

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.028

彭游, 郎少杰, 喻国贞, 等. 新型染料木素磺酸酯的合成及对小鼠血吸虫病肝肉芽肿的影响[J]. 广西植物, 2013, 33(6):874—877

Peng Y, Lang SJ, Yu GZ, et al. Synthesis of genistein sulfonate and its therapeutic effect on mice schistosomiasis[J]. *Guihaia*, 2013, 33(6):874—877

新型染料木素磺酸酯的合成及 对小鼠血吸虫病肝肉芽肿的影响

彭游*, 郎少杰, 喻国贞, 柏杨

(九江学院功能有机分子制备与应用九江市重点实验室, 江西九江 332005)

摘要: 为寻找抗血吸虫病的新候选化合物, 通过正交实验, 高选择性、高产率地合成了染料木素的磺酸酯衍生物。结果表明: 小鼠感染血吸虫病, 经过衍生物治疗后, 由血吸虫导致的肉芽肿面积有不同程度的降低, 其中低剂量组降低到 23.2%, 与溶剂组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 优于原药的 27.1% 及阳性对照组秋水仙碱的 27.0%。说明该化合物对血吸虫导致的肉芽肿有一定抑制作用, 该化合物有进一步研究价值。

关键词: 染料木素磺酸酯; 血吸虫病; 肉芽肿

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)06-0874-04

Synthesis of genistein sulfonate and its therapeutic effect on mice schistosomiasis

PENG You*, LANG Shao-Jie, YU Guo-Zhen, BO Yang

(Key Laboratory of Jiujiang City for Preparation and Application of Organic Functional Molecules, Jiujiang University, Jiujiang 332005, China)

Abstract: Genistein sulfonic acid ester derivative was synthesized in high yield and high selectivity through the orthogonal experiment to seek new candidate compounds for schistosomiasis. After the mice that infected with schistosomiasis were treated by the derivative, the granuloma area in mice that were led by schistosome decreased in different degrees. Among them, the low dosage group reduced to 23.2%, significant difference compared with the solvent group ($P < 0.05$), better than the parent drug 27.1% and the positive control group 27%. This compound had a certain inhibitory effect on granuloma in mice that was caused by schistosome. The mechanism may be the liver functions of mice should be improved after drug treatment.

Key words: genistein sulfonate; schistosomiasis; granuloma

血吸虫病是人类严重的寄生虫病之一, 由血吸虫虫卵导致的肉芽肿反应是血吸虫病的主要特征, 其继发肝纤维化可形成门静脉高压等严重并发症, 是血吸虫病患者死亡的主要原因。研究发现, 经杀虫药有效杀虫后, 肝组织内的虫卵肉芽肿及纤维化仍能继续发展 (Singh *et al.*, 2004; Gryseels *et al.*,

2006; 吕元庆等, 2009)。

大豆异黄酮染料木素 (Gensitein 1) 有抗癌 (Perabo *et al.*, 2008)、抗氧化 (Naghma *et al.*, 2008)、雌激素 (Huang *et al.*, 2004) 等多种功效, 由于存在体内吸收缺陷等不足, 生物利用度低而可能致药理作用弱, 至今难以在临床上有效使用。本课

收稿日期: 2013-03-23 修回日期: 2013-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(81160412); 江西省自然科学基金(2010GZN0106); 江西省教育厅科技项目(GJJ11626)

作者简介: 彭游(1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品化学与营养, (E-mail) trihydracid@126.com。

*通讯作者

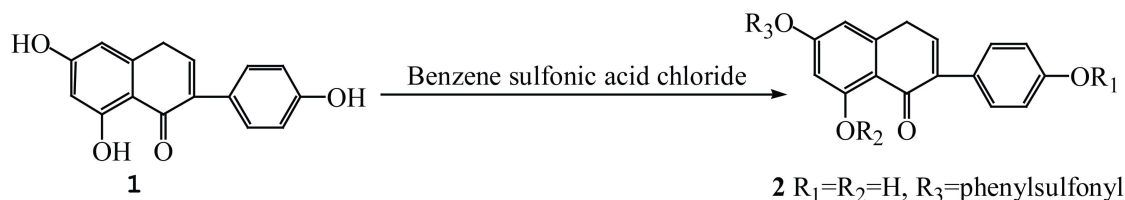


图 1 染料木素磺酸酯的合成路线

Fig. 1 Synthesis of genistein sulfonate

题组根据染料木素的药理作用与传递特性,利用前药原理进行设计合成了染料木素磺酸酯前药,对前药进行吸收机制和药物动力学研究以筛选高生物利用度的前药(Peng *et al.*, 2008, 2011, 2012)。本文主要报道优选的前药合成以及对小鼠血吸虫病治疗作用评价以及初步机制,合成路线见图 1。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

秋水仙碱:西版纳版纳药业有限责任公司 0.5 mg × 50 片,国药准字 H53021369,批号:111201。SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,6 周龄,18~22 g。PEG400(国药集团化学试剂有限公司),WRR 型数字显示显微熔点仪(北京泰克仪器有限公司),温度计未经校正;Bruker 400 M 核磁共振仪(溶剂为 CDCl₃),TMS 为内标;Yanaco MT-3CHN 元素分析仪;Agilent 6410M 质谱仪;Bruker TEN-SOR27 红外光谱仪。染料木素(纯度>98%)购于陕西慧科植物开发有限公司,其它试剂均为化学纯或分析纯。

1.2 染料木素磺酸酯的合成

3-(4'-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-phenylsulfonyl-4H-chromen-4-one **2**, 新型染料木素磺酸酯(GBS)由本实验室首次合成(Peng *et al.*, 2008),染料木素 2.7 g(10 mmol)、1 mL 三乙胺和无水 THF 在冰水混合物冷却下搅拌,在 15 min 内苯磺酰氯 2 mL 滴加到反应液中,反应持续 1 h 后停止。将反应混合物萃取,减压蒸去溶剂得粗产物,柱层析纯化得白色固体(2.05 g, 50%)。m. p. 154~156 °C。m/z(EI)411.08(M⁺+1, 100%)。¹H NMR (CDCl₃) δ: 12.7 (s, 1H, 5-OH) 7.94 (s, 1H, 2-H), 7.90 (d, 2H, 2'', 6''-benH, J=7.7 Hz), 7.72 (t, 1H, 4''-H, J=7.5 Hz), 7.59 (t, 2H, 3'', 5''-benH, J=7.7 Hz),

7.39 (d, 2H, 2', 6'-ArH, J=8.5 Hz), 6.90 (d, 2H, 3', 5'-ArH, J=8.5 Hz), 6.77 (d, 1H, 8-ArH, J=2.0 Hz), 6.39 (d, 1H, 6-ArH, J=2.0 Hz), 5.39 (s, 1H, 4'-OH)。m/z(EI)411.08(M⁺+1, 100%)。

1.3 小鼠血吸虫病治疗实验

1.3.1 溶液配制 精密称量染料木素磺酸酯 100 mg,加 0.2 mL DMSO,超声溶解,加 9.8 mL PEG400,混匀,即得浓度为 10 mg · mL⁻¹的被试药储备溶液,该溶液现用现配。精密称量染料木素 100 mg,依前法配制成 10 mg · mL⁻¹的染料木素原药被试药溶液。将秋水仙碱药片 1 片研细粉,超声分散在 50 mL PRG400 中,配制成 0.01 mg · mL⁻¹的阳性对照品溶液。

1.3.2 模型制备 将钉螺孵育后逸出的日本血吸虫尾蚴,以盖玻片法经小鼠腹部皮肤攻击感染,总计感染 40 只 Balb/c 小鼠,每只小鼠感染(30±2)条日本血吸虫尾蚴。

1.3.3 实验给药方案 小鼠造模 42 d 后,按体重分层随机分为 6 组:高剂量组(GBS 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)、中剂量组(GBS 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)、低剂量组(GBS 25 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)、阳性对照组(秋水仙碱 0.1 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)和溶剂组,每组 5 只,另 1 组未感染。继续饲养 4 周后给药,实验期间每天灌胃一次,连续灌胃 2 周。(1)实验用药组:高剂量组(PG):100 mg · kg⁻¹(小鼠体重),每只小鼠灌胃 0.2 mL 左右;中剂量组(PZ):50 mg · kg⁻¹,取被试药溶液用 PEG400 稀释,每只小鼠灌胃 0.2 mL 左右;低剂量组(PD):25 mg · kg⁻¹,取被试药溶液用 PEG400 稀释,每只小鼠灌胃 0.2 mL。(2)原料药组(PY):按小鼠体重 150 mg · kg⁻¹ 剂量灌胃染料木素原药被试药溶液。(3)阳性药组:秋水仙碱组(PQ),小鼠体重 0.1 mg · kg⁻¹ 灌胃。(4)溶剂组(PR),0.2 mL DMSO,加 9.8 mL PEG400,混匀,每只小鼠灌胃 0.2 mL。(5)未感染组(PM)未感染日本血吸虫,也未灌胃。

1.3.4 治疗作用评价 灌胃结束后,剖杀小鼠,摘眼球取血,收集日本血吸虫成虫,取肝脾。虫卵计数;测量肝功能指标:谷丙转氨酶 ALT 及谷草转氨酶 AST;测量肉芽肿面积及肝脏面积,统计分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计分析软件进行数据处理。实验数据均以“.x ± s”表示,多组比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 染料木素磺酸酯(GBS)合成工艺优化

染料木素有三个羟基,其活性差别不大,可以通过改变反应时间,反应配料比,以及溶剂与催化剂的比值来高区域选择性合成目标产物 2。

反应物染料木素的物质的量为 0.27 g 时,反应温度为 0 °C(冰水混合物冷却)条件下,考察生成目标产物 2 的反应时间 t、反应物配比 n、溶剂与催化剂的比值(v/v)三因素的最佳条件。正交实验方案及结果见表 1。

表 1 正交实验方案及结果

Table 1 Orthogonal experiment design and results

编号 Code	时间 Time (min)	反应物配比 Proportion of reactant	溶剂/催化剂 Catalyst	产率 Production rate (%)
1	20	3	4	67.4
2	20	3.9	5	40.7
3	20	5.4	3	49.4
4	54	3	5	58.2
5	54	3.9	3	57.4
6	54	5.4	4	43.7
7	87	3	3	61.4
8	87	3.9	4	45.6
9	87	5.4	5	49.3
K1	52.5	62.3	52.3	
K2	53.1	47.9	49.4	
K3	52.1	47.5	56.1	
R	1	15	7	

实验结果表明,反应物配比是产率的主要影响因素,其次为溶剂与催化剂的比值。最佳水平为 A₂B₁C₃,在该条件下产率可能最高。

2.2 治疗作用

实验结果表明,用药组与溶剂对照组比较,成虫数与虫卵数无统计学意义,谷丙转氨酶 ALT 及谷草转氨酶 AST 值也无统计学意义。对于肉芽肿/肝脏面积测定,用药组与溶剂对照组比较,有统计学有意义,肉芽肿/肝脏面积测定值见表 2。完成实验后

小鼠的肝脏的电镜图片见图 2。

表 2 肉芽肿/肝脏面积测定值

Table 2 Determination of the value of granuloma area/liver area

	Mean	Std. Deviation	Std. Error
高剂量 High-dose	0.2388 ^{a**b}	0.03285	0.01341
中剂量 Mid-dose	0.2996	0.02871	0.01085
低剂量 Low-dose	0.2321 ^{a**b}	0.06670	0.02521
原料药 Crude drug	0.2713 ^{**b}	0.02843	0.01421
秋水仙碱 Colchicine	0.2702 ^{**b}	0.06683	0.02989
溶剂 Catalyst	0.3647	0.02223	0.01284
Total	0.2714	0.05878	0.01039

^{a*}: 与中剂量比较,差异显著(P<0.05);^{b*}: 与溶剂组比较,差异显著(P<0.05)。

由表 2 及图 2 可以看出,小鼠感染血吸虫病后,出现较大范围的肉芽肿面积,达 36.5%。而经过药物治疗后,有不同程度的降低,其中低剂量组降低到 23.2%,原药降低到 27.1%。表明经过修饰后,药物对小鼠血吸虫引起的肉芽肿的抑制作用明显提高。因为中剂量治疗组与对照组比较没有统计学差异,可能是个别小鼠的差异,也可能是实验操作的不稳定性或是其他什么原因。

3 结论

虽然该药物没有直接杀血吸虫的作用以及对血吸虫导致的肝脏细胞损害没有明显的减轻作用,但对血吸虫导致的肉芽肿有较强的抑制作用。高剂量和低剂量用药组与对照组的结果比较,药物是有作用的,统计学有意义。另外,药物对血吸虫肉芽肿炎症有抑制作用,应该是肝脏功能(酶学指标)经药物治疗后有所好转。诸多不确定因素在影响着该药物对血吸虫导致肉芽肿的治疗作用。其抗血吸虫病有进一步研究价值。

致谢 本论文的动物实验部分得到了安徽医科大学沈际佳课题组的大力支持。

参考文献:

- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, et al. 2006. Human schistosomiasis[J]. *Lancet*, **368**(9451): 1 106—18
- Huang J(黄进), Luo Q,(罗琼) Li XL(李晓莉), et al. 2004. Hyperglycemia lowering effect of soybean isoflavone(SI) on alloxan-induced diabetic mice (大豆异黄酮的降血糖活性研

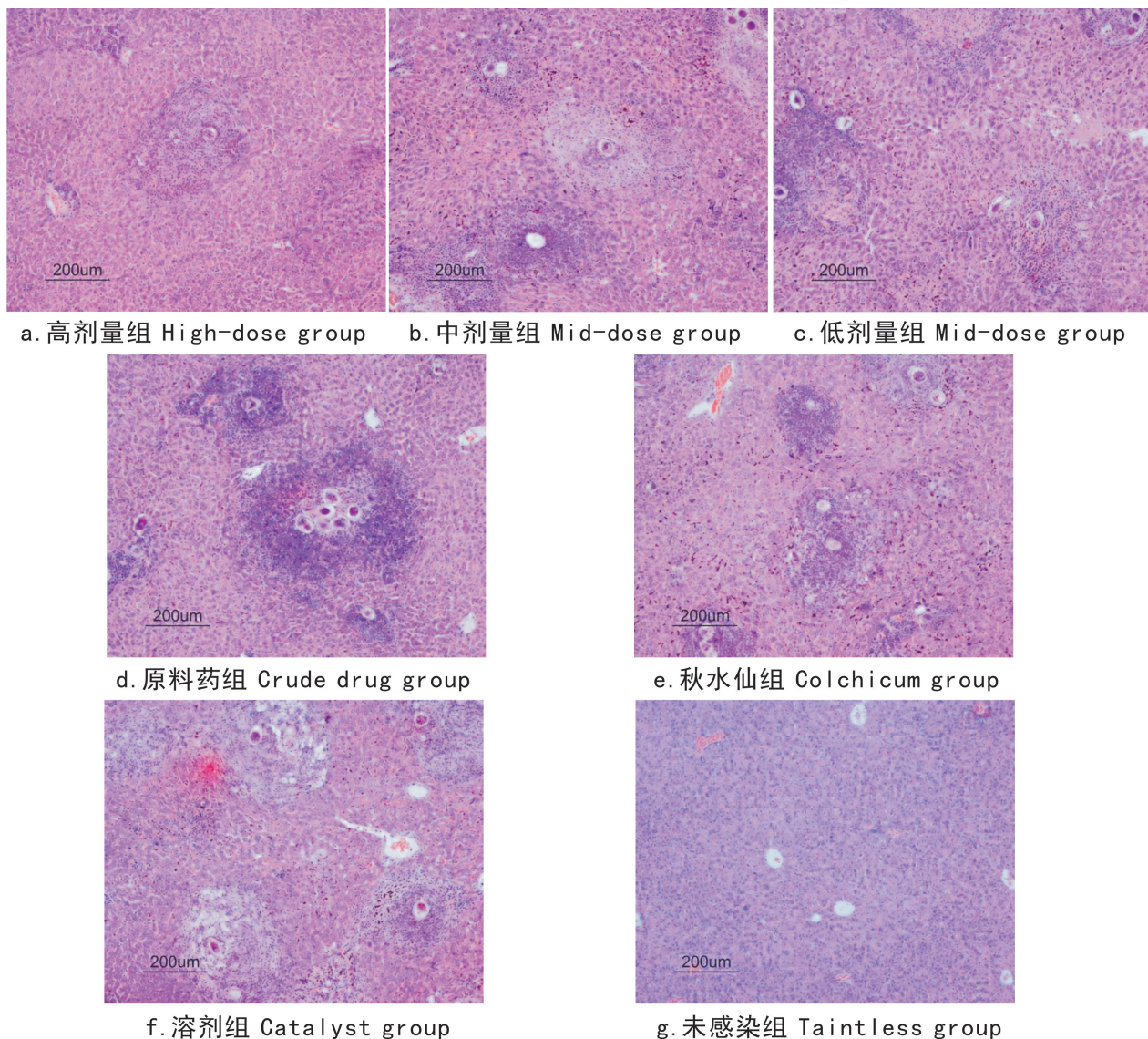


图 2 小鼠的肝脏的电镜图

Fig. 2 Electron micrographs of mouse liver

- 究[J]. *Food Sci*(食品科学), **25**(1):166-170
- Li YQ(吕元庆), Chen FH(陈飞虎), Shen JJ(沈际佳), *et al.* 2009. Effect of total flavones *Bidens Pilosa* L. on the expression of α 2SMA, TGF β 1 and the metabolism of collagen in liver tissues of mice infected with *Schistosoma japonicum* (鬼针草总黄酮对小鼠日本血吸虫病肝纤维化 α 2SMA、TGF β 1 及胶原代谢的影响)[J]. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), **44**(1):80-84
- Naghma K, Farrukh A, Hasan M. 2008. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants progress and promise[J]. *Antiox Red Sign*, **10**(3):475-510
- Peng Y, Deng ZY, Lang SJ, *et al.* 2008. Preparation and crystal structure of genistein Benzensulfonate prodrugs[J]. *J Chem Res*, **10**:555-558
- Peng Y, Gan LJ, Deng ZY. 2011. Preparation, crystal structure and prodrug studies of genistein Benzensulfonate[J]. *Lat Am J Pharm*, **30**(7):1 449-1 453
- Peng Y, Hu JN, Deng ZY, *et al.* 2011. Oral bioavailability of novel genistein sulfonates and their pre-clinical pharmacokinetics[J]. *Lat Am J Pharm*, **30**(8):1 582-1 589
- Peng Y, Tao CY, Deng ZY. 2012. Pre-clinical pharmacokinetics of novel soybean isoflavone sulfonate[J]. *Guihaia* (广西植物), **32**(3):392-399
- Perabo FGE, Von Löw EC, Ellinger J, *et al.* 2008. Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer[J]. *Prost Can Prost Dis*, **11**(1):6-12
- Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, *et al.* 2004. Expression of matrix metal loproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel treated mice [J]. *Immune*, **111**(3):343-52