• 研究论文 •

新型 18 β -甘草次酸氨基二硫代甲酸酯衍生物的合成及抗癌活性研究

陈 凑 喜^a 李 学 强^{*,a,b} 李 天 才^a 周 学 章^c

(^a 宁夏大学化学化工学院 银川 750021)

(^b 宁夏天然药物工程技术研究中心 银川 750021)

(^c 宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室 银川 750021)

摘要 以 18 β -甘草次酸为原料首先经简单酰胺化反应方便地得到 18 β -甘草次酸哌嗪, 再与二硫化碳、碳酸钾以及不同结构卤代烃“一锅煮”法快速、高效地合成了 10 种含氨基二硫代甲酸酯结构的新型甘草次酸酰胺类衍生物, 通过 IR, ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HR-MS 对所有新化合物进行了结构确证; 并以四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)法评价了该类化合物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的细胞毒活性. 初步生物活性研究结果表明, 该类化合物具有明显的抑制人肝癌细胞增殖、诱导其凋亡的细胞毒活性, 给药 72 h, 半抑制浓度 IC₅₀ 最优值仅为 14.42 μ g/mL.

关键词 18 β -甘草次酸; 氨基二硫代甲酸酯; 合成; 抗癌活性

Synthesis and Anti-tumor Activities of Novel 18 β -Glycyrrhetic Acid Derivatives Attaching Dithiocarbamate Units

Chen, Couxi^a Li, Xueqiang^{*,a,b} Li, Tiancai^a Zhou, Xuezhong^c

(^a School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

(^b Ningxia Development Center of Natural Products and Medication, Yinchuan 750021)

(^c Key Laboratory of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract Ten new 18 β -glycyrrhetic acid derivatives with dithiocarbamate units were prepared by amidation of 18 β -glycyrrhetic acid and piperazine followed with one-pot condensation of the amide, CS₂ and alkyl halides in the presence of potassium carbonate in CHCl₃. The structures of all the new compounds were identified by NMR spectra, IR and HRMS technology. Anti-tumor activities of the 18 β -glycyrrhetic acid derivatives against human hepatoma SMMC-7721 cell lines were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. They were found to inhibit the liver cancer cell proliferation and induce apoptosis as the lowest IC₅₀ value was only 14.42 μ g/mL.

Keywords 18 β -glycyrrhetic acid; dithiocarbamates; synthesis; anti-tumor activity

18 β -甘草次酸(GA)作为甘草的主要药理活性成分之一, 具有抗炎^[1~4]、抗氧化^[5,6]、抗溃疡^[7]、保肝, 抗肝纤维化^[8]、抗病毒^[9~12]、抗癌^[13~17]等丰富活性; 而氨基

二硫代甲酸酯类衍生物也是一类重要而又比较特殊的化合物, 具有多种官能团和多个杂原子, 在农业、工业领域都有着极其广泛用途^[18,19]. 同时由于其具有一定的

* E-mail: lixq@nxu.edu.cn

Received November 5, 2011; revised January 31, 2012; accepted February 14, 2012.

Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 21062014), Key Project of Chinese Ministry of Education (No. 210237), Natural Science Foundation of Ningxia Province of China (No. NZ0606) and Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Yunnan University (No. 200902205) for financial support.

国家自然科学基金(No. 21062014)、教育部科学技术研究重点项目(No. 210237)、宁夏自然科学基金(No. NZ0606)和云南大学自然资源药物化学教育部重点实验室开放基金(No. 200902205)资助项目.

抗炎、抗菌、抗氧化、抗 HIV、抗肿瘤等反应活性而被逐渐应用于医药^[20~27]和固相有机合成^[28,29]领域. 氨基二硫代甲酸酯、18 β -甘草次酸都因其具有的特殊结构骨架而表现出良好的生物活性和应用前景, 近年来备受人们关注, 关于它们的各自研究也日趋丰富, 但它们之间的串联合成反应方法以及生物活性的研究却鲜见报道. 因此我们希望以 18 β -甘草次酸哌嗪为底物, 开发出快速、高效地构筑氨基二硫代甲酸酯片段骨架的方法, 从而合成出既含有氨基二硫代甲酸酯结构又含有五环三萜类骨架的新型甘草次酸酰胺衍生物. 试图通过这样的活性片段优化叠加, 以期实现甘草次酸便捷、合理、经济的修饰策略, 从而为抗肿瘤药物的新药筛选提供可靠的先导化合物. 目标化合物的具体合成路线如 Figure 1 所示.

图 1 18 β -甘草次酸-30-哌嗪-氨基二硫代甲酸酯衍生物的合成

Figure 1 Synthesis of 18 β -glycyrrhetic acid-30-piperazine-dithiocarbamate derivatives

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

X-24 型数字显示显微熔点仪(北京泰克仪器有限公司, 温度计未校正); 日本岛津 FTIR-8400S 型红外光谱仪; Bruker Avance 400 MHz 核磁共振仪(TMS 为内标, CDCl₃ 为溶剂); API QSTAR Pulsar 飞行时间高分辨质谱仪(ESI 源上测定); 18 β -甘草次酸购自宁夏启元药业有限公司, 纯度 99.6%; EDCI (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳亚胺盐酸盐)、HOBt (1-羟基苯并三氮唑)购于上海共价化学科技有限公司; 常规色谱柱硅胶为青岛海洋化工厂生产; 其余试剂均为国产分析纯或化学纯, 所用溶剂均采用标准方法处理后使用.

人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自武汉大学中国典型生物保藏中心. 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 加 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素, 培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内常规传代培养, 每周换液 2~3 次; 取处于对数生长期细胞用于实验. HP400GS 智能人工 CO₂ 气候培养箱; 酶标仪(Opsys MR, Dynex Technology, USA); 倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司 CKX41 型). 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 Sigma 公司; Middlebrook 7H9 肉汤购自 BD Difco 公司; Alamar Blue solution 购自 Trek Diagnostics 公司; Tween-80、胰蛋白酶(Trypsin, 1 : 250)购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司; RPMI-1640 培养基为美国 Gibco BRL 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司.

1.2 化合物的合成

1.2.1 18 β -甘草次酸-30-哌嗪的合成

取 1.00 g (2.12 mmol) 18 β -甘草次酸, EDCI 767 mg (4 mmol), HOBt 290 mg (2.12 mmol)溶于 50.0 mL 的绝对无水二氯甲烷中, 滴加 1 mL 三乙胺, 室温搅拌活化 2 h, 再加入无水哌嗪 360 mg (4 mmol), 室温搅拌. TLC 跟踪反应, 反应结束后, 产物倾入 30.0 mL 冰水中, 用 30.0 mL 二氯甲烷分两次萃取, 饱和食盐水洗涤后, 有机相用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 浓缩得粗品. 粗品进行柱层析分离[洗脱剂: V(乙酸乙酯): V(甲醇)=4 : 1], 得白色固体化合物 1.

1.2.2 18 β -甘草次酸-30-哌嗪-氨基二硫代甲酸酯衍生物的合成

在室温条件下, 将 18 β -甘草次酸-30-哌嗪 107.78 mg (0.2 mmol)溶于 10 mL 的氯仿中, 加入研细的无水碳酸钾 27.64 mg (0.2 mmol), 搅拌下滴加二硫化碳(约 1 mL), 反应约 5 min 后, 分别加入不同结构卤代烃 0.2 mmol, 继续反应, 直至 TLC 跟踪反应结束, 过滤, 减压蒸除溶剂, 得粗品. 硅胶柱层析纯化, 粗品进行柱层析

分离[洗脱剂: $V(\text{石油醚}): V(\text{乙酸乙酯})=1:1$], 得化合物 **2a~2j**.

1.3 化合物的表征

化合物 **1**: 18 β -甘草次酸-30-哌嗪, 白色固体, 收率: 80.6%, m.p. 244~246 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.68 (s, 1H, 12-H), 3.83 (s, 3H, 31-H, 34-H), 3.23 (dd, $J=5.6, 10.8$ Hz, 1H, 3-H), 3.11 (s, 3H, 32-H, 33-H), 2.76 (d, $J=13.6$ Hz, 1H, 18-H), 2.34 (s, 1H, 9-H), 2.19~1.17 (m, 16H, 2-H, 6-H, 7-H, 15-H, 16-H, 19-H, 21-H, 22-H), 1.36 (s, 3H, 27-H), 1.22 (s, 3H, 30-H), 1.13 (s, 3H, 25-H), 1.12 (s, 3H, 26-H), 1.06~0.97 (m, 2H, 1-H), 1.05 (s, 3H, 23-H), 0.82 (s, 3H, 24-H), 0.80 (s, 3H, 28-H), 0.72~0.69 (m, 1H, 5-H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , TMS) δ : 200.27 (C-11), 174.09 (C-30), 169.58 (C-13), 128.60 (C-12), 78.71 (C-3), 61.81 (C-9), 54.94 (C-5), 48.06 (C-18), 48.06 (C-31), 48.06 (C-34), 45.30 (C-8), 44.87 (C-33), 43.89 (C-32), 43.86 (C-20), 43.31 (C-14), 39.17 (C-19), 39.17 (C-4), 39.14 (C-1), 37.71 (C-22), 37.11 (C-10), 33.01 (C-7), 32.81 (C-17), 31.79 (C-21), 29.69 (C-28), 28.42 (C-29), 28.10 (C-23), 27.31 (C-2), 26.72 (C-16), 26.40 (C-15), 23.13 (C-27), 18.71 (C-26), 17.48 (C-6), 16.41 (C-25), 15.60 (C-24); IR (KBr) ν_{max} : 3445 (-NH), 3347 (-OH), 2926, 2920, 2845, 1742, 1652 (-HN-C=O), 1525, 1456, 1382, 1211, 1054 cm^{-1} . ESI-TOFMS m/z : 539.4213 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_3$: 539.4213.

化合物 **2a**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基正丁酯, 白色固体, 收率: 82.6%, m.p. 251~253 °C, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.64 (s, 1H), 4.52~3.73 (m, 8H), 3.28 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.19 (dd, $J=5.2, 10.8$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 2.31 (s, 1H), 2.24~1.14 (m, 16 H), 1.60 (d, $J=13.2$ Hz, 2H), 1.39 (s, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 1.02~0.95 (m, 2H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.77 (s, 3H), 0.68~0.66 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , TMS) δ : 200.07, 198.33, 174.37 (-C=O), 169.22, 128.60, 78.67, 61.78, 54.92, 48.05, 45.26, 44.01, 43.78, 43.27, 39.12, 39.10, 37.69, 37.07, 32.92, 32.80, 31.79, 28.40, 28.11, 27.27, 26.93, 26.70, 26.37, 23.14, 21.98, 18.68, 17.48, 16.37, 15.61, 13.56; IR (KBr), ν_{max} : 3470 (-OH), 2929, 2868, 2245, 1722, 1655 (-HN-C=O), 1462 (-N-C(S)-S-), 1411, 1280, 1211 (C=S), 1165, 1082, 998, 910, 734 cm^{-1} ; ESI-TOFMS m/z : 671.4285 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: 671.4280.

化合物 **2b**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基正丙酯, 白色固体, 收率 79.0%,

m.p. 186~188 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.67 (s, 1H), 4.50~3.75 (m, 8H), 3.29 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.22 (dd, $J=5.6, 10.8$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.27~1.17 (m, 16 H), 1.74 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.36 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.05~0.99 (m, 2H), 0.81 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.71~0.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.05, 198.39, 174.36, 169.17, 128.65, 78.74, 61.80, 54.94, 48.08, 45.27, 44.53, 44.02, 43.79, 43.29, 39.12, 37.70, 37.08, 32.96, 32.82, 31.80, 28.40, 28.10, 27.30, 26.95, 26.72, 26.39, 23.15, 21.99, 18.68, 17.49, 16.38, 15.59, 13.56; IR (KBr) ν_{max} : 3465 (-OH), 2963, 2868, 2243, 1653 (-HN-C=O), 1461 (-N-C(S)-S-), 1409, 1328, 1279, 1211 (C=S), 1163, 1084, 997, 948, 880, 750 cm^{-1} ; ESI-TOFMS m/z : 657.4128 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: 657.4124.

化合物 **2c**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基乙酯, 白色固体, 收率: 85.0%, m.p. 214~216 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.66 (s, 1H), 4.52~3.74 (m, 8H), 3.30 (dd, $J=7.4, 14.6$ Hz, 2H), 3.20 (dd, $J=5.6, 11.2$ Hz, 1H), 2.76 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 2.32 (s, 1H), 2.25~1.16 (m, 16 H), 1.34 (s, 6H), 1.22 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.03~0.96 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.69~0.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.06, 198.09, 174.37 (-C=O), 169.21, 128.60, 78.67, 61.78, 54.92, 50.02, 48.05, 45.26, 44.52, 44.01, 43.79, 43.27, 39.12, 37.69, 37.07, 32.92, 32.80, 31.79, 31.46, 29.67, 28.40, 28.11, 27.27, 26.93, 26.70, 26.37, 23.14, 18.68, 17.48, 16.37, 15.62, 13.65; IR (KBr) ν_{max} : 3465, 2965, 2867, 2360, 1652 (-HN-C=O), 1460 (-N-C(S)-S-), 1410, 1328, 1280, 1211 (C=S), 1164, 1085, 998, 948, 881, 753 cm^{-1} ; ESI-TOFMS m/z : 643.3950 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: 643.3967.

化合物 **2d**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基正戊酯, 白色固体, 收率: 88.3%, m.p. 134~136 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.66 (s, 1H), 4.46~3.75 (m, 8H), 3.30 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.22 (dd, $J=5.6, 11.2$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.19~1.17 (m, 20 H), 1.68 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 1.33 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.05~0.98 (m, 2H), 1.00 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.71~0.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.05, 198.41, 174.36 (-C=O), 169.18, 128.64, 78.72, 61.79, 54.93, 50.09, 48.07, 45.27, 44.59,

44.02, 43.79, 43.28, 39.12, 37.70, 37.26, 37.08, 32.95, 32.81, 31.80, 31.14, 29.69, 28.40, 28.20, 28.10, 27.29, 26.94, 26.71, 26.38, 23.15, 22.26, 18.68, 17.48, 16.38, 15.60, 13.96; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3464 (-OH), 2928, 2865, 2242, 1652, 1626 (-HN-C=O), 1461 (-N-C(S)-S-), 1411, 1280, 1212 (C=S), 1167, 1085, 1039, 1000, 913, 732 cm^{-1} ; ESI-TOFMS m/z : 685.4445 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: 685.4437.

化合物 **2e**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基烯丙酯, 淡黄色固体, 收率: 92.4%, m.p. 185~187 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.95~5.89 (m, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.32 (dd, $J=1.6, 17.2$ Hz, 1H), 5.18 (dd, $J=1.2, 11.6$ Hz, 1H), 4.48~3.75 (m, 10H), 3.23 (dd, $J=5.3, 10.2$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.29~1.21 (m, 16 H), 1.37 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.04~0.97 (m, 2H), 1.00 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.71~0.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.04, 197.28, 174.37 (-C=O), 169.16, 132.20, 128.65, 118.97, 78.74, 61.80, 54.94, 48.07, 45.28, 44.47, 44.02, 43.79, 43.29, 40.23, 39.13, 37.70, 37.08, 32.95, 32.82, 31.80, 28.40, 28.10, 27.30, 26.95, 26.72, 26.39, 23.15, 18.69, 17.49, 16.38, 15.59; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3471 (-OH), 2957, 2868, 2360, 1647 (-HN-C=O), 1461 (-N-C(S)-S-), 1410, 1279, 1214 (C=S), 1170, 1087, 998, 928, 754 cm^{-1} ; ESI-TOFMS m/z : 677.3777 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2\text{Na}$: 677.3786.

化合物 **2f**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基苄酯, 白色固体, 收率: 77.2%, m.p. 163~165 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.32~7.25 (m, 5H), 5.66 (s, 1H), 4.56 (s, 2H), 4.55~3.63 (m, 8H), 3.21 (dd, $J=5.2, 10.8$ Hz, 1H), 2.77 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.32 (s, 1H), 2.29~1.16 (m, 16 H), 1.35 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.02~0.97 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.70~0.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.05, 197.42, 174.37 (-C=O), 169.17, 135.56, 129.38, 128.64, 127.64, 78.72, 61.80, 54.94, 50.41, 48.07, 45.28, 44.37, 44.02, 43.79, 43.29, 42.14, 39.13, 37.70, 37.09, 32.94, 32.82, 31.80, 28.41, 28.11, 27.30, 26.95, 26.72, 26.39, 23.16, 18.69, 17.49, 16.39, 15.61; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3478 (-OH), 2953, 2867, 2350, 1651 (-HN-C=O), 1460 (-N-C(S)-S-), 1410, 1329, 1279, 1212 (C=S), 1165, 1080, 997, 947, 754 cm^{-1} .

化合物 **2g**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基环氧乙酯, 白色固体, 收率: 84.5%,

m.p. 217~219 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.66 (s, 1H), 3.91~3.33 (m, 10H), 3.22 (dd, $J=5.3, 10.4$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J=10.8$ Hz, 1H), 2.33 (s, 1H), 2.32~1.14 (m, 16 H), 1.35 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.04~0.98 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.70~0.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 208.70, 200.08, 174.28 (-C=O), 169.26, 128.62, 78.76, 61.81, 54.95, 50.41, 49.51, 48.22, 48.11, 45.29, 44.75, 44.04, 43.82, 43.29, 42.63, 39.13, 37.70, 37.09, 33.13, 32.82, 31.79, 28.41, 28.10, 27.30, 26.95, 26.71, 26.41, 23.16, 18.85, 17.48, 16.38, 15.59; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3475 (-OH), 2931, 2866, 2243, 1650 (-HN-C=O), 1459 (-N-C(S)-S-), 1409, 1280, 1203 (C=S), 1079, 1040, 1002, 914, 732 cm^{-1} .

化合物 **2h**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基异丁酯, 白色固体, 收率: 75.0 %, m.p. 146~148 $^{\circ}\text{C}$, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.65 (s, 1H), 4.54~3.73 (m, 8H), 3.20 (dd, $J=5.8, 8.6$ Hz, 3H), 2.76 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.31 (s, 1H), 2.25~1.16 (m, 17 H), 1.34 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96~0.95 (m, 2H), 0.79 (s, 3H), 0.78 (s, 3H), 0.69~0.66 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.04, 198.55, 174.36 (-C=O), 169.17, 128.63, 78.71, 61.79, 54.93, 49.79, 48.07, 45.84, 45.27, 44.54, 44.02, 43.79, 43.28, 39.12, 37.70, 37.08, 32.95, 32.81, 31.80, 29.68, 29.10, 28.40, 28.10, 27.99, 27.29, 26.94, 26.72, 26.38, 23.15, 22.12, 18.68, 17.48, 16.37, 15.60, 13.69; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3475 (-OH), 2958, 2868, 2358, 1650 (-HN-C=O), 1461 (-N-C(S)-S-), 1405, 1279, 1214 (C=S), 1170, 1080, 1001, 946, 755 cm^{-1} ; ESI-TOF MS m/z : 671.4273 $[\text{M} + \text{H}]^+$; calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: 671.4280.

化合物 **2i**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基仲丁酯, 白色固体, 淡黄色固体, 收率: 73.4%, m.p. 204~206 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.66 (s, 1H), 4.42~3.74 (m, 9H), 3.22 (dd, $J=5.2, 10.6$ Hz, 1H), 2.78 (d, $J=12.8$ Hz, 1H), 2.32 (s, 1H), 2.29~1.17 (m, 16 H), 1.68 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.02~0.95 (m, 2H), 1.00 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.70~0.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.13, 198.04, 174.44 (-C=O), 169.26, 128.73, 78.83, 61.89, 55.03, 49.24, 48.16, 45.36, 44.70, 44.11, 43.88, 43.37, 39.21, 37.79, 37.17, 33.05, 32.91, 31.89, 29.24, 28.49, 28.19, 27.39, 27.03, 26.81, 26.48,

23.24, 20.31, 18.77, 17.57, 16.46, 15.68; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3473 (-OH), 2963, 2867, 2360, 1649 (-HN-C=O), 1460 (-N-C(S)-S-), 1408, 1278, 1212 (C=S), 1172, 1080, 999, 946, 755 cm^{-1} .

化合物 **2j**: *N*-(4-18 β -甘草次酸-30-酰胺哌嗪-1-基)-氨基二硫代甲酰基乙酸甲酯, 白色固体, 收率: 88.0%, m.p. 198~200 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 5.66 (s, 1H), 4.38~3.70 (m, 13H), 3.21 (dd, $J=5.2, 10.4$ Hz, 1H), 2.76 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 2.32 (s, 1H), 2.30~1.15 (m, 16 H), 1.35 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.04~0.98 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.70~0.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.12, 195.93, 174.45 (-C=O), 169.21, 168.91, 128.75, 78.82, 61.88, 55.03, 52.96, 48.11, 45.36, 44.12, 43.93, 43.37, 39.21, 38.80, 37.79, 37.17, 32.95, 32.91, 31.89, 28.49, 28.19, 27.38, 27.03, 26.80, 26.46, 23.24, 18.77, 17.57, 16.46, 15.68; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 3474 (-OH), 2950, 2867, 2335, 1739, 1652 (-HN-C=O), 1460 (-N-C(S)-S-), 1412, 1365, 1280, 1210 (C=S), 1160, 1083, 1039, 998, 880, 754 cm^{-1} . ESI-TOF MS m/z : 687.3871 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$: 687.3865.

2 体外抗肝癌活性测试

由于受测试条件制约, 故前期随机选取化合物 **2f** 采用 MTT 法^[30]进行体外肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制活性测试的初步筛选. 取对数增殖期的 SMMC-7721 细胞, 以 1×10^4 个/mL 细胞密度接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μL . 培养 24 h 贴壁后加入浓度分别为 3.1, 6.2, 12.5, 25.0, 50.0 和 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 含目标化合物的灭菌 DMSO 溶液, 在收获细胞前 4 h, 弃孔内上清液, 每孔再加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 4 h. 每孔加入 150 μL 灭菌 DMSO, 避光放入培养箱中过夜, 使结晶物充分溶解. 用酶标仪测定 490 nm 处各孔吸光度值 (A_{490}), 以空白对照组调零, 实验平行重复 5 次, 取平均值. 不同浓度梯度下对肝癌细胞的抑制率数值见 Table 1.

由表可以看出, 化合物 **2f** 对 SMMC-7721 细胞株增殖起到了较好的抑制能力. 给药浓度达 100 $\mu\text{g/mL}$ 、作用 24 h, 抑制率可达 53.1%; 如若给药时间延长至 72 h 时, 抑制率可提升至 70.4%. 这可能表明该类抗肝癌活性化合物药效的发挥与作用的时间、浓度成正相关效应, 一定程度上呈现与时间、给药浓度的依赖性.

表 1 不同浓度化合物 **2f** 对 SMMC-7721 人肝癌细胞的抑制率
Table 1 Growth inhibition rates of SMMC-7721 cell lines with compounds **2f** at different concentrations

2f ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Inhibition rates/%		
	24 h	48 h	72 h
3.125	2.4	3.5	25.6
6.250	13.5	23.3	29.4
12.50	22.7	28.5	31.2
25.00	27.1	37.8	44.7
50.00	42.5	53.8	58.9
100.0	53.1	67.6	70.4

我们在倒置显微镜下进一步观察分别给药 **2f** 达 24 h、48 h、72 h 后, SMMC-7721 细胞形态变化 (详见 Figure 2). 发现用药后, 圆形 SMMC-7721 细胞呈现不同程度的晚期凋亡特征, 表现为染色质浓缩, 体积变小, 变形; 细胞核逐步裂解为碎块、最终产生凋亡小体. 随着药物作用时间的延长, 凋亡特征表现愈发显著. 通过空白对照组, 未给药的 SMMC-7721 细胞则仍具有完整细胞膜, 细胞株呈连片堆积增殖的恶性状态, 并且观察到这种诱导凋亡效果随抑制作用时间的延长而愈加显著.

图 2 化合物 **2f** 不同给药作用时间下, SMMC-7721 细胞形态变化及空白对照图

(A) 未给药作用下 SMMC-7721 细胞株形态; (B) 化合物 **2f** 给药 24 h 后 SMMC-7721 细胞株形态; (C) 化合物 **2f** 给药 48 h 后 SMMC-7721 细胞株形态; (D) 化合物 **2f** 给药 72 h 后 SMMC-7721 细胞株形态

Figure 2 Morphological changes of SMMC-7721 cells induced by **2f** in different intervals of time

(A) Normal SMMC-7721 cells; (B) morphological changes of cells induced by **2f**, 24 h; (C) morphological changes of cells induced by **2f**, 48 h; (D) morphological changes of cells induced by **2f**, 72 h

受初步活性测试结果的鼓舞, 我们继续开展了其它同系列化合物的活性测试研究工作. 除一个目标化合物

2e 由于溶解度差无法测试外, 其他目标化合物对人肝癌细胞株 SMMC-7721 均表现出较好的抑制活性. 为进一步客观评价新合成目标化合物的抗肝癌活性, 我们选取了起始先导化合物 18 β -甘草次酸做对比活性测试, 并应用非线性回归方法计算出了化合物 **2a~2j** 对 SMMC-7721 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)见 Table 2. 从表中数据我们可以看出, 随着抑制作用时间的延长, 合成目标化合物 **2a~2j** 半数抑制浓度较起始化合物 18 β -甘草次酸(GA)有明显提升; 同时, 从后续正在进行的研究发现, 进一步修饰后的化合物对正常细胞的毒副作用也有很好的改善. 较小的 IC₅₀ 值表明该类化合物具有较强选择性抑制人肝癌细胞增殖的细胞毒活性, 同时也预示着该类化合物具有潜在应用价值.

表 2 GA 和化合物 **2a~2j** 对 SMMC-7721 人肝癌细胞的半数抑制浓度

Table 2 *In vitro* anticancer activities against SMMC-7721 cell lines with compounds GA and **2a~2j**

Compound	IC ₅₀ /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
2a	44.40	74.52	26.97
2b	57.40	19.97	14.42
2c	74.59	22.93	24.29
2d	42.60	28.12	23.02
2e	*	*	*
2f	48.07	24.10	20.12
2g	58.07	25.42	23.83
2h	45.11	32.59	20.96
2i	34.09	22.31	24.09
2j	21.54	19.95	16.94
GA	53.50	43.31	34.49

The IC₅₀ values represent the compound concentration ($\mu\text{g/mL}$) required to inhibit tumor cell proliferation by 50%; “*” represents insoluble in DMSO.

3 结果与讨论

我们起初考虑采用 Azizi 等^[31]报道的在无溶剂、无催化剂条件下反应一步法构筑氨基二硫代甲酸酯片段结构, 参照相关文献报道, 也确证了我们设计的目标化合物的生成, 但收率极其低下, 仅为 20%~30%之间. 这对于天然产物的多步骤结构修饰改造而言是不合理, 也是不经济的. 为此, 我们在分析其反应机制后认为如何提高过渡态氨基二硫代甲酸结构中硫原子的亲核性是决定目标化合物收率大小的关键. 查阅相关资料, 我们参照李润涛等^[32]文献报道, 并在此基础上对比改进使用无水碳酸钾做缚酸剂, 最终很好地提高了目标化合物的收率, 有效地克服了甘草次酸五环三萜类骨架的空

间位阻影响; 且反应条件温和、速度快、后处理操作简便、可重复性强, 进一步拓宽了“一锅煮”法合成氨基二硫代甲酸酯类衍生物的适用底物胺、卤代烃的使用范围.

该类新颖结构的 18 β -甘草次酸氨基二硫代甲酸酯酰胺衍生物的合成及生物活性的研究, 国内外文献尚未见报道. 虽然, 对比一线抗肝癌临床化疗药物-阿霉素对人肝癌细胞株 SMMC-7721 的 IC₅₀ 值 0.223 $\mu\text{g/mL}$ ^[33], 我们合成的目标化合物抑制疗效存在一定的差距. 但从目前多次重复实验数据来看, 尚未发现有明显的耐药现象. 结合现有的初步研究成果, 如能进一步深入研究特别是考虑与阿霉素、5-氟尿嘧啶等协同作用, 诱导其多药耐药逆转, 这将为研制新型抗肝癌类联合药物提供重要的研究思路, 具有一定的理论指导意义. 该类化合物更大适用范围的抗癌活性测试以及毒、副作用的机制研究还在进一步探讨之中.

致谢 高分辨质谱分析由中科院昆明植物所和华东理工大学分析测试中心完成, 药物活性评价由宁夏大学西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室协作完成.

References

- Kao, T.-C.; Shyu, M.-H.; Yen, G.-C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8623.
- Wang, C.-Y.; Kao, T.-C.; Lo, W.-H.; Yen, G.-C. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7726.
- Maitraie, D.; Hung, C.-F.; Tu, H.-Y.; Liou, Y.-T.; Wei, B.-L.; Yang, S.-C.; Wang, J.-P.; Lin, C.-N. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2785.
- Subba-Rao, G. S. R.; Kondaiah, P.; Singh, S. K.; Ravanani, P.; Sporn, M. B. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11541.
- Um, S.-J.; Park, M.-S.; Park, S.-H.; Han, H.-S.; Kwon, Y.-J.; Sin, H.-S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 5345.
- Kao, T.-C.; Shyu, M.-H.; Yen, G.-C. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 754.
- Dehpour, A. R.; Zolfaghari, M. E.; Samadian, T.; Kobarfard, F.; Faizi, M.; Assari, M. *Int. J. Pharm.* **1995**, *119*, 133.
- Moro, T.; Shimoyama, Y.; Kushida, M.; Hong, Y. Y.; Nakao, S.; Higashiyama, R.; Sugioka, Y.; Inoue, H.; Okazaki, I.; Inagaki, Y. *Life Sci.* **2008**, *83*, 531.
- Lu, J.-R.; Hu, J.; Yang, S.; Yong, J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3372.
- Curreli, F.; Friedman-Kien, E. A.; Flore, O. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 642.
- Vodovozova, E. L.; Kuznetsova, N. R.; Gaenko, G. P.; Molotkovsky, J. G. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2007**, *33*, 436.
- Zhao, X.-J.; Fan, Y.-P.; Wang, D.-Y.; Hu, Y.-L.; Guo, L.-W.; Ruan, S.-L.; Zhang, J.; Yuan, J. *Vaccine* **2011**, *29*, 9611.

- 13 Lallemand, B.; Chaix, F.; Bury, M.; Bruyère, C.; Ghostin, J.; Becker, J.-P.; Delporte, C.; Gelbcke, M.; Mathieu, V.; Dubois, J.; Prévost, M.; Jabin, I.; Kiss, R. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6501.
- 14 Csuk, R.; Schwarz, S.; Siewert, B.; Kluge, R.; Ströhl, D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5356.
- 15 Liu, D.; Song, D.; Guo, G.; Wang, R.; Lv, J.-L.; Jing, Y.-K.; Zhao, L.-X. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5432.
- 16 Amra, A. E.-G. E.; Ali, K. A.; Abdalla, M. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 901.
- 17 René, C.; Stefan, S.; Ralph, K.; Csuk, R.; Schwarz, S.; Kluge, R.; Ströhl, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5718.
- 18 Nieuwenhuizen, P. J.; Ehlers, A. W.; Haasnoot, J. G.; Janse, S. R.; Reedijk, J.; Baerends, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 163.
- 19 Richard, W. H. *Lubr. Eng.* **2000**, *56*, 45.
- 20 Rhenals, M. V.; Strasberg-Rieber, M.; Rieber, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1627.
- 21 Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanello, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Maccà, C.; Trevisan, A.; Fregona, D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1648.
- 22 Caldas, E. D.; Hosana Conceição, M.; Miranda, M. C. C.; de Souza, L. K. R.; Lima, J. F. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4521.
- 23 Cheng, A.-C.; Huang, T.-C.; Lai, C.-S.; Kuo, J.-M.; Huang, Y.-T.; Lo, C.-Y.; Ho, C.-T.; Pan, M.-H. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4215.
- 24 Sharma, S.; Rashid, F.; Bano, B. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6027.
- 25 Horita, Y.; Takii, T.; Kuroishi, R.; Chiba, T.; Ogawa, K.; Kremer, L.; Sato, Y.; Lee, Y. S.; Hasegawa, T.; Onozaki, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 899.
- 26 Wang, X.-J.; Xu, H.-W.; Guo, L.-L.; Zheng, J.-X.; Xu, B.; Guo, X.; Zheng, C.-X.; Liu, H.-M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3074.
- 27 Pedras, M. S. C.; Minic, Z.; Hossain, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 225.
- 28 Gao, D.; Scholz, F.; Nothofer, H.-G.; Ford, W. E.; Scherf, U.; Wessels, J. M.; Yasuda, A.; Wrochem, F. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5921.
- 29 Fox, O. D.; Cookson, J.; Wilkinson, E. J. S.; Drew, M. G. B.; MacLean, E. J.; Teat, S. J.; Beer, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6990.
- 30 Wei, M.-X.; Feng, L.; Li, X.-Q.; Zhou, X.-Z.; Shao, Z.-H. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3340.
- 31 Azizi, N.; Aryanasab, F.; Saidi, M. R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5275.
- 32 Li, R.-T.; Ge, Z.-M.; Cheng, T.-M.; Cai, M.-S. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, *20*, 1897 (in Chinese).
(李润涛, 葛泽梅, 程铁明, 蔡孟深, 高等学校化学学报, **1999**, *20*, 1897.)
- 33 Feng, W.-Y.; He, B.; Zhou, L.-M. *Chin. Tradit. Pat. Med.* **2010**, *32*, 189 (in Chinese).
(冯文宇, 何兵, 周黎明, 中成药, **2010**, *32*, 189.)

(A1111051 Cheng, F.)