘人,硕士生,主要研究方向为药物化学。通讯作者:王福东, E-mail: ddwfd0101@163.com。

20 α)-3-benzoyloxy-9,13-dimethyl-29-(1-pyrrolidinyl)-24,25,26-trinoroleana-1(10),3,5,7-tetraene-2,29-dione(3c) and (9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-benzoyloxy-9,13-dimethyl-29-(1-piperidinyl)-24,25,26-trinoroleana-1(10),3,5,7-tetraene-2,29-dione(3f) exhibited prominent inhibitory activities against HepG2 cells (3c:IC₅₀ = 2.97 μ mol/L, 3f:IC₅₀ = 3.18 μ mol/L) and A549 cells (3c:IC₅₀ = 0.57 μ mol/L, 3f:IC₅₀ = 0.61 μ mol/L). Molecular-docking simulations revealed favorable binding interactions with EGFR protein formed by both 3c and 3f through hydrogen bonding, hydrophobic effects, and other noncovalent interactions. Among all the newly synthesized celastrol derivatives, the two derivatives with benzoyloxy substitution at the C-3 site exhibited the strongest antitumor activity. Such structural modification is preliminarily suggested to have played a vital role in improving the antitumor activity of celastrol, and further comprehensive research is warranted.

Key words: celastrol; derivatives; synthesis; antitumor activity; epidermal growth factor receptor

癌症严重威胁着人类的生命健康,是全世界范围内的重大公共卫生问题。根据世界卫生组织和癌症研究机构的统计数据,癌症的发病率和死亡率呈现持续上升的趋势^[1,2]。尽管近年来抗肿瘤药物研发取得了显著进展,但当前临床常用化疗药物仍普遍存在选择性差、毒副作用显著、多耐药频发等瓶颈问题,极大地限制了化疗药物的治疗效果与临床长期应用^[3]。因此,突破传统化疗药物的局限性,开发高效、低毒、作用机制明确的新型候选药物,已成为当前肿瘤药理学领域的核心研究任务与重要发展方向。

雷公藤红素(Celastrol, CEL)是从卫矛科植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook.f.)中分离得到的五环三萜类活性成分,具有显著的抗肿瘤、抗炎、神经保护等药理作用,凭借优异的生物活性被《Cell》杂志列为最具开发潜力的5种天然化合物之一,是天然抗肿瘤药物研究的热点分子^[4,5]。

表皮生长因子受体(EGFR)是调控肿瘤发生、发展、侵袭与转移的关键靶点,属于人表皮生长因子受体家族酪氨酸激酶受体,是细胞信号传导的核心枢纽^[6]。正常生理状态下,EGFR参与细胞增殖、分化、凋亡的精准调控;而在肝癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中,EGFR常发生基因突变或异常高表达,可持续过度激活下游PI3K/Akt、MAPK/ERK等增殖信号通路,诱导细胞恶性转化、异常增殖、侵袭转移及血管生成,直接推动肿瘤的发生发展与恶性进展^[7-11]。现有研究表明,雷公藤红素能通过作用于EGFR蛋白参与其癌症相关通路的调控,进而发挥抗肝癌、抗非小细胞肺癌、抗乳腺癌等广谱抗肿瘤作用,展现出良好的抗肿瘤成药潜力^[12-14]。但雷公藤红素自身存在水溶性差、体内代谢快、治疗窗窄等问题,限制了其临床转化,因此通过结构修饰优化其理化性质与药理活性,开发高效低毒

的雷公藤红素衍生物,已成为近年来该领域的研究热点。

综上,本实验以雷公藤红素为原料,经过对其C-28位羧基的酰胺化及C-3位羟基的酯化,设计合成了8个新型雷公藤红素衍生物3a~3h,其化学结构通过HRMS(ESI)、¹HNMR和¹³CNMR等表征分析确证,经Scifinder数据库系统检索,未见国内外相关文献报道,确定均为首次报道的全新结构雷公藤红素衍生物。采用CCK-8法测试目标化合物对人非小细胞肺癌A549细胞和人肝癌HepG2细胞的体外增殖抑制活性,评估其对肿瘤细胞生长的干预效果。同时,借助分子对接技术模拟化合物3c和3f与EGFR蛋白的结合模式,从分子水平初步探究其抗肿瘤作用机制。本研究为雷公藤红素的结构优化提供了新的思路,也为雷公藤红素类高效低毒抗肿瘤候选药物的进一步研发、药理机制深入研究及临床转化提供了实验基础和理论依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

UPLC-H-CLASS/XEVO G2-XS Qtof 型高分辨液质联用仪(美国Waters公司);AVANCE III HD 600 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司);N-1300 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);YRT-3 型熔点仪(天津海益达科技有限公司);ZF-2 型三用紫外仪(上海市安亭电子仪器厂);低温恒温反应浴槽、循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);MP6001 型真空干燥箱、智能磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);Multiskan MK 型多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

雷公藤红素、2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)、对甲氧基

苯胺、吗啉(安徽泽升科技股份有限公司);丙酰氯、苯甲酰氯(上海麦克林生化科技有限公司);六氢吡啶(天津市光复精细化工研究所);二氯甲烷(上海捷世凯生物科技有限公司);*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA,上海萨恩化学技术有限公司);四氢吡咯(南京艾康化工有限公司);苯胺、三乙胺(TEA)、正己烷(国药集团化学试剂有限公司);乙酸乙酯(天津市科密欧化学试剂有限公司);氯化钠(广东光华科技股份有限公司);无水硫酸钠(台山市化工厂有限公司);所用试剂均为分析纯。人非小细胞肺癌细胞株 A549(中国科学院上海细胞库);人肝癌细胞株 HepG2(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 合成方法

目标化合物的合成路线如图 1 所示:在酰胺缩合剂 HATU 的催化作用下,雷公藤红素的 28 位羧基与不同类型的胺反应得到中间体化合物 2a~2c;中间体化合物与不同的酰氯进行酯化反应生成目标化合物 3a~3h。

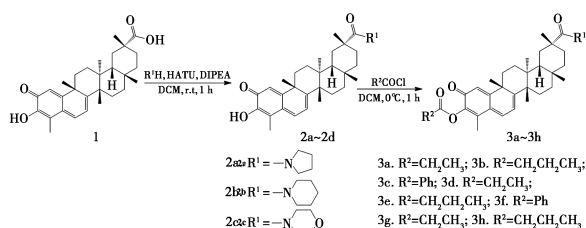


图 1 目标化合物的合成路线

Fig.1 Synthetic route of the target compounds

1.2.1 ($9\beta, 13\alpha, 14\beta, 20\alpha$)-3-羟基-9, 13-二甲基-29-(1-吡咯烷基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(2a)的制备

将 45.1 mg (0.1 mmol) 雷公藤红素 (2) 溶于 3 mL 二氯甲烷中, 加入 57.0 mg (0.15 mmol) HATU 和 52 μ L (0.3 mmol) DIPEA, 冰浴搅拌 10 min 后, 加入 12 μ L (0.12 mmol) 四氢吡咯, 室温搅拌反应, 使用薄层色谱法 (TLC) 监测反应完全 (约 1 h)。反应停止后, 加入 6 mL 二氯甲烷稀释反应混合液, 用水洗涤 3 次, 合并有机相, 用饱和氯化钠溶液洗涤后经无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩后得棕红色粘稠状粗产品。粗产品经打浆 ($V(\text{二氯甲烷}):V(\text{正己烷})=1:10$) 纯化后干燥得 37.3 mg 中间体化合物 2a。橙红色粉末状固体, 收率: 74.0%, m. p. 217.8~219.4 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS, $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{NO}_3$, 实测值 (计算值), m/z : 504.3478 (504.3478) $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

同法合成中间体化合物 2b~2c。

(9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-羟基-9,13-二甲基-29-(1-哌啶基)-24,25,26-三去甲齐墩果-1(10),3,5,7-四烯-2,29-二酮(2b):44.2 mg 橙红色粉末状固体,收率:85.2%,m.p.145.7~147.1℃。ESI-MS, C₃₄H₄₈NO₃, 实测值(计算值), *m/z*: 518.3635(518.3634) [M+H]⁺。

(9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-羟基-9,13-二甲基-29-(4-吗啉基)-24,25,26-三去甲齐墩果-1(10), 3,5,7-四烯-2,29-二酮(2c): 20.9 mg 橙红色粉末状固体, 收率: 40.2%, m. p. 132.7 ~ 136.6 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS, $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{NO}_4$, 实测值(计算值), m/z : 520.3427(520.3427) $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 。

1.2.2 (9 β ,13 α ,14 β ,20 α)-3-丙酰氧基-9,13-二甲基-29-(1-吡咯烷基)-24,25,26-三去甲齐墩果-1(10),3,5,7-四烯-2,29-二酮 (3a) 的制备

将 25.6 mg (0.05 mmol) 中间体化合物 2a 溶于 2 mL 二氯甲烷中, 冰浴下加入 14 μ L (0.1 mmol) TEA, 再缓慢滴加 1 mL (0.1 mmol) 丙酰氯的二氯甲烷溶液, 室温搅拌反应, 使用 TLC 监测反应完全 (约 1 h)。反应结束后, 加入 7 mL 二氯甲烷稀释反应混合液, 用饱和氯化钠溶液洗涤 3 次, 使用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩后, 经制备型 TLC 分离纯化 (V (乙酸乙酯): V (正己烷) = 2:1) 得到 21.8 mg 目标化合物 3a。黄色粉末状固体, 收率: 77.86%, m. p. 108.6 ~ 112.3 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 7.32 (d, 1H, J = 7.0 Hz); 6.42 (d, 1H, J = 7.2 Hz); 6.38 (s, 1H); 3.65 ~ 3.49 (m, 2H); 3.25 ~ 3.17 (m, 1H); 3.17 ~ 3.07 (m, 1H); 2.60 (qd, 2H, J = 7.5, 3.1 Hz); 2.40 (d, 1H, J = 14.6 Hz); 2.26 ~ 2.16 (m, 2H); 2.11 (s, 3H); 2.09 ~ 1.97 (m, 2H); 1.87 ~ 1.69 (m, 5H); 1.69 ~ 1.59 (m, 5H); 1.59 ~ 1.54 (m, 3H); 1.43 (s, 3H); 1.25 (s, 3H); 1.15 ~ 1.11 (m, 6H); 1.10 (s, 3H); 0.87 ~ 0.85 (m, 1H); 0.47 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 176.7, 174.7, 172.0, 171.8, 163.3, 142.7, 137.3, 134.0, 125.6, 122.5, 118.4, 48.2, 47.8, 45.3, 45.0, 42.7, 39.4, 38.5, 36.0, 33.7, 33.5, 32.2, 31.4, 30.6, 30.1, 29.8, 29.4, 28.6, 27.5, 26.9, 22.7, 22.5, 22.2, 18.3, 11.4, 9.5。ESI-MS, $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{NO}_4$, 实测值 (计算值), m/z : 560.3749 (560.3740) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

同法合成目标化合物 3b~3h。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-正丁酰氧基-9, 13-二甲基-29-(1-吡咯烷基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3b): 20.1 mg 黄色粉末状固体, 收率: 69.11%, m. p. 137.7~141.2 °C。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 7.31(d, 1H, *J* = 7.1 Hz); 6.41(d, 1H, *J* = 7.1 Hz); 6.37(s, 1H); 3.62~3.49(m, 2H); 3.26~3.17(m, 1H); 3.12~3.01(m, 1H); 2.54(qd, 2H, *J* = 7.5, 3.1 Hz); 2.39(d, 1H, *J* = 16.7 Hz); 2.24~2.17(m, 2H); 2.10(s, 3H); 2.05~1.96(m, 2H); 1.86~1.74(m, 5H); 1.67~1.60(m, 7H); 1.58~1.51(m, 3H); 1.42(s, 3H); 1.24(s, 3H); 1.14(s, 3H); 1.09(s, 3H); 0.97(t, 3H, *J* = 7.4 Hz); 0.88~0.79(m, 1H); 0.46(s, 3H)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 176.7, 174.7, 171.8, 171.1, 163.3, 142.7, 137.2, 134.0, 125.6, 122.5, 118.4, 48.2, 47.8, 45.3, 45.0, 42.7, 39.4, 38.5, 36.7, 36.0, 35.3, 33.7, 33.5, 32.2, 30.6, 30.1, 29.8, 29.4, 28.6, 27.5, 22.7, 22.6, 22.2, 18.5, 18.3, 13.8, 11.4。ESI-MS, C₃₇H₅₂NO₄, 实测值(计算值), *m/z*: 574.3896(574.3896) [M+H]⁺。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-苯甲酰氧基-9, 13-二甲基-29-(1-吡咯烷基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3c): 12.86 mg 黄色粉末状固体, 收率: 52.96%, m. p. 137.8~142.2 °C。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 8.11~8.07(m, 1H); 8.00~7.87(m, 1H); 7.79~7.72(m, 1H); 7.66~7.40(m, 2H); 7.37(d, 1H, *J* = 7.0 Hz); 6.45(d, 1H, *J* = 7.0 Hz); 6.44(s, 1H); 3.66~3.49(m, 2H); 3.25~3.22(m, 1H); 3.11~3.08(m, 1H); 2.40(d, 1H, *J* = 15.6 Hz); 2.29~2.24(m, 2H); 2.18(s, 3H); 2.08~1.99(m, 2H); 1.82~1.69(m, 5H); 1.68~1.61(m, 5H); 1.59~1.52(m, 3H); 1.46(s, 3H); 1.26(s, 3H); 1.15(s, 3H); 1.10(s, 3H); 0.86~0.81(m, 1H); 0.49(s, 3H)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 174.8, 174.8, 172.2, 167.8, 164.1, 142.9, 137.7, 134.5, 133.3, 130.3, 129.5, 129.0, 125.6, 122.5, 118.5, 48.2, 47.8, 45.4, 45.0, 42.9, 39.5, 38.5, 36.7, 36.0, 33.7, 33.5, 32.2, 30.6, 30.1, 29.9, 29.5, 28.6, 27.5, 22.7, 22.6, 22.2, 18.3, 11.6。ESI-MS, C₄₀H₅₀NO₄, 实测值(计算值), *m/z*: 608.3742(608.3740) [M+H]⁺。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-丙酰氧基-9, 13-二甲

基-29-(1-哌啶基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3d): 25.8 mg 黄色粉末状固体, 收率: 99.30%, m. p. 127.6~131.4 °C。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 7.31(d, 1H, *J* = 7.0 Hz); 6.41(d, 1H, *J* = 7.1 Hz); 6.39(s, 1H); 3.11~3.01(m, 4H); 2.60(qd, 2H, *J* = 7.8, 3.1 Hz); 2.38(d, 1H, *J* = 15.4 Hz); 2.23~2.16(m, 2H); 2.11(s, 3H); 2.05~1.95(m, 2H); 1.81~1.68(m, 5H); 1.75~1.62(m, 2H); 1.59~1.53(m, 6H); 1.51~1.46(m, 2H); 1.43(s, 3H); 1.25(s, 3H); 1.18(s, 3H); 1.13(t, 3H, *J* = 7.5 Hz); 1.10(s, 3H); 0.86~0.83(m, 1H); 0.49(s, 3H)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 176.6, 174.7, 172.0, 171.9, 163.3, 142.7, 134.0, 133.0, 125.6, 122.5, 118.5, 46.0, 45.2, 44.9, 42.7, 40.5, 38.4, 36.6, 36.1, 34.7, 33.5, 32.2, 30.8, 30.8, 30.3, 30.1, 28.7, 28.5, 27.4, 26.9, 26.0, 24.4, 22.5, 18.5, 11.4, 9.5。ESI-MS, C₃₇H₅₂NO₄, 实测值(计算值), *m/z*: 574.3901(574.3896) [M+H]⁺。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-正丁酰氧基-9, 13-二甲基-29-(1-哌啶基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3e): 27.9 mg 黄色粉末状固体, 收率: 94.56%, m. p. 116.4~119.6 °C。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 7.31(d, 1H, *J* = 6.9 Hz); 6.41(d, 1H, *J* = 7.1 Hz); 6.39(s, 1H); 3.10~3.02(m, 4H); 2.57(qd, 2H, *J* = 7.8, 3.1 Hz); 2.38(d, 1H, *J* = 12.6 Hz); 2.25~2.13(m, 2H); 2.11(s, 3H); 2.02~1.97(m, 2H); 1.75~1.66(m, 7H); 1.65~1.59(m, 2H); 1.59~1.53(m, 6H); 1.53~1.48(m, 2H); 1.43(s, 3H); 1.25(s, 3H); 1.18(s, 3H); 1.10(s, 3H); 0.98(t, 3H, *J* = 7.4 Hz); 0.87~0.81(m, 1H); 0.49(s, 3H)。¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 151 MHz), δ : 176.5, 174.7, 171.9, 171.1, 163.2, 142.7, 133.9, 125.6, 122.5, 121.6, 118.5, 45.9, 45.2, 44.9, 42.7, 40.5, 38.4, 37.0, 36.6, 36.1, 35.4, 34.7, 33.5, 32.2, 30.8, 30.8, 30.3, 30.1, 29.5, 28.7, 26.0, 24.4, 22.4, 18.5, 18.5, 13.9, 11.5。ESI-MS, C₃₈H₅₄NO₄, 实测值(计算值), *m/z*: 588.4054(588.4053) [M+H]⁺。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-苯甲酰氧基-9, 13-二甲基-29-(1-哌啶基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3f): 23.5 mg 黄色粉末状固体, 收率: 34.73%, m. p. 132.6~137.2 °C。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 600 MHz), δ : 8.12~8.07(m,

1H); 8.00~7.90 (m, 1H); 7.78~7.73 (m, 1H); 7.64~7.43 (m, 2H); 7.38 (d, 1H, $J=7.2$ Hz); 6.46 (s, 1H); 6.45 (d, 1H, $J=7.6$ Hz); 3.93~3.47 (m, 2H); 3.26~2.96 (m, 2H); 2.39 (d, 1H, $J=15.6$ Hz); 2.30~2.25 (m, 2H); 2.18 (s, 3H); 2.03~1.97 (m, 2H); 1.82~1.70 (m, 5H); 1.69~1.63 (m, 2H); 1.61~1.55 (m, 6H); 1.54~1.50 (m, 2H); 1.46 (s, 3H); 1.27 (s, 3H); 1.19 (s, 3H); 1.11 (s, 3H); 0.89~0.81 (m, 1H); 0.51 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 176.4, 174.7, 172.4, 167.8, 164.0, 142.9, 137.7, 134.5, 133.3, 130.3, 129.7, 129.5, 125.5, 122.5, 118.5, 46.2, 45.3, 44.9, 42.9, 40.5, 38.5, 37.0, 36.6, 36.1, 34.7, 33.5, 32.2, 30.8, 30.8, 30.3, 30.1, 28.7, 26.0, 24.4, 22.6, 22.5, 18.5, 11.6。ESI-MS, $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{NO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 622.3895 (622.3896) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-丙酰氧基-9, 13-二甲基-29-(4-吗啉基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3g): 13.2 mg 黄色粉末状固体, 收率: 57.39%, m. p. 122.7~126.6 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 7.32 (d, 1H, $J=7.1$ Hz); 6.43~6.40 (m, 2H); 3.53~3.50 (m, 4H); 2.61 (qd, 2H, $J=7.1, 3.1$ Hz); 2.35 (d, 1H, $J=15.8$ Hz); 2.26~2.16 (m, 2H); 2.11 (s, 3H); 2.04~1.92 (m, 2H); 1.85~1.70 (m, 5H); 1.69~1.60 (m, 2H); 1.60~1.51 (m, 4H); 1.51~1.46 (m, 2H); 1.43 (s, 3H); 1.25 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.13 (t, 3H, $J=7.5$ Hz); 1.10 (s, 3H); 0.85~0.81 (m, 1H); 0.51 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 176.7, 175.4, 172.0, 171.8, 163.3, 142.7, 137.2, 134.0, 125.7, 122.5, 118.5, 66.4 (2C), 46.1, 45.3, 44.8, 42.7, 39.5, 38.5, 37.6, 36.6, 36.0, 34.5, 33.4, 32.1, 30.8, 30.5, 30.2, 30.1, 28.6, 26.9, 22.6, 22.4, 18.7, 11.4, 9.5。ESI-MS, $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{NO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 576.3696 (576.3689) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

(9 β , 13 α , 14 β , 20 α)-3-正丁酰氧基-9, 13-二甲基-29-(4-吗啉基)-24, 25, 26-三去甲齐墩果-1(10), 3, 5, 7-四烯-2, 29-二酮(3h): 22.5 mg 黄色粉末状固体, 收率: 30.93%, m. p. 110.2~114.6 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz), δ : 7.31 (d, 1H, $J=7.1$ Hz); 6.43~6.39 (m, 2H); 3.59~3.47 (m, 4H); 2.55 (qd, 2H, $J=7.2, 3.1$ Hz); 2.35 (d, 1H,

$J=15.7$ Hz); 2.27~2.21 (m, 1H); 2.19~2.13 (m, 1H); 2.11 (s, 3H); 2.04~1.96 (m, 2H); 1.85~1.69 (m, 5H); 1.69~1.62 (m, 4H); 1.62~1.51 (m, 4H); 1.52~1.46 (m, 2H); 1.43 (s, 3H); 1.25 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.10 (s, 3H); 0.98 (t, 3H, $J=7.4$ Hz); 0.86~0.84 (m, 1H); 0.51 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 151 MHz), δ : 176.7, 175.4, 171.8, 171.1, 163.3, 142.7, 137.1, 134.0, 125.7, 122.5, 118.5, 66.5, 45.2, 44.8, 42.7, 40.5, 39.5, 38.5, 36.6, 35.9, 35.4, 34.5, 33.4, 32.1, 30.8, 30.5, 30.2, 30.1, 29.5, 28.6, 22.6, 22.4, 18.7, 18.5, 13.9, 11.5。ESI-MS, $\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{NO}_5$, 实测值(计算值), m/z : 590.3845 (590.3845) $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

1.3 体外抗肿瘤活性试验

以顺铂为阳性对照组, 设雷公藤红素、目标化合物试验组, 采用 CCK-8 法测定其对不同肿瘤细胞株 HepG2、A549 的半数抑制浓度 (IC_{50} 值), 评价其体外抗肿瘤细胞增殖活性。分别取处于对数生长期的人肝癌细胞株 HepG2、人非小细胞肺癌细胞株 A549, 胰酶消化并离心后, 加入 10 mL 完全培养基吹打均匀, 取 10 μL 进行细胞计数后, 适当稀释细胞悬液, 种于 96 孔细胞培养板中 (100 μL /孔, 细胞浓度约 10000 个/孔), 细胞板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 的恒温培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后移除旧培养基, 每孔加入 100 μL 不同浓度的测试物 (0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 48 h 后弃去孔内培养基, 每孔加入 100 μL CCK-8 工作液孵育 10 min 后, 酶标仪测定 450 nm 下的吸光度值 (OD)。本实验独立重复 3 次, 根据 OD 值, 运用公式计算细胞存活率, 再运用 Graphpad Prism 10.1.2 软件计算化合物的半数抑制浓度 (IC_{50}), 结果以平均值 $\pm$ SD 表示。

1.4 分子对接

查阅文献并从 RCSB^[15] 蛋白数据库网站 (<https://www.rcsb.org/>) 获取 EGFR 蛋白的 X 射线晶体结构 (PDB 编号为 2ITY^[16])。对接前对蛋白进行去配体、去水和加氢等操作, 采用 AutoDock-Tools 1.5.7 软件将活性较好的目标化合物 3c 和 3f 与处理后的 EGFR 蛋白进行分子对接, 本对接计算独立重复 3 次。最后通过 Pymol 软件展示和分析目标化合物与 EGFR 蛋白分子对接的具体情况, 利用 Discovery Studio 4.5 对对接结果进行可视化分析。化合物 3c 结合自由能为 -10.00

kcal/mol, 低于雷公藤红素 (-7.87 kcal/mol)。

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成

本实验以雷公藤红素为起始原料,对 C-28 位羧基进行酰胺化,同时对 C-3 位羟基进行酯化,得到一系列新型雷公藤红素衍生物 3a~3h。在 C-28 位酰胺化反应中,雷公藤红素刚性三萜骨架位阻较大,常规缩合体系副反应较多;采用 HATU 为缩合剂可有效减少副产物、提高反应选择性。吗啉酰胺类产物因极性偏大,TLC 纯化时吸附损耗显著,导致收率偏低。在 C-3 位酯化反应中,加入三乙胺作缚酸剂可以中和反应生成的氯化氢从而促进反应朝正向进行。苯甲酰氧基取代产物收率较低,主要源于苯甲酰氯亲电活性较弱,且雷公藤红素 C-3 位羟基邻位偕二甲基的空间位阻进一步阻碍了酰化反应的进行。

2.2 目标化合物的体外抗肿瘤活性

采用 CCK-8 法,选取 A549 和 HepG2 细胞测定目标化合物的体外抗肿瘤活性,结果见表 1。结果表明,8 个目标化合物对 HepG2 细胞和 A549 细胞的抗增殖活性 ($IC_{50}=0.57\sim4.66\ \mu\text{mol/L}$) 都强于阳性对照药顺铂 ($IC_{50}=22.09/7.62\ \mu\text{mol/L}$),大多数衍生物对两种癌细胞的抗增殖活性与雷公藤红素相当或更好,其中化合物 3c 和 3f 表现出最优抗肿瘤活性。通过对比 CEL 和 3a~3h 的 IC_{50} 值发现,雷公藤红素的双位点修饰仍可保留其抗肿瘤活性,且各衍生物对 A549 细胞的抑制作用 ($IC_{50}=0.57\sim1.86\ \mu\text{mol/L}$) 强于其对 HepG2

表 1 雷公藤红素及其衍生物对 HepG2、A549 细胞的 IC_{50}

Tab.1 IC_{50} of celastrol and its derivative against HepG2 and A549 cells

化合物	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	
	HepG2	A549
3a	3.59	0.96
3b	3.86	1.14
3c	2.97	0.57
3d	3.61	1.24
3e	3.59	1.86
3f	3.18	0.61
3g	4.66	1.19
3h	3.35	1.03
Cisplatin	22.09	7.62
CEL	3.55	1.07

细胞 ($IC_{50}=2.97\sim4.66\ \mu\text{mol/L}$) 的抑制作用;在雷公藤红素的 C-28 位酰胺化修饰的基础上进一步在 C-3 位羟基引入苯甲酰氧基初步提示可能是增强其抗肿瘤活性的有效策略,该结论有待进一步体内实验验证。

2.3 目标化合物与 EGFR 的分子对接

利用 AutoDockTools 1.5.7 软件将活性较好的目标化合物 3c 和 3f 与处理后的 EGFR 蛋白进行分子对接,目标化合物 3c 和 3f 与 EGFR 蛋白的结合自由能都为 -10.00 kcal/mol,显著低于雷公藤红素 (-7.87 kcal/mol),表明二者较雷公藤红素与 EGFR 蛋白具有更好的结合能力。化合物 3c 和 3f 与 EGFR 蛋白的结合模式图见图 2。如图所示,化合物 3c 与 EGFR 氨基酸残基形成 3 个氢键:C-2 位羰基氧和苯甲酰基的羰基氧与 ASP160 形成氢键;C-2 位羰基氧与 LYS50 形成氢键。化合物 3f 与 EGFR 氨基酸残基形成 2 个氢键:酰胺键的羰基氧与 HIS110 形成氢键;苯甲酰基的羰基氧与 ASP308 形成氢键。AutoDock 软件对接结果与体外抗肿瘤活性试验结果基本符合,C-3 位苯甲酰氧基可与靶蛋白的多个氨基酸残基形成多种类型作用力,因此可以推测在雷公藤红素 C-3 位引入苯甲酰氧基可以增强雷公藤红素衍生物与 EGFR 的结合作用,从而增强其抗肿瘤活性。

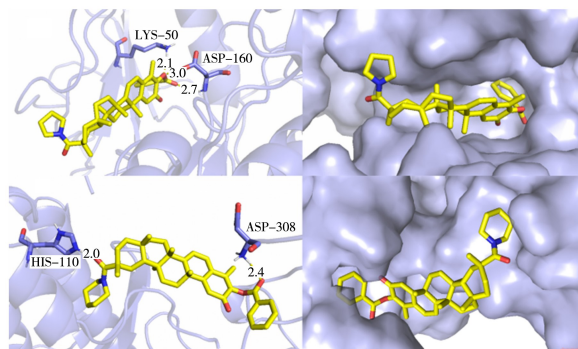


图 2 化合物 3c(a) 和 3f(b) 与 EGFR 的分子对接结果

Fig.2 Molecular docking results of compounds 3c(a) and 3f(b) with EGFR protein

3 结论

以天然产物雷公藤红素为原料,对其 C-28 位羧基和 C-3 位羟基进行结构修饰,设计合成了一系列新型雷公藤红素衍生物,并通过 HRMS (ESI)、 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 对其结构表征分析确

证。采用 CCK-8 法进行体外抗肿瘤活性测试,8 个目标化合物都具有优于阳性对照药顺铂的抗肿瘤活性,部分目标化合物具有优于雷公藤红素的抗肿瘤活性,其中化合物 3c 和 3f 的抗肿瘤活性最佳,分子对接结果显示化合物 3c 和 3f 与 EGFR 靶点能通过氢键和疏水作用等较好结合,与体外抗肿瘤试验结果基本一致。初步提示在 C-28 位羧基酰胺化修饰的基础上,在 C-3 位羟基上继续引入苯甲酰可能是增强雷公藤红素抗肿瘤活性的有效修饰策略,该结论有待进一步体内实验验证。本研究为进一步开发抗肿瘤活性好的雷公藤红素衍生物提供了实验基础和理论依据。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *CA A Cancer J. Clin.*, 2021, **71**(3):209-249.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Soerjomataram I, Jemal A. *CA A Cancer J. Clin.*, 2024, **74**(3):229-263.
- [3] Ward R A, Fawell S, Floc'h N, Flemington V, McKerrecher D, Smith P D. *Chem. Rev.*, 2021, **121**(6):3297-3351.
- [4] Ye H, Wang Y, Zhang X, Yang L, Cai B, Zhang D, Peng B. *Pharm. Biol.*, 2025, **63**(1):15-26.
- [5] Corson T W, Crews C M. *Cell*, 2007, **130**(5):769-774.
- [6] Levantini E, Maroni G, Del Re M, Tenen D G. *Semin. Cancer Biol.*, 2022, **85**:253-275.
- [7] Huppert L A, Gumusay O, Idossa D, Rugo H S. *CA A Cancer J. Clin.*, 2023, **73**(5):480-515.
- [8] Nair S, Bonner J A, Bredel M. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**(7):3818.
- [9] Costa R, Shah A N, Santa-Maria C A, Cruz M R, Mahalingam D, Carneiro B A, Chae Y K, Cristofanilli M, Gradishar W J, Giles F J. *Cancer Treat. Rev.*, 2017, **53**:111-119.
- [10] Tian X L, Gu T X, Lee M H, Dong Z G. *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer*, 2022, **1877**(1):188645.
- [11] Qiang Z Y, Wan J, Chen X Z, Wang H C. *Transl. Cancer Res.*, 2024, **13**(6):3156-3178.
- [12] Yan Y Y, Guo Y, Zhang W, Ma C G, Zhang Y X, Wang C, Wang H X. *J. Buon*, 2014, **19**(2):412-418.
- [13] Dai C H, Zhu L R, Wang Y, Tang X P, Du Y J, Chen Y C, Li J. *J. Cell. Physiol.*, 2021, **236**(6):4538-4554.
- [14] Wang C, Dai S, Zhao X T, Zhang Y F, Gong L H, Fu K, Ma C, Peng C, Li Y X. *Biomed. Pharmacother.*, 2023, **163**:114882.
- [15] Rose P W, Prlić A, Bi C X, Bluhm W F, Christie C H, Dutta S, Green R K, Goodsell D S, Westbrook J D, Woo J, Young J, Zardecki C, Berman H M, Bourne P E, Burley S K. *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**(D1):D345-D356.
- [16] Yun C H, Boggon T J, Li Y Q, Woo M S, Greulich H, Meyerson M, Eck M J. *Cancer Cell*, 2007, **11**(3):217-227.