

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.003

新化合物大麻二酚衍生物 CBD-S 的合成及体外活性研究 *

宋云飞¹ 万 方^{2,3} 程 辟⁴ 高 童^{2,3} 戚媛媛^{2,3} 张婉秋^{2,3} 谢伟东^{2,3,Δ}

(1 桂林莱茵生物科技股份有限公司 广西 桂林 541199;

2 清华大学深圳国际研究生院肿瘤化学基因组学国家重点实验室 广东 深圳 518055;

3 清华大学深圳国际研究生院生物医药与健康工程研究院深圳市健康科学与技术重点实验室 广东 深圳 518055;

4 湖南农业大学动物医学院中兽药湖南省重点实验室 湖南 长沙 410128)

摘要 目的:大麻二酚(CBD)具有抗肿瘤和抗炎活性,是一种非成瘾性的活性成分,近年来受到医药界的广泛关注,但其水溶性较差,限制了其临床应用。本文拟合成一种新型的水溶性化合物,并测试其抗肿瘤与抗炎活性。**方法:**本文主要基于 CBD 进行结构改造,化学合成了新化合物大麻二酚 2,6- 苯氧乙酸二钠盐(CBD-S),通过核磁共振氢谱、碳谱和高分辨质谱对其化学结构进行了表征,通过高效液相色谱(HPLC)方法测试了其溶解性。同时在 HepG2(人肝癌细胞)和 J774A.1(小鼠单核巨噬肿瘤细胞系)细胞上分别通过噻唑蓝(MTT)和 Western blotting 的方法测试了其体外抗细胞增殖及抗炎活性。**结果:**我们成功获得了 CBD-S 新化合物,氢谱、碳谱和高分辨质谱鉴定结果证实新合成的 CBD-S 结构正确,HPLC 方法测试结果显示该化合物具有较好的水溶性。在细胞增殖实验中,我们发现该化合物在细胞培养液中终浓度为 5-10 $\mu\text{g/mL}$ 时,以剂量依赖性方式显著抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖。在细胞抗炎活性研究中,为了获得在 J774A.1 细胞上的安全无毒浓度来开展后续的活性测试,我们首先检测了该化合物在 J774A.1 细胞上的毒性,发现在该细胞系温孵 CBD-S 在细胞培养液中终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 以下时,是没有细胞毒的。接下来,在 J774A.1 细胞,我们发现 CBD-S 在细胞培养液中终浓度为 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,显著抑制了脂多糖(LPS)诱导的环氧合酶-2(COX-2)蛋白的生成。**结论:**新合成的化合物 CBD-S 具有较好的水溶性,在体外具有一定的抗肿瘤与抗炎活性,提示其具有较好的应用前景,值得进一步的深入或体内验证研究。

关键词:大麻二酚;大麻二酚 2,6- 苯氧乙酸二钠盐;炎症;肿瘤;环氧合酶-2

中图分类号:R-33;R730.5;R979.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)08-1410-06

Synthesis and Investigation Into in Vitro Activities of a New Cannabidiol Derivative CBD-S*

SONG Yun-fei¹, WAN Fang^{2,3}, CHENG Pi⁴, GAO Tong^{2,3}, QI Yuan-yuan^{2,3}, ZHANG Wan-qiu^{2,3}, XIE Wei-dong^{2,3,Δ}

(1 Guilin Layn Natural Ingredients Corporation, Guilin, Guangxi, 541199, China; 2 State Key Laboratory of Chemical Oncogenomics, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China; 3 Shenzhen Key Lab of Health Science and Technology, Institute of Biopharmaceutical and Health Engineering, Shenzhen International Graduate School, Tsinghua University, Shenzhen, Guangdong, 518055, China; 4 Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan, 410128, China)

ABSTRACT Objective: Cannabidiol (CBD) is a non-addictive active ingredient with anti-tumor and anti-inflammatory activities. Therefore, it has attracted more attention in the pharmaceutical industry in recent years, but its poor water solubility limits its further clinical application. This article aimed to synthesize a new water-soluble compound and test its anti-tumor and anti-inflammatory activities. **Methods:** The new compound cannabinol 2,6-phenoxyacetic acid disodium salt (CBD-S) was chemically synthesized based on CBD. Chemical structure of CBD-S was characterized by nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy, carbon spectroscopy and high-resolution mass spectrometry, and its solubility was tested by high performance liquid chromatography (HPLC). Simultaneously, cell proliferation and anti-inflammatory activities of CBD-S in vitro were studied by MTT and Western blotting methods respectively on HepG2 (human liver cancer cell line) and J774A.1 (mouse monocyte-macrophage tumor cell line) cells. **Results:** We successfully obtained a new CBD-S compound. The results of hydrogen spectrum, carbon spectrum and high-resolution mass spectrometry confirmed that the structure of the newly synthesized CBD-S was correct. The results of HPLC method showed that the compound had good water solubility. In the cell proliferation experiment, we found that when the final concentration of this compound in the cell culture medium was 5-10 $\mu\text{g/mL}$, it significantly inhibited the proliferation of human hepatoma HepG2 cells in a dose-dependent manner. In the study of cellular

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373460);深圳市高校稳定支持项目(WDZC20200820150804001)

作者简介:宋云飞,高级工程师,研究方向:药学; E-mail: song.yunfei@layn.com.cn

Δ 通讯作者:谢伟东,副教授,研究方向:药物药理学, Email: xiewd@sz.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2022-09-27 接受日期:2022-10-23)

anti-inflammatory activity, in order to obtain non-toxic concentrations to carry out subsequent pharmacological experiments, we first detected the toxicity of the compound in J774A.1 Cells. It was found that when the final concentration of CBD-S incubated in this cell line was below 10 $\mu\text{g/mL}$ in cell culture medium, there was no cytotoxicity. Next, in J774A.1 cells, we found that when the final concentration of CBD-S in cell culture medium was 0.01-1.00 $\mu\text{g/mL}$, it significantly inhibited the production of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein induced by lipopolysaccharide (LPS). **Conclusions:** The newly synthesized compound CBD-S has good water solubility and certain anti-tumor and anti-inflammatory activities in vitro, suggesting that it will have a good application prospect, and worth for further studies in-depth or in vivo validation.

Key words: CBD; CBD-S; Inflammation; Tumor; COX-2

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R730.5; R979.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)08-1410-06

前言

全世界约有 2.3 亿人吸食大麻类产品,是最常见的非法物资^[1]。近年来,由于大麻在医疗方面的用途,大麻在美国和欧洲变得更容易获得,甚至开始合法化。大麻二酚(Cannabidiol, CBD)是从植物大麻(*Cannabis sativa* L.)中提取出来的非成瘾性成分,近年来研究表明,CBD 具有抗癫痫、镇静、抗焦虑、改善睡眠、抗肿瘤、抗炎等许多良好的药理活性^[2-6]。相较于四氢大麻酚(Tetrahydrocannabinol, THC),CBD 具有较低的精神活性^[7,8]。CBD 由于在精神方面的较低毒副作用,在生物医药及大健康产品领域表现出越来越多的应用。目前,市面上主要含有 CBD 的产品制剂有 FDA 批准上市的 Epidiolex 口服液和 Sativex 口腔粘膜喷雾剂,分别用于治疗儿童期癫痫症和多发性硬化症相关疼痛^[9,10]。CBD 在炎性疼痛方面具有较好的活性及潜在的临床应用前景^[7,11]。吸入 CBD 甚至还可以减轻新冠病毒及污染物的炎性损伤的活性^[12]。CBD 也表现出一定的抗肿瘤活性^[13,14]。CBD 甚至在化妆品领域也得到了应用^[15]。随着对 CBD 的深入研究,越来越多的有关 CBD 在生物医药与大健康等领域的新产品将被开发出来。

CBD 是 Delta9 大麻酚(THC)的同分异构体,同时存在于植物大麻中,同时也可以化学合成。纯净的 CBD 的性状为淡黄色的结晶,其熔点为 66-67 $^{\circ}\text{C}$ 。极易溶解在有机溶剂中如乙醇、甲醇、乙酸乙酯、乙醚等,几乎不溶于水。然而,CBD 因其结构的关系,水溶性差,生物利用度低,不利于在医药或大健康产业领域的进一步应用^[16]。因此人们开始对其结构进行优化以利于进一步的工业化应用。

本文主要基于 CBD 合成了一种新化合物大麻二酚 2,6- 苯氧乙酸二钠盐(CBD-S,见图 1),解决以往 CBD 水溶性较差的问题,并在体外细胞水平探讨了新合成的水溶性化合物 CBD-S 抗肿瘤与炎性疼痛相关因子方面的作用,为将来进一步的体内实验研究与临床应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

HepG2 细胞(中科院上海细胞库),J774A.1 小鼠巨噬细胞(中科院昆明细胞库),RPMI1640 培养基(美国 Life Technologies Corporation, C11875500BT),胎牛血清(美国 Gibco, ST30-3302),双抗(美国 Gibco, 15140-122),0.25%胰蛋白酶(上海碧云天),噻唑蓝(MTT,北京酷来搏科技,CM7461),三羟甲

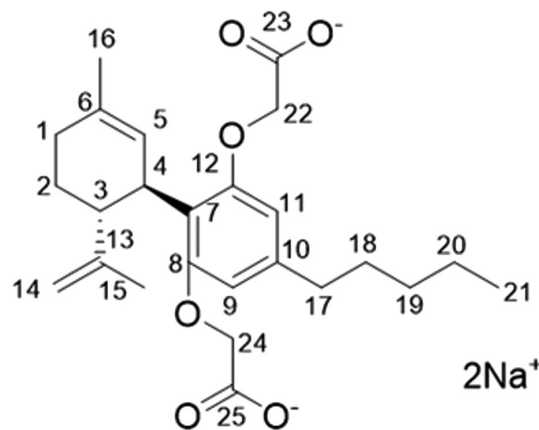


图 1 CBD-S 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of CBD-S

基氨基甲烷(Tris,上海生工),十二烷基硫酸钠(SDS,上海生工),甘氨酸(Glycine,上海生工),吐温-20(上海生工),牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝),蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche, 4693159001),RIPA 裂解液(北京金克隆, EX6020),考马斯亮蓝 G-250(上海碧云天),化学发光增强液(ECL)液(美国 Thermo Fisher),一抗 COX-2 抗体(Rabbit,杭州华安生物, ET1610-23),一抗 β -Actin 抗体(Mouse, Sigma[®],德国 Merck),辣根过氧化物酶(HRP)酶联的抗兔二抗(美国 Cell Signaling Technology),HRP 酶联的抗鼠二抗(美国 Cell Signaling Technology),显影液和定影液(广州乐凯生物),硝酸纤维素膜(深圳创兴科技),三氯甲烷(上海凌峰),乙醇(上海生工),异丙醇(上海生工),大麻二酚(湖南农业大学),脂多糖(Sigma[®],德国 Merck),HPLC 分析型柱(Agilent-ZORBAX-SB-C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ,美国安捷伦公司)。其他为常规的商用试剂或材料。

1.2 实验仪器

KM5200DV 超声波萃取仪(昆山市超声仪器有限公司),旋转蒸发器 R-100(步琦实验室设备贸易上海有限公司),1260 高效液相色谱(美国安捷伦公司),400MHZ 核磁共振波谱仪(瑞士布鲁克公司),酶标仪(EPOCH,美国 Biotek),蛋白垂直/转膜电泳槽(VE180 TANON,上海力敏公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CBD-S 的化学合成 将 500 mg 式 2 所示的大麻二酚溶解在 10 mL 的乙腈中并向其中加入 1.61 g 碳酸钾(图 2),再向体系中加入式 3 所示的溴乙酸乙酯 1.61 mL(浓度为 98%),在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下回流 24 h 至薄层色谱法(TLC)无原料的紫外吸收即

可,将体系倒入水中并用乙酸乙酯萃取三次,取有机层用饱和 NaCl 水溶液洗涤三次后,通过硅胶柱色谱(200-300 目)纯化产物,展开剂(石油醚:乙酸乙酯)的比例为 10:1,得到 637.32 mg 式 4 产物,将得到的产物溶解在 20 mL 丙酮和水比例为 1:1 的

溶剂中。并向其中加入 252.47 mg 的 NaOH 固体并在常温下反应 12 h, TLC 法确定无原料剩余后将样品溶解于甲醇中,上凝胶柱色谱(Tandex LH-20)除去多余 NaOH,最后蒸发溶剂,即可得到式 1 所示的大麻二酚 2,6- 苯氧乙酸二钠盐。

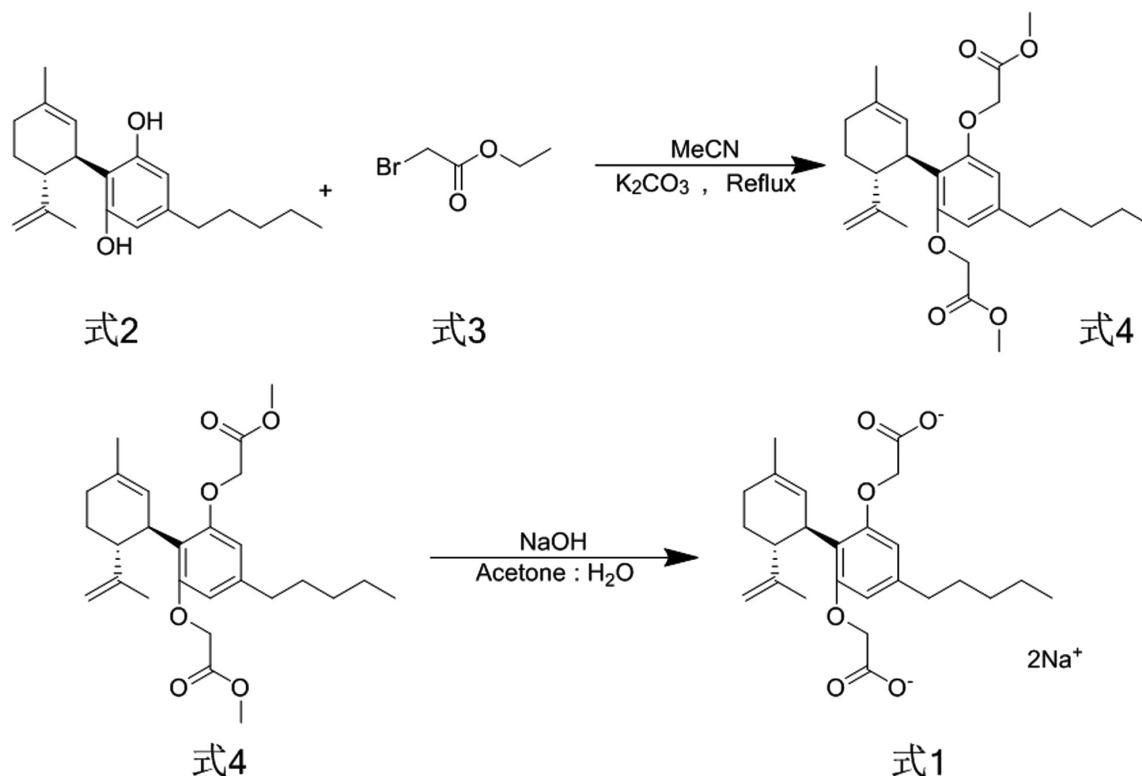


图 2 CBD-S 的合成方法

Fig. 2 Synthesis method of CBD-S

1.3.2 CBD-S 水溶解性的测定 (1) 配置 100mL 磷酸缓冲溶液 0.2 mol/L Na_2HPO_4 : 称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.1632 g 后向其中加入蒸馏水至 100 mL 溶解。0.2 mol/L NaH_2PO_4 : 称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.12 g 后加入蒸馏水至 100mL 溶解。pH=6.8 的缓冲液配置: 49 mL Na_2HPO_4 和 51 mL NaH_2PO_4 充分混匀,并用 pH 试纸确定 pH 值。

(2) 配置待测饱和化合物溶液

取少量化合物加入至含 1 mL 缓冲液中的离心管中,加入的化合物量以溶液中有部分固体不溶解为宜,然后震荡 24 h,离心分离,取上清液,用微孔膜过滤后,取 1 μL 饱和待测液稀释至 10 mL,超声 2 h 后取 1 mL 过水相膜备用。

(3) HPLC 色谱条件

使用 1290 高效液相色谱,采用 HPLC 分析型色谱柱, A 相为 0.1% 甲酸水, B 相为乙腈 (ACN) 的系统流动相, 梯度洗脱程序为 0-30 min, 90~10% ACN, 检测波长 284 nm, 色谱柱温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.7 mL/min, 进样量为 10 μL 。

(4) 绘制标准曲线与样品测定

使用万分之一电子天平准确称量 1 mg 左右化合物于 12 mL 容量的离心管中, 使用移液枪, 用配置好的缓冲溶液作溶剂 (10 mL 左右) 定量至 100 $\mu\text{g/mL}$ 。之后依次稀释制作 80, 60, 40, 20 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。将标准溶液分别过水相膜后备用。用 HPLC 分析型柱, 制作含 6 个梯度的浓度 - 峰

面积标准曲线。待测的饱和化合物溶液用 HPLC 检测化合物峰面积。用 HPLC 检测化合物峰面积, 利用拟合出的标准曲线, 计算溶解度。

1.3.3 细胞 MTT 实验 将指数生长的 HepG2 细胞和 J774A.1 细胞以 1×10^4 的密度接种至 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12-24 h 后分别以 0-40 $\mu\text{g/mL}$ 给药, 给药后再 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24-48 h。将 MTT 溶解于磷酸缓冲液 (PBS) 配制 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 用 0.22 μm 滤头过滤, 制备成 MTT 工作液。每孔加入 20 μL MTT 工作液, 培养 1.5 h。吸走每孔培养液, 加入 100 μL DMSO 溶解甲臞, 使用酶标仪检测每孔在 490 nm 处的吸光度, 处理数据。

1.3.4 细胞水平抗炎镇痛活性测试 将指数生长的 J774A.1 细胞以 2×10^5 的密度接种至 6 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后。随后用 1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖 (LPS) 诱导炎症模型, 同时给与 CBD-S, CBD-S 溶解在 DMSO 溶液中, 细胞培养液中 CBD-S 的终浓度为 0.01, 0.1 和 1 $\mu\text{g/mL}$, 不给 LPS 的正常对照和给 LPS 的模型对照均给予等体积的 DMSO 溶液。造模及给药培养 6-24 h 后, 收集细胞样品, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$, 样品用于后续生化 COX-2 蛋白的表达分析。COX-2 蛋白表达检测主要通过 Western blotting 的方法。首先, 将采集的细胞裂解液, 用考马斯亮蓝的方法进行蛋白定量, 确定合适的蛋白电泳上样总量。配制 10% SDS-PAGE 胶, 进行电泳。电泳缓冲液配制如下: Tris 1.51 g, Glycine 9.4 g, SDS 0.5 g, 加去离子水溶解, 最终溶液总体积为

1 L。将预染的蛋白标记(Marker)和含有相同蛋白量的各组蛋白样品加入凝胶上层梳齿,使凝胶完全浸泡在电泳缓冲液中,调整至 120 V 恒压,电泳直至 Marker 分散至整个凝胶,随后进行转膜。转膜缓冲液配制如下:Tris 1.51 g, Glycine 9.4 g,加水溶解,加 200 mL 甲醇,补充去离子水至 1 L。将电泳完成的凝胶取出,将硝酸纤维素(NC)膜与凝胶贴合,赶走膜和胶之间的气泡,外侧用滤纸和海绵包裹并用转膜夹固定,分正负极放入转膜槽,加入转膜缓冲液,调整恒流 200 mA,转膜 90 分钟。膜用 5%的脱脂奶粉[g/mL,溶解在 TBST(含 0.1%吐温-20 的 Tris 缓冲液)溶液中]封闭 2 h,然后一抗(用 1.5%的 BSA-TBST 稀释,其中 COX-2 稀释倍数为 1:1000,Actin 稀释倍数为 1:5000)4℃下封闭过夜,用 TBST 洗膜 3 次,接下来用二抗孵育 2 h,用 TBST 洗膜 3 次,曝光、显影,用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.3.5 统计分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据表达为平均值±标准差(S.D.)。通过单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 事后检验分析多组之间的差异, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 CBD-S 的表征

CBD-S 产物的核磁共振氢谱表征如下:

^1H NMR (400MHz CDCl_3): δ 6.21 (s, 2H)(C_9 , C_{11}), 5.09(d, $J=5.09\text{Hz}$, 1H)(C_5), 4.55 (d, $J=4.56\text{Hz}$, 1H)(C_{14}), 4.34 (dd, $J=4.34\text{Hz}$, 1H)(C_{14}), 4.01 (d, $J=4.01\text{Hz}$, 4H)(C_{22} , C_{24}), 3.27-3.20(m, 1H)(C_4), 2.39-2.34(m, 2H)(C_{17}), 2.23-2.16(m, 1H)(C_3), 1.90-1.84 (m, 1H)(C_1), 1.68-1.63 (m, 2H)(C_1 , C_2), 1.60 (s, 3H)(C_{15}), 1.58(s, 3H)(C_{16}), 1.56-1.46 (m, 3H)(C_2 , C_{18}), 1.31-1.24 (m, 4H)(C_{19} , C_{20}), 0.87($J=0.87\text{Hz}$, 3H)(C_{21})。

CBD-S 产物的核磁共振碳谱如下:

^{13}C NMR (100 MHz CD_3OD): δ 172.7 (C_{25} , C_{23}), 167.2 (C_8 , C_{12}), 149.5 (C_{13}), 140.6 (C_{10}), 130.0 (C_6), 127.2 (C_3), 118.7 (C_{14}), 110.4 (C_7 , C_9 , C_{11}), 69.9 (C_{22} , C_{24}), 44.1 (C_3), 36.3 (C_4), 35.9 (C_{17}), 31.8 (C_1), 31.1 (C_{19}), 30.7 (C_{18}), 29.9 (C_2), 23.9 (C_{20}), 22.5 (C_{16}), 19.7 (C_{15}), 14.4 (C_{21})。

CBD-S 产物具有以下高分辨质谱表征:HRMS [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 理论值为:431.2376,实测值为:431.2387。

上述氢谱、碳谱和高分辨质谱数据表明,获得目标化合物 CBD-S,结构鉴定正确。

2.2 CBD-S 的水溶解测试结果

通过 HPLC 法分别测定了样品在不同浓度下的标准曲线,及倍率稀释后的饱和溶液样品测得的峰面积,标准曲线见图3。

通过计算,回归方程为: $y=7622.4x+114923$,标准曲线的方差为: $R^2=0.9939$,通过代入倍数稀释饱和溶液的峰面积并乘以稀释倍数,即可得目标化合物的水溶性约为:224.47 mg/mL。

2.3 CBD-S 对人肝癌细胞毒实验

在 CBD-S 处理 24 h 后,发现 CBD-S 在 5-10 $\mu\text{g/mL}$ 即可显著抑制肿瘤细胞 HepG2 的增殖,抑制率可达 20%-30%,并表现出一定的剂量依赖趋势,然而在 10-40 $\mu\text{g/mL}$ 之间,随着剂量的进一步增加,其对细胞增殖的抑制活性并没有进一步的明

显增加(图 4)。上述结果表明,CBD-S 具有一定抑制肿瘤细胞生长的作用,值得进一步的研究。

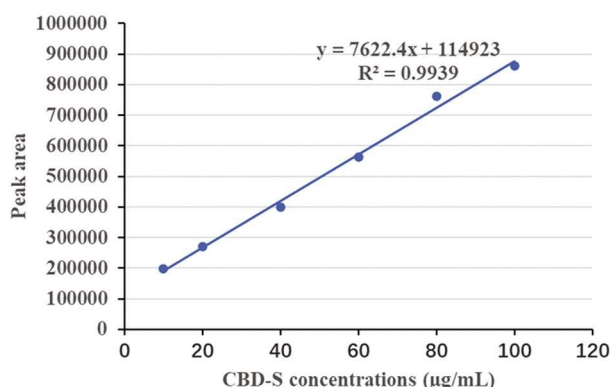


图3 CBD-S 通过 HPLC 测定后绘制标准曲线

Fig. 3 Standard curve drawn after CBD-S was determined by HPLC

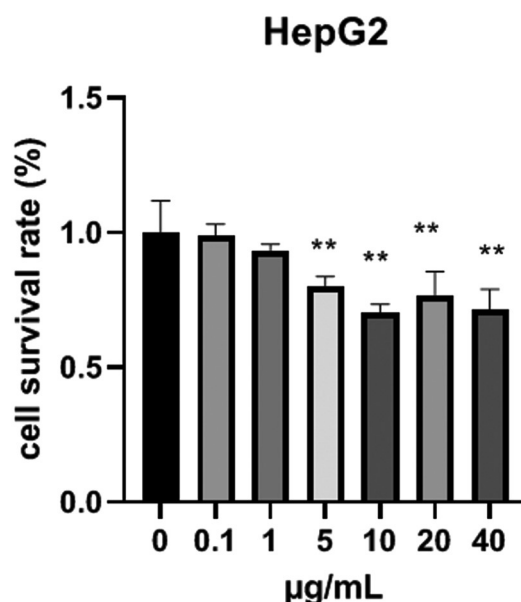


图4 CBD-S 对 HepG2 肝癌细胞生长抑制实验

注:数据表示为均值±标准差($n=4$),** $P<0.01$ vs "0".

Fig. 4 Inhibition experiment of CBD-S on the growth of liver cancer cells (HepG2).

Note: The data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n=4$),

** $P<0.01$ vs "0".

2.4 CBD-S 对 J774A.1 细胞毒及炎症镇痛因子 COX-2 蛋白表达的影响

接下来,测试了 CBD-S 对小鼠 J774A.1 单核巨噬细胞(肿瘤细胞系)增殖的影响,然而在药物处理 24 h 后,CBD-S 的细胞毒活性未有明显的统计学意义。但在处理 48 h 后,CBD-S 在 10-40 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对免疫细胞也会表现出一定抑制细胞增殖的活性,抑制率达 20%-27%(图 5)。

接下来,用 LPS 刺激 J774A.1 单核巨噬细胞,通过 Western blotting 实验,发现和正常组比较,LPS 模型组 COX-2 表达显著升高,而 CBD-S 在一个较低无毒的剂量(0.1-1 $\mu\text{g/mL}$)下即可显著抑制 COX-2 蛋白的表达(图 6)。

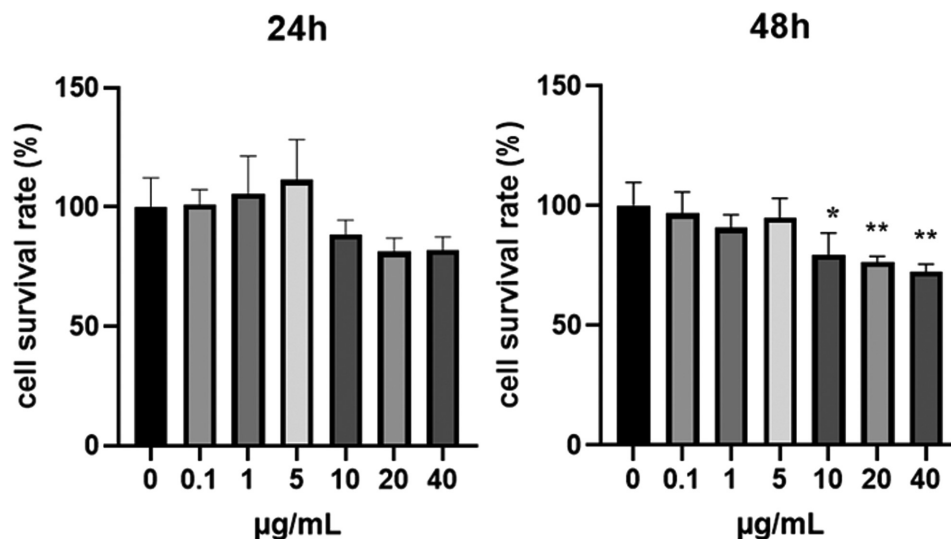


图5 CBD-S 对 J744A.1 细胞生长抑制实验

注:数据表示为均数±标准差(n=4), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs "0".

Fig.5 Cell growth inhibition experiment of CBD-S in J744A 1 cells.

Note: The data are expressed as mean ± standard deviation (n=4), * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs "0".

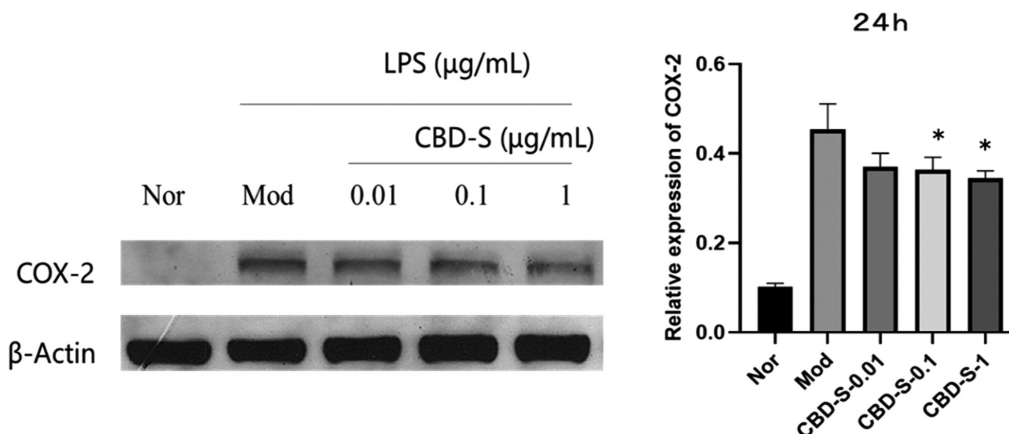


图6 CBD-S 对 COX-2 蛋白表达的影响

注:数据表示为均数±标准差(n=3), * $P<0.05$ vs Mod. Nor: 正常对照组; Mod: 1 µg/mL LPS 处理的炎症模型对照组; CBD-S-0.01-1: 0.01-1 µg/mL CBD-S 处理 +1 µg/mL LPS 炎症刺激组。

Fig. 6 Effect of CBD-S on COX-2 protein expression.

Note: Data expressed as mean ± standard deviation (n=3), ** $P<0.01$ vs Mod. Nor, normal control group; Mod, 1 µg/mL LPS treated inflammatory model control group; CBD-S-0.01-1, 0.01-1 µg/mL CBD-S treatment+1 µg/mL LPS inflammatory stimulation group.

3 讨论

CBD 是植物大麻中的大麻二酚,是一种非成瘾性的成分。近来研究发现 CBD 具有许多广泛的活性如抗肿瘤及抗炎效应^[17,18]。大麻类活性组分如大麻酚和 CBD 主要通过 G 蛋白偶联的大麻类受体 CB1 和 CB2 发挥作用^[19,20]。CB1 和 CB2 受体在神经系统高表达^[21],同时 CB2 受体还在外周细胞如肿瘤细胞或免疫细胞等高表达^[22]。CBD 或作用免疫细胞上的 CB2 调节免疫细胞功能,发挥抗炎活性^[23,24]。基于 CBD 的活性,药物学家一直试图通过结构修饰寻找活性更强和毒性更低,或者具有更好药理学行为的化合物。本研究中的 CBD-S 即为经过简单几步新合成的化合物,经过化学表征,结构正确,该化合物解决了 CBD 水溶性较差的问题,在生物医药与大健康领域具有潜在的应用前景。基于 CBD 前期的抗肿瘤和抗炎活性,本文在体外

初步评价了新化合物 CBD-S 的相关活性,结果也发现其保留了以往报道的 CBD 的相关活性。

在肿瘤领域,COX-2 在肿瘤的生长过程中起着非常重要的作用,肿瘤细胞会高表达 COX-2^[25,26]。COX-2 被认为是一个原癌基因,是肿瘤生长调控的一个重要靶点^[27],也会促进肿瘤的免疫逃逸^[28]。COX-2 抑制剂塞来希布(Celecoxib)除具有独立的抗肿瘤效应外^[29],和其他肿瘤药物联用在临床也表现出较好的抗肿瘤活性^[30]。本文发现 CBD-S 可以显著抑制 COX-2 的表达,这提示 CBD-S 的抑制细胞增殖活性或与其抑制 COX-2 的表达有关,这为临床抗肿瘤药物特别是炎症相关抗肿瘤药物的研发提供了重要的参考。

COX-2 是生成前列腺素 E2 的重要酶类,在炎症疼痛发送发展过程中起着非常重要的作用,也是药物研发的重要靶点^[31]。阳性药物塞来希布即是一种特异性较好的 COX-2 的抑制剂,

具有显著的抗炎镇痛活性。抑制 COX-2 可以显著抑制炎症的发生^[32], 具有抗炎镇痛活性的 CBD 可以显著抑制细胞浆中 COX-2 的表达^[33]。本文研究结果显示, CBD-S 显著抑制 COX-2 的蛋白水平, 表明 CBD-S 可通过抑制 COX-2 发挥抗炎活性。同时, COX-2 是炎性疼痛的重要因子, CBD-S 对 COX-2 水平的抑制, 提示其在炎性疼痛方面或具有一定的效应, 但需要进一步的体内验证研究。

4 结论

本文合成了新化合物大麻二酚类衍生物 CBD-S, 该化合物具有水溶性。同时, 体外结果研究显示 CBD-S 具有一定的抑制细胞增殖的活性, 并显著抑制炎性刺激诱导的 COX-2 蛋白水平, 提示其具有一定的抗肿瘤与抗炎作用。进一步推测 CBD-S 在炎性与疼痛、以及炎性与肿瘤互作调控方面有一定的潜在活性与应用前景。CBD-S 抗肿瘤、抗炎作用机制或与其抑制 COX-2 的表达有关, 然而需要进一步的体内验证与深入研究。

参考文献 (References)

- [1] Walsh KB, McKinney AE, Holmes AE. Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 777804
- [2] Zhornitsky S, Potvin S. Cannabidiol in humans-the quest for therapeutic targets[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2012, 5: 529-552
- [3] Ranum RM, Whipple MO, Croghan I, et al. Use of Cannabidiol in the Management of Insomnia: A Systematic Review. Cannabis Cannabinoid Res, 2022[Epub ahead of print]
- [4] Berger M, Amminger GP, McGregor IS. Medicinal cannabis for the treatment of anxiety disorders[J]. Aust J Gen Pract, 2022, 51: 586-592
- [5] Wang Y, Wang X, Yang Y, et al. Comparison of the in vitro Anti-Inflammatory Effect of Cannabidiol to Dexamethasone [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2022, 15: 1959-1967
- [6] Viereckl MJ, Krutsinger K, Apawu A, et al. Cannabidiol and Cannabigerol Inhibit Cholangiocarcinoma Growth In Vitro via Divergent Cell Death Pathways[J]. Biomolecules, 2022, 12(6): 854
- [7] Singh C, Rao K, Yadav N, et al. Current Cannabidiol Safety: A Review[J]. Curr Drug Saf, 2022[Epub ahead of print]
- [8] Pennypacker SD, Romero-Sandoval EA. CBD and THC: Do They Complement Each Other Like Yin and Yang?[J]. Pharmacotherapy, 2020, 40: 1152-1165
- [9] Samanta D. Cannabidiol: A Review of Clinical Efficacy and Safety in Epilepsy[J]. Pediatr Neurol, 2019, 96: 24-29
- [10] Jones É, Vlachou S. A Critical Review of the Role of the Cannabinoid Compounds Δ (9)-Tetrahydrocannabinol (Δ (9)-THC) and Cannabidiol (CBD) and their Combination in Multiple Sclerosis Treatment[J]. Molecules, 2020, 25(21): 4930
- [11] Frane N, Stapleton E, Iturriaga C, et al. Cannabidiol as a treatment for arthritis and joint pain: an exploratory cross-sectional study [J]. J Cannabis Res, 2022, 4: 47
- [12] Srichana T, Chunhachaichana C, Suedee R, et al. Oral inhalation of cannabidiol delivered from a metered dose inhaler to alleviate cytokine production induced by SARS-CoV-2 and pollutants [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2022, 76: 103805
- [13] Wang F, Multhoff G. Repurposing Cannabidiol as a Potential Drug Candidate for Anti-Tumor Therapies [J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 582
- [14] Lee HS, Tamia G, Song HJ, et al. Cannabidiol exerts anti-proliferative activity via a cannabinoid receptor 2-dependent mechanism in human colorectal cancer cells [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 108: 108865
- [15] Spindle TR, Sholler DJ, Cone EJ, et al. Cannabinoid Content and Label Accuracy of Hemp-Derived Topical Products Available Online and at National Retail Stores [J]. JAMA Netw Open, 2022, 5: e2223019
- [16] Silmore LH, Willmer AR, Capparelli EV, et al. Food effects on the formulation, dosing, and administration of cannabidiol (CBD) in humans: A systematic review of clinical studies[J]. Pharmacotherapy, 2021, 41: 405-420
- [17] Anil SM, Peeri H, Koltai H. Medical Cannabis Activity Against Inflammation: Active Compounds and Modes of Action [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 908198
- [18] Hamad H, Olsen BB. Cannabidiol Induces Cell Death in Human Lung Cancer Cells and Cancer Stem Cells [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2021, 14(11): 1169
- [19] Bosquez T, Wilson S, Iliopoulos-Tsoutsouvas C, et al. Differential enantiomer-specific signaling of cannabidiol at CB₁ receptors[J]. Mol Pharmacol, 2022[Epub ahead of print]
- [20] Jiang Z, Jin S, Fan X, et al. Cannabidiol Inhibits Inflammation Induced by Cutibacterium acnes-Derived Extracellular Vesicles via Activation of CB₂ Receptor in Keratinocytes[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 4573-4583
- [21] Llorente-Ovejero A, Bengoetxea de Tena I, Martínez-Gardeazabal J, et al. Cannabinoid Receptors and Glial Response Following a Basal Forebrain Cholinergic Lesion[J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2022, 5: 791-802
- [22] Costas-Insua C, Guzmán M. Endocannabinoid signaling in glioma[J]. Glia, 2022. doi: 10.1002/glia.24173
- [23] Cabral GA, Rogers TJ, Lichtman AH. Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2015, 10: 193-203
- [24] Tortora C, Di Paola A, Argenziano M, et al. Effects of CB₂ Receptor Modulation on Macrophage Polarization in Pediatric Celiac Disease [J]. Biomedicines, 2022, 10(4): 874
- [25] Hudson CN, He K, Pascal LE, et al. Increased COX-1 expression in benign prostate epithelial cells is triggered by mitochondrial dysfunction[J]. Am J Clin Exp Urol, 2022, 10: 234-245
- [26] Aparnadevi P, Nirmal RM, Veeravarmal V, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expression in Oral Submucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study [J]. J Pharm Bioallied Sci, 2022, 14: s769-s773
- [27] Ravinder D, Rampogu S, Dharmapuri G, et al. Inhibition of DDX3 and COX-2 by forskolin and evaluation of anti-proliferative, pro-apoptotic effects on cervical cancer cells: molecular modelling and in vitro approaches[J]. Med Oncol, 2022, 39: 61
- [28] Bell CR, Zelenay S. COX-2 upregulation by tumour cells post-chemotherapy fuels the immune evasive dark side of cancer inflammation[J]. Cell Stress, 2022, 6: 76-78 (下转第 1462 页)

- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 手足口病诊疗指南(2018 年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2018, 11(3): 161-166
- [9] 任海燕, 郑连央, 蒋慧玲, 等. 小儿手足口病的传染途径与预防对策分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2019, 34(6): 662, 665
- [10] 杨恩辉, 单鸣凤, 周凯. 重症手足口病致死机制及其防治的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(3): 514-518, 524
- [11] 中国医师协会新生儿科医师分会感染预防与控制专业委员会. 新生儿肠道病毒感染诊疗与预防专家共识[J]. 临床儿科杂志, 2021, 39(3): 161-166
- [12] 黄浩, 盘珍梅, 潘燕兰. 致手足口病肠道病毒的病原学研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(6): 1491-1501
- [13] Ling-Liang Y, Wei C, You-Hong D, et al. Immune Mechanism of Hand Foot and Mouth Disease Sepsis [J]. Indian J Pediatr, 2021, 88(1): 70-71
- [14] Liniger M, Gerber M, Renzullo S, et al. TNF-Mediated Inhibition of Classical Swine Fever Virus Replication Is IRF1-, NF- κ B- and JAK/STAT Signaling-Dependent[J]. Viruses, 2021, 13(10): 2017
- [15] 茆静, 何雅青, 余光清, 等. Toll 样受体 7 在肠道病毒 71 型感染人 Jurkat T 细胞诱导炎症因子中的作用[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(3): 266-269
- [16] 吕秋月, 韩焱, 刘丹红, 等. 肠道病毒 71 型感染人 Jurkat 细胞诱导细胞因子表达研究[J]. 国际病毒学杂志, 2020, 27(6): 469-472
- [17] 蔡思铭, 岑红霞, 廖赵妹, 等. CV-A16 感染沙鼠细胞因子和趋化因子的动态变化分析[J]. 病毒学报, 2022, 38(1): 115-122
- [18] 陈明琪, 崔云, 陈晓宇. TNF- α 在炎症性肠病发生、发展中的作用机制[J]. 胃肠病学, 2020, 25(3): 187-190
- [19] Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719
- [20] Zhang W, Huang Z, Huang M, et al. Predicting Severe Enterovirus 71-Infected Hand, Foot, and Mouth Disease: Cytokines and Chemokines[J]. Mediators Inflamm, 2020, 29(1): 9273241
- [21] 中国妇幼保健协会临床诊断与实验医学分会. SAA 单独和与 CRP 联合检测在儿童感染性疾病中的应用专家共识 [J]. 检验医学, 2021, 36(7): 685-690
- [22] 王冠, 郑美娜, 秦少游, 等. 不同严重程度急性胰腺炎患者血清中 PCT、hs-CRP、TNF- α 水平及临床意义 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(14): 2699-2702, 2711
- [23] 郑文博, 王伟. 血清淀粉样蛋白 A、C 反应蛋白与免疫球蛋白联合检测对手足口病的早期诊断价值 [J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(8): 1013-1015
- [24] 中华医学会儿科学分会医院感染管理与控制专业委员会. 血清降钙素原检测在儿童感染性疾病中的临床应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(1): 9-15
- [25] Tang JH, Gao DP, Zou PF. Comparison of serum PCT and CRP levels in patients infected by different pathogenic microorganisms: a systematic review and meta-analysis [J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(7): e6783
- [26] 罗云. 细菌感染性肺炎患儿血清 PCT、hs-CRP、WBC、IL-6、Hb 与病情严重程度的相关性分析 [J]. 武警医学, 2022, 33 (4): 277-280, 286
- [27] 杨世明, 丁莉, 沈琰, 等. 200 例手足口病患儿临床表现及其实验室诊断[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(2): 291-295
- [28] 曹月, 朱晶波. 儿童手足口病重症病例神经系统损害表现及影响因素研究[J]. 华南预防医学, 2021, 47(10): 1302-1304, 1308
- [29] 蔡华波, 宋萍, 张蕾, 等. 监测心排量在重症手足口病患儿中的临床应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(4): 271-275

(上接第 1415 页)

- [29] Abdelhaleem EF, Kassab AE, El-Nassan HB, et al. Recent advances in the development of celecoxib analogs as anticancer agents: A review[J]. Arch Pharm (Weinheim), 2022: e2200326
- [30] Ye SY, Li JY, Li TH, et al. The Efficacy and Safety of Celecoxib in Addition to Standard Cancer Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials [J]. Curr Oncol, 2022, 29: 6137-6153
- [31] Ahmadi M, Bekeschus S, Weltmann KD, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors[J]. RSC Med Chem, 2022, 13: 471-496
- [32] Zhao J, Xu J, Zhang Z, et al. Barrigenol-like triterpenoid saponins from the husks of *Xanthoceras sorbifolia bunge* and their anti-inflammatory activity by inhibiting COX-2 and iNOS expression [J]. Phytochemistry, 2022, 204: 113430
- [33] Genovese T, Cordaro M, Siracusa R, et al. Molecular and Biochemical Mechanism of Cannabidiol in the Management of the Inflammatory and Oxidative Processes Associated with Endometriosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5427