

新型10-羟基喜树碱前药分子的制备与性能研究

蔡丽娟, 朱金丽, 汤艳峰, 孙广平*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2022年8月2日; 录用日期: 2022年8月12日; 发布日期: 2022年8月23日

摘 要

本文以10-羟基喜树碱(HCPT, 10-Hydroxycamptothecin)作为前药分子, 通过2,4-二硝基苯磺酰氯(DNS)的取代反应, 成功构筑了一种具有荧光探针性能的喜树碱前药分子(DNS-HCPT)。荧光试验表明DNS-HCPT在谷胱甘肽(GSH)的作用下, 能将前药分子HCPT快速地释放出来, 发射出很强的黄色荧光, 可用于肿瘤组织的追踪与识别。此外, HCPT作为喜树碱衍生物中抗癌效果最好之一, DNS-HCPT释放的HCPT还能被用于癌细胞的治疗, 在癌细胞的诊断与治疗中具有潜在的应用价值。

关键词

10-羟基喜树碱前药分子, GSH刺激响应, 荧光

The Preparation and Investigation of a Novel 10-Hydroxycamptothecin Prodrug

Lijuan Cai, Jinli Zhu, Yanfeng Tang, Guangping Sun*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Aug. 2nd, 2022; accepted: Aug. 12th, 2022; published: Aug. 23rd, 2022

Abstract

Prodrug DNS-HCPT was successfully prepared via the substitution reaction of 10-hydroxycampto-

*通讯作者。

文章引用: 蔡丽娟, 朱金丽, 汤艳峰, 孙广平. 新型 10-羟基喜树碱前药分子的制备与性能研究[J]. 分析化学进展, 2022, 12(3): 232-239. DOI: 10.12677/aac.2022.123029

thecin (HCPT) and 2,4-dinitrobenzenesulfonyl chloride (DNS), which could be used as a fluorescent probe. HCPT could be effectively released under glutathione (GSH) condition and realized strong yellow fluorescence emission, suggesting potential in tracking tumor tissues. Moreover, as one of the most effective anticancer camptothecin derivatives, the released HCPT could be utilized for cancer therapy, which was potential in cancer diagnosis and therapy.

Keywords

10-Hydroxycamptothecin Prodrug, GSH Stimulus Response, Fluorescence

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

癌症作为人类健康的重大威胁之一, 对人们的身心健康产生了重大影响。为了克服癌症带来的危害, 人们采用各种方法对其进行研究探索[1] [2] [3]。前药策略, 因其能够显著提高化疗药物的药代能力、药性和药效特性, 在癌症治疗中获得了更多的关注[4]-[9]。尤其是将具有刺激响应性能的控制单元修饰到前药上, 不仅能显著提高药物的载药效率, 还能获得具有肿瘤微环境响应性能的前药系统, 智能释放抗癌药物, 实现癌细胞治疗效果[10] [11] [12] [13] [14]。与正常的组织细胞不同, 肿瘤组织具有独特的物理化学特性, 比如肿瘤细胞内具有较高浓度的过氧化氢, 这主要是由于细胞内氧化还原动态失衡, 从而导致细胞出现氧化应激态, 过度产生活性氧(ROS), 其浓度远高于正常细胞(约 100 倍), 高浓度的 ROS 会导致细胞的永久死亡[7] [15]。值得注意的是, 为了维持细胞内氧化还原的稳定, 即使是癌细胞也会产生更多的谷胱甘肽(GSH, 内源性三肽)作为抗氧化剂来清除活性氧以避免氧化失衡[7] [15]。由于高浓度的 ROS, 癌细胞内的 GSH 浓度也相应的高出正常细胞 7~10 倍[15]。此外, 研究表明, GSH 不仅参与癌细胞的分裂增殖, 还对细胞的多种生物过程起到至关重要的作用, 比如: 外源性物质的解毒过程与细胞的周期进程[7]。因此, 利用癌细胞内高浓度的 GSH 设计具有 GSH 响应性能的调控单元在癌症治疗中具有潜在的应用价值。

喜树碱作为一种天然抗癌药物, 其衍生物已被广泛应用于各种癌细胞治疗。10-羟基喜树碱(HCPT, 10-Hydroxycamptothecin)抗癌机制与喜树碱相似, 被认为是喜树碱衍生物中抗癌效果最好之一, 其主要通过抑制拓扑异构酶来缓解 DNA 的扭转[7] [16]。由于 HCPT 具有很强的荧光发射能力, 因此, 我们认为基于 HCPT 构筑具有 GSH 响应机制的前药分子不仅能通过 HCPT 的 GSH 刺激响应性荧光指示肿瘤组织的位置, 实时追踪药物释放过程, 还能作为前药分子, 显著提高载药效率, 实现癌细胞的有效治疗。

为此, 我们通过取代反应设计合成了具有 GSH 响应性能的 HCPT 前药分子(DNS-HCPT)。在前药分子 DNS-HCPT 中, 2,4-二硝基苯磺酰基(DNS)通过取代反应与 HCPT 共价相连, 且由于 DNS 的吸电子效应致使 HCPT 自身荧光发生猝灭, 但是在高浓度的 GSH 作用下, DNS 会发生分子内重排并从 DNS-HCPT 上脱离, 将 HCPT 释放出来, 此时的 HCPT 不仅能高效治疗肿瘤组织, 还能通过自身的荧光实现肿瘤组织的定位与诊断。GSH 刺激响应释放结果表明, DNS-HCPT 前药分子不仅能有效释放前药 HCPT 用于治疗癌细胞, 其 GSH 响应后的荧光变化还可用于追踪药物释放过程及肿瘤位置, 在肿瘤治疗与诊断中具有潜在价值(图 1)。

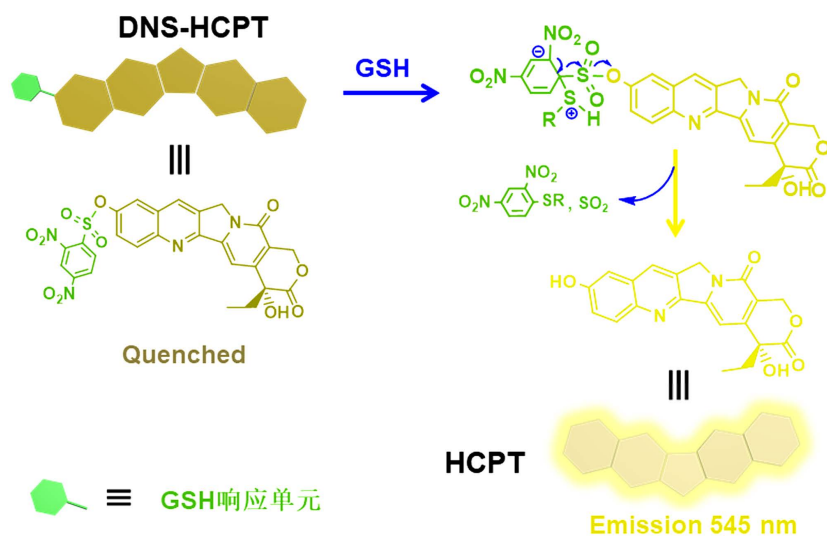


Figure 1. GSH responsive illustration of 10-hydroxycamptothecin prodrug (DNS-HCPT)
图 1. 10-羟基喜树碱前药分子(DNS-HCPT)的 GSH 响应示意图

2. 实验部分

2.1. 试剂与仪器

10-羟基喜树碱(HCPT, 99%)、2,4-二硝基苯磺酰氯(DNS, 98%), 安耐吉化学; 三乙胺(TEA)、碳酸氢钠、无水硫酸钠、二氯甲烷(DCM)、石油醚(PE)、乙酸乙酯(EA), 分析纯, 南京化学试剂有限公司; 薄层层析硅胶, 300~400 目, 山东青岛海洋。

Bruker 400 MHz 核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; Hitachi F-7000 荧光光谱仪, 日本日立公司; IKA RV 10 旋转蒸发仪, 德国 IKA 公司; WFH-203B 暗箱台式三用紫外分析仪, 上海精密仪器仪表有限公司。

2.2. 10-羟基喜树碱前药分子(DNS-HCPT)的合成

合成路线如图 2 所示:

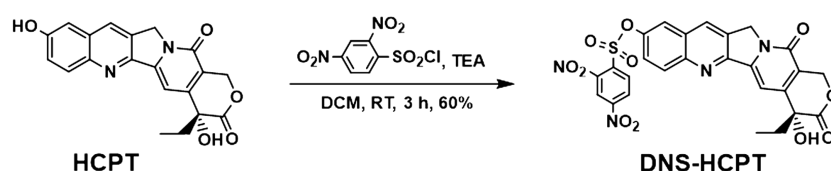


Figure 2. Synthesis route of DNS-HCPT
图 2. DNS-HCPT 的合成路线

将 10-羟基喜树碱(0.93 g, 2.55 mmol)溶解在 100 mL 的二氯甲烷中, 加入 0.8 g 的三乙胺, 冰浴降温 20 min, 接着将溶有 2,4-二硝基苯磺酰氯(0.8 g, 3 mmol)的 50 mL 二氯甲烷恒压滴加至反应液中, 滴加时间超过 1.5 h, 滴加结束, 继续搅拌反应 3 h。反应结束, 反应液用饱和碳酸氢钠洗涤三次, 收集有机相, 用无水硫酸钠干燥过夜。过滤收集滤液, 直接硅胶拌样, 以石油醚/乙酸乙酯(v/v = 1:3)作为流动相, 通过柱层析纯化得黄色固体产物 DNS-HCPT (0.91 g, 1.53 mmol, 60%)。

2.3. 10-羟基喜树碱前药分子(DNS-HCPT)的核磁测试

在纯化得到目标产物 DNS-HCPT 后, 以 DMSO- d_6 作为溶剂, 通过 Bruker 400 MHz 核磁共振仪对

DNS-HCPT 的氢谱、碳谱进行检测分析(图 3 和图 4), 数据和图如下: ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) δ (ppm): 9.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.58 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 1.86~1.81 (m, 2H), 0.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) δ (ppm): 172.9, 157.2, 154.3, 152.1, 150.4, 148.7, 147.1, 147.0, 145.5, 134.2, 132.3, 132.3, 131.5, 131.0, 128.7, 128.0, 125.3, 121.7, 121.1, 120.1, 97.6, 72.8, 65.7, 50.7, 30.7, 8.2.

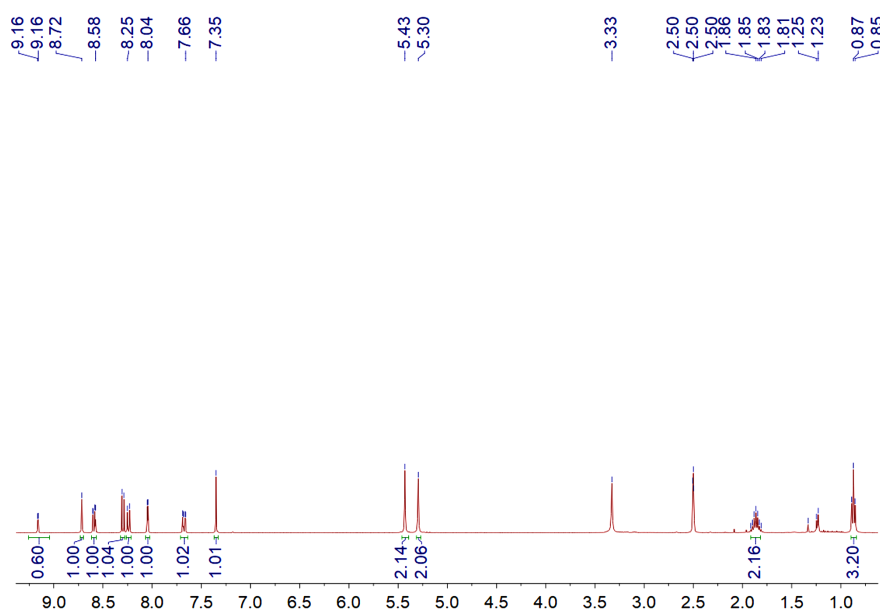


Figure 3. ^1H NMR spectrum (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) of DNS-HCPT

图 3. DNS-HCPT 的氢谱(400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K)

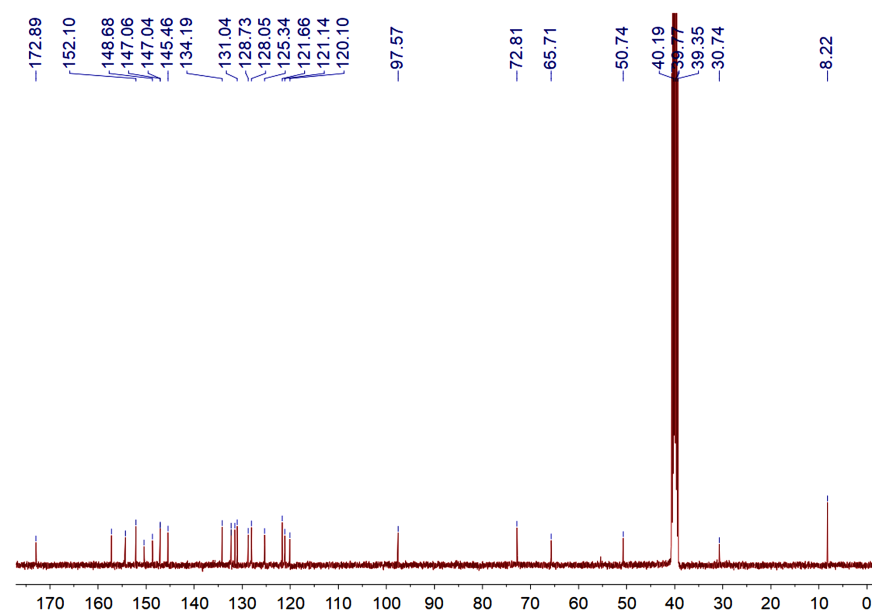


Figure 4. ^{13}C NMR spectrum (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K) of DNS-HCPT

图 4. DNS-HCPT 的碳谱(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 298 K)

3. 结果与讨论

3.1. DNS-HCPT 的 GSH 刺激响应性研究

根据相关文献报道[17] [18], 前药分子 DNS-HCPT 中的 2,4-二硝基苯磺酰基(DNS)部分对 GSH 具有显著的刺激响应性, 可以使 DNS-HCPT 中的 DNS 重排离去, 接下来首先对 DNS-HCPT 的 GSH 刺激响应性进行研究。

首先, 配制 0.2 mM 的 DNS-HCPT 水溶液(含少量 DMSO 助溶), 通过荧光光谱检测发现几乎没有荧光信号, 此时在 365 nm 激发下也观察不到任何荧光, 说明此时前药分子 DNS-HCPT 非常稳定, HCPT 不能被释放出来(图 5 和图 6)。然而, 当向 DNS-HCPT 溶液中加入 0.2 mM 的 GSH 溶液后, 1 min 后可以检测到荧光强度为 828 (545 nm 处), 说明 HCPT 被释放出来了, 并且随着时间的增加, 荧光强度越来越强, 8 min 后甚至可以达到 2288 (545 nm 处), 说明前药分子 DNS-HCPT 具有明显的 GSH 刺激响应性(图 5)。

更为重要的是, 通过 8 min 的 GSH 刺激响应释放, 我们可以观察到显著的黄色荧光, 说明大部分前药 HCPT 被释放出来了, 相较于 GSH 刺激响应释放前, 荧光强度足足提高了 48 倍(图 6)。上述荧光实验表明前药分子 DNS-HCPT 不仅具有显著的 GSH 刺激响应性能, 其释放的前药分子 HCPT 还能够被用于追踪识别肿瘤组织的高浓度 GSH 环境, 同时对癌细胞进行治疗, 在肿瘤的诊治结合中具有潜在的价值。

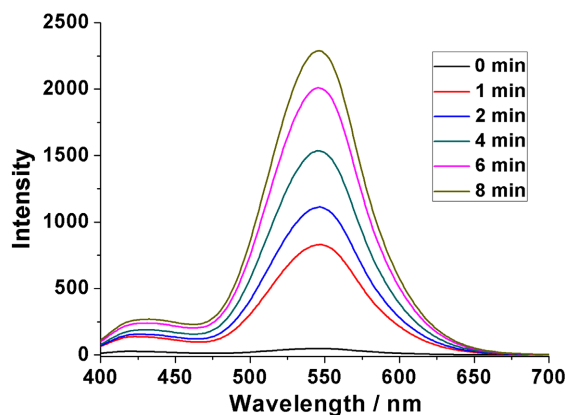


Figure 5. Fluorescence spectra of DNS-HCPT (0.2 mM) with GSH (0.2 mM) in different time
图 5. DNS-HCPT (0.2 mM)在 GSH (0.2 mM)作用下不同时间段的荧光图谱

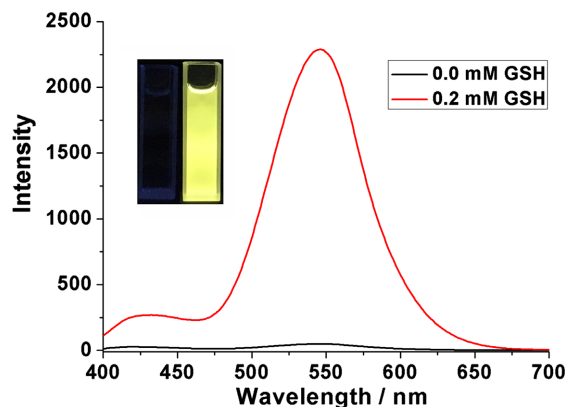


Figure 6. Fluorescence spectra of DNS-HCPT (0.2 mM) with 0.0 and 0.2 mM GSH
图 6. DNS-HCPT (0.2 mM)在 0.0 和 0.2 mM GSH 作用下的荧光图谱

3.2. DNS-HCPT 的释放研究

在确定前药分子 DNS-HCPT 的 GSH 刺激响应性能后,接着对 DNS-HCPT (0.2 mM)的 GSH 刺激响应释放进行了深入研究。如图 7 所示,在没有 GSH 的情况下,前药分子 DNS-HCPT 能够一直保持稳定,几乎没有任何的 HCPT 荧光信号能够被检测到。然而,当加入 0.1 mM 的 GSH 后,可以发现 HCPT 的荧光信号显著增强,随着时间的增加逐渐达到平衡,说明 DNS-HCPT 在 GSH 的作用下成功地释放出了前药分子 HCPT。值得注意的是,随着 GSH 浓度从 0.1 mM 增加到 0.2 mM 和 0.5 mM,HCPT 的释放量也显著地从 48%增加到了 80%和 90%,说明该前药分子具有很好的 GSH 刺激响应性能。这些释放结果说明,DNS-HCPT 不仅具有显著的 GSH 刺激响应性能,在高浓度 GSH 下还能高效地释放前药分子 HCPT,在癌细胞的诊治中具有重要价值。

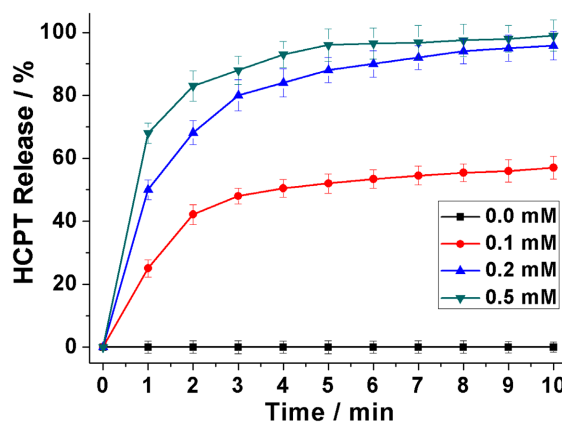


Figure 7. Time-dependent HCPT release at different GSH concentrations

图 7. DNS-HCPT (0.2 mM)在不同 GSH 浓度下的释放曲线

3.3. DNS-HCPT 的释放机理研究

谷胱甘肽(GSH)是一种谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸形成的含有巯基的三肽(R-SH)。文献表明[5] [7] [8],当加入 GSH 后, R-SH 中的巯基会进攻 DNS, 发生取代反应, 同时 DNS 中的磺酰基会进行重排, 最终以 SO_2 的形式离去, 而 GSH 通过巯基最终被修饰到磺酰基的位置, 从而把前药 HCPT 给释放出来, 实现 GSH 的刺激响应释放(图 8)。

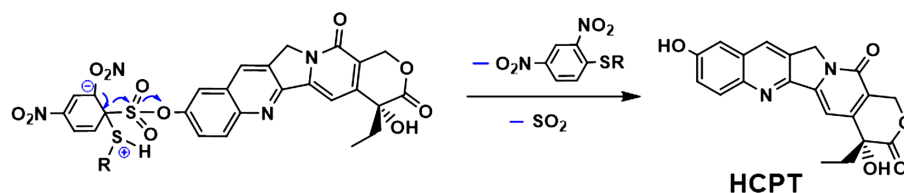


Figure 8. GSH release mechanism of DNS-HCPT

图 8. DNS-HCPT 的 GSH 释放机理

4. 结论

我们以 10-羟基喜树碱(HCPT, 10-Hydroxycamptothecin)作为前药分子, 通过取代反应在 HCPT 的 10-羟基位置成功修饰了 2,4-二硝基苯磺酰基(DNS),得到了具有诊治结合功能的喜树碱前药分子(DNS-HCPT)。由于 DNS 的分子内抑制作用, 前药分子 DNS-HCPT 不发射荧光, 但是在谷胱甘肽(GSH)的作用下, DNS-

HCPT 不仅能将前药分子 HCPT 快速地释放出来, 其释放的 HCPT 还能发射出很强的黄色荧光, 这样显著的荧光变化可被用于肿瘤组织的追踪与识别。更为重要的是, HCPT 作为喜树碱衍生物中抗癌效果最好之一, DNS-HCPT 释放的 HCPT 还能被用于癌细胞的治疗。因此, 该前药分子 DNS-HCPT 在癌细胞的诊断与治疗中具有潜在的应用价值。

基金项目

本项目由国家自然科学基金(No. 22075152)支持。

参考文献

- [1] Ahles, T.A. and Root, J.C. (2018) Cognitive Effects of Cancer and Cancer Treatments. *Annual Review of Clinical Psychology*, **14**, 425-451. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050817-084903>
- [2] Qin, S.Y., Zhang, A.Q., Cheng, S.X., et al. (2017) Drug Self-Delivery Systems for Cancer Therapy. *Biomaterials*, **112**, 234-247. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.016>
- [3] He, Q. and Shi, J. (2014) MSN Anti-Cancer Nanomedicines: Chemotherapy Enhancement, Overcoming of Drug Resistance, and Metastasis Inhibition. *Advanced Materials*, **26**, 391-411. <https://doi.org/10.1002/adma.201303123>
- [4] Hu, X.Y., Gao, L., Mosel, S., et al. (2018) From Supramolecular Vesicles to Micelles: Controllable Construction of Tumor-Targeting Nanocarriers-Based on Host-Guest Interaction between a Pillar[5]arene-Based Prodrug and a RGD-Sulfonate Guest. *Small*, **14**, 1803952-1803962. <https://doi.org/10.1002/smll.201803952>
- [5] Liu, X., Shao, W., Zheng, Y., et al. (2017) GSH-Responsive supramolecular Nanoparticles Constructed by β -D-Galactose-Modified Pillar[5]arene and Camptothecin Prodrug for Targeted Anticancer Drug Delivery. *Chemical Communications*, **53**, 8596-8599. <https://doi.org/10.1039/C7CC04932C>
- [6] Zhang, Y.H., Zhang, Y.M., Sheng, X., et al. (2020) Enzyme-Responsive Fluorescent Camptothecin Prodrug/Poly-saccharide Supramolecular Assembly for Targeted Cellular Imaging and *in Situ* Controlled Drug Release. *Chemical Communications*, **56**, 1042-1045. <https://doi.org/10.1039/C9CC08491F>
- [7] Whang, C.H., Yoo, E., Hur, S.K., et al. (2018) A Highly GSH-Sensitive SN-38 Prodrug with an "OFF-to-ON" Fluorescence Switch as a Bifunctional Anticancer Agent. *Chemical Communications*, **54**, 9031-9034. <https://doi.org/10.1039/C8CC05010D>
- [8] Sun, G., He, Z., Hao, M., et al. (2019) Bifunctional Supramolecular Prodrug Vesicles Constructed from a Camptothecin Derivative with a Water-Soluble Pillar[5]arene for Cancer Diagnosis and Therapy. *Chemical Communications*, **55**, 10892-10895. <https://doi.org/10.1039/C9CC05859A>
- [9] Zou, H., Liu, J., Li, Y., et al. (2018) Cucurbit[8]uril-Based Polymers and Polymer Materials. *Small*, **14**, 1802234-1802252. <https://doi.org/10.1002/smll.201802234>
- [10] Ding, Y.F., Wei, J., Li, S., et al. (2019) Host-Guest Interactions Initiated Supramolecular Chitosan Nanogels for Selective Intracellular Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **11**, 28665-28670. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09059>
- [11] Feng, W., Jin, M., Yang, K., et al. (2018) Supramolecular Delivery Systems Based on Pillararenes. *Chemical Communications*, **54**, 13626-13640. <https://doi.org/10.1039/C8CC08252A>
- [12] Zhang, Y.M., Zhang, N.Y., Xiao, K., et al. (2018) Photo-Controlled Reversible Microtubule Assembly Mediated by Paclitaxel-Modified Cyclodextrin. *Angewandte Chemie International Edition*, **57**, 8649-8653. <https://doi.org/10.1002/anie.201804620>
- [13] Wu, D., Li, Y., Shen, J., et al. (2018) Supramolecular Chemotherapeutic Drug Constructed from Pillararene-Based Supramolecular Amphiphile. *Chemical Communications*, **54**, 8198-8201. <https://doi.org/10.1039/C8CC04334E>
- [14] Yu, G., Yu, W., Mao, Z., et al. (2015) A Pillararene-Based Ternary Drug-Delivery System with Photocontrolled Anticancer Drug Release. *Small*, **11**, 919-925. <https://doi.org/10.1002/smll.201402236>
- [15] Luo, C., Sun, J., Liu, D., et al. (2016) Self-Assembled Redox Dual-Responsive Prodrug-Nanosystem Formed by Single Thioether-Bridged Paclitaxel-Fatty Acid Conjugate for Cancer Chemotherapy. *Nano Letters*, **16**, 5401-5408. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b01632>
- [16] Cai, Y., Shen, H., Zhan, J., et al. (2017) Supramolecular "Trojan Horse" for Nuclear Delivery of Dual Anticancer Drugs. *Journal of the American Chemical Society*, **139**, 2876-2879. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b12322>
- [17] Mori, M., Fujikawa, Y., Kikkawa, M., et al. (2019) A Highly Selective Fluorogenic Substrate for Imaging Glutathione S-Transferase P1: Development and Cellular Applicability in Epigenetic Studies. *Chemical Communications*, **55**, 8122-

-
8125. <https://doi.org/10.1039/C9CC03064F>
- [18] Zhang, B., Ge, C., Yao, J., *et al.* (2015) Selective Selenol Fluorescent Probes: Design, Synthesis, Structural Determinants, and Biological Applications. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 757-769. <https://doi.org/10.1021/ja5099676>