四氢吡啶并[4,3-*d*]二氢嘧啶酮衍生物的合成及其初步抗癌活性测定

王晶 丁丽 肖笛 薛思佳*

(a 上海师范大学生命与环境科学学院化学系 上海 200234)

摘要 为寻找新型抗癌药物的先导化合物, 设计合成了 16 种未见文献报道的四氢吡啶并[4,3-*d*]二氢嘧啶酮衍生物 **2a**~**2p**, 结构经 ^1H NMR, IR, MS, 元素分析确证. 初步的生物活性测试结果表明, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 目标化合物对白血病 K562 细胞的增殖表现出显著的抑制活性, 对卵巢癌 HO-8910 和肝癌 SMMC-7721 细胞系的增殖也表现出一定的抑制活性.

关键词 四氢吡啶并[4,3-*d*]二氢嘧啶酮; 衍生物; 合成; 白血病 K562; 抗癌活性

Synthesis and Preliminary Anticancer Activity Evaluation of Tetrahydropyrido[4,3-*d*]dihydropyrimidine-2-one Derivatives

Wang, Jing Ding, Li Xiao, Di Xue, Sijia*

(a College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

Abstract In search of more effective anticancer agents, sixteen novel tetrahydropyrido[4,3-*d*]dihydropyrimidine-2-one derivatives **2a**~**2p** were synthesized by reacting *N*-(4-substituted benzyl)-3,5-bisbenzylidene-4-piperidone with urea in EtONa/EtOH under reflux condition. The structures were confirmed by ^1H NMR, IR, MS and elemental analysis. The preliminary bioassay indicated that some title compounds exhibited good antiproliferative activities against K562 cells, certain antiproliferative activities against ovarian cancer HO-8910 cells and liver cancer SMMC-7721 cells.

Keywords tetrahydropyrido[4,3-*d*]dihydropyrimidine-2-one; derivative; synthesis; leukemic K562 cells; anticancer activities

癌症是当今世界上死亡率最高的疾病之一, 它对人类的健康造成了极严重的危害. 据世界卫生组织(WHO)统计资料表明, 每年全世界癌症发病约 1000 万人, 死亡约 700 万人. 我国癌症发病人数在 120 万左右, 每年死于癌症的人数高达 90 万人以上^[1], 目前, 对于大部分癌症均缺乏特效的治疗手段, 仍然采用多种细胞毒性药物联合化疗的方法来治疗这种恶性疾患. 化疗仅能通过大量杀伤高度增殖的癌细胞而使患者得到短期缓解, 但无法根治这种恶性疾患. 且由于目前所用的化疗药物多缺乏特异性, 所以毒副作用很大. 更棘手的是, 大多数复发患者对现有的化疗药物产生耐药性^[2,3]. 为此, 新型抗癌药物的研究势在必行, 仍为世界范围内各国生物和医药研究的热点和重点^[1,4].

据文献报道^[6~12], 吡啶并嘧啶类化合物具有高效抑

制多种癌细胞的生物活性, 在新药创制领域具有重要的研究价值. 前期^[5]研究表明, *N*-取代苄基-3,5-二苄亚甲基-4-哌啶酮类化合物(Scheme 1)能高效抑制白血病 K562 细胞系增殖, 其抑制白血病 K562 细胞系增殖的 IC_{50} (0.16~0.20 $\mu\text{mol/L}$), 明显低于常规化疗药物 5-氟尿嘧啶(IC_{50} 126 $\mu\text{mol/L}$), 具有进一步深入研究的意义. 为寻找新型抗癌药物的先导化合物, 本文以 *N*-取代苄基-3,5-二苄亚甲基-4-哌啶酮为先导结构, 对其进行衍生化反应的研究. 从 *N*-取代苄基-3,5-二苄亚甲基-4-哌啶酮出发, 经与尿素反应, 制备了一系列未见文献报道的四氢吡啶并[4,3-*d*]二氢嘧啶酮衍生物 **2a**~**2p**. 目标化合物抑制白血病 K562 细胞、卵巢癌 HO-8910 细胞以及肝癌 SMMC-7721 细胞等 3 种癌细胞系增殖的测定结果表明, 大部分目标物能高效抑制白血病 K562 细胞增殖,

* E-mail: sjxue@shnu.edu.cn

Received June 6, 2012; revised June 27, 2012; published online July 4, 2012.

Project supported by the Key Scientific "Twelfth Five-Year" National Technology Support Program (No. 2011BAE06B01-17), and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21042010, 21102092, 30870560).

“十二五”国家科技支撑计划(No. 2011BAE06B01-17)、国家自然科学基金(Nos. 21042010, 21102092, 30870560)资助项目.

并能有效抑制卵巢癌 HO-8910 细胞以及肝癌 SMMC-7721 细胞等两种癌细胞系的增殖. 目标化合物的结构和合成路线见 Scheme 2.

Scheme 1

$R^1=4\text{-CH}_3, 4\text{-F}, 3\text{-F}, 2\text{-F}; R^2=4\text{-F}, 3\text{-F}, 4\text{-Cl}, 2\text{-Cl}, 4\text{-H}, 4\text{-CH}_3, 4\text{-CH}(\text{CH}_3)_2, 4\text{-OCH}_3$

Reagents and conditions: (a) methyl acrylate, absolute methanol, reflux; (b) sodium/absolute methanol, toluene, reflux; (c) 25% HCl, reflux; (d) 35% sodium hydroxide, r.t.; (e) substituted aromatic aldehyde, 10% sodium hydroxide, absolute ethanol, r.t.; (f) urea, sodium ethoxide, absolute ethanol, reflux

Scheme 2

表 1 目标化合物抑制白血病 K562, HO-8910 和 SMMC-7721 细胞系增殖的抑制率

Table 1 Growth inhibition percentage of 2a~2p to K562cells, HO-8910 cells and SMMC-7721cells

Compd.	R^1	R^2	Leukemic K562/%	HO-8910/%	SMMC-7721/%
2a	4-Me	4-F	78.9	68.2	35.9
2b	4-Me	3-F	76.4	65.5	34.7
2c	4-Me	4-Cl	79.1	69.8	38.3
2d	4-Me	2-Cl	77.6	68.6	36.5
2e	4-Me	4-H	79.3	71.9	41.5
2f	4-Me	4-CH ₃	82.2	73.8	43.3
2g	4-Me	4-CH(CH ₃) ₂	87.4	79.5	48.7
2h	4-F	4-F	76.8	68.3	38.5
2i	4-F	3-F	75.9	66.2	36.4
2j	4-F	4-Cl	78.5	69.1	40.8
2k	4-F	2-Cl	77.2	69.7	40.4
2l	4-F	4-H	78.8	70.2	41.6
2m	4-F	4-CH ₃	81.3	70.8	43.6
2n	4-F	4-OCH ₃	85.2	79.8	53.2
2o	3-F	4-CH ₃	63.6	58.2	32.3
2p	2-F	4-CH ₃	65.3	60.1	35.6

1 结果与讨论

1.1 目标化合物抑制白血病 K562, 卵巢癌 HO-8910 和肝癌 SMMC-7721 等 3 种细胞系增殖的活性

用噻唑蓝比色(MTT)法测定目标化合物 2a~2p 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制白血病 K562 细胞、卵巢癌 HO-8910 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞 3 种癌细胞系增殖的抑制率见表 1, 相应的抑制百分率柱状图见图 1.

由表 1 和图 1 可知, 目标化合物 2a~2p 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 能高效抑制白血病 K562 细胞系的增殖, 并能有效抑制卵巢癌 HO-8910 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞 2 种癌细胞系的增殖. 在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 目标化合物对白血病 K562 细胞系增殖的抑制率几乎都超过常规的抗癌化疗药 5-氟尿嘧啶(71.2%).

目标化合物苯环上的取代基对其生物活性具有明显的影响. 当 R^2 相同时, R^1 为甲基的目标物, 对上述 3 种癌细胞系增殖的抑制率均高于 R^1 为氟的目标物; 当 R^1 相同时, R^2 为给电子基的目标化合物的抑制率明显高于 R^2 为吸电子基的目标物. 例如 $R^1=\text{CH}_3$ 时, 化合物对上述 3 种癌细胞的抑制率按如下顺序依次 $R^2=4\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ (2g) > $R^2=4\text{-CH}_3$ (2f) > $R^2=4\text{-H}$ (2e) > $R^2=4\text{-Cl}$ (2c) > $R^2=4\text{-F}$ (2a).

目标化合物中 N -取代苯基 R^1 的位置对其生物活性具有明显的影响. 当 R^2 相同时, R^1 为对位取代的目标物, 对上述三种癌细胞系增殖的抑制率均高于 R^1 为邻、间位取代的目标物(例如 2m > 2o, 2p).

图1 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时目标化合物抑制白血病 K562, HO-8910 和 SMMC-7721 细胞系增殖的抑制百分率

Figure 1 Growth inhibition percentage of 2a~2p to K562 cells, HO-8910 cells and SMMC-7721 cells at 100 $\mu\text{g/mL}$

1.2 目标化合物抑制白血病 K562 细胞系增殖的活性

用 Leica DMI400B 显微镜观察目标化合物 **2g** 抑制白血病 K562 细胞增殖的效果图如图 2 所示. 图 3 是在目标化合物 **2g** 的作用下, 用倒置荧光显微镜观察白血病 K562 细胞凋亡的凋亡形态图.

对比图 2 中 A, B, C 可清楚地看到, 在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 白血病 K562 细胞培养 44 h 后, 其数量明显增加(图 2B); 图 2C 是加入化合物 **2g**, 培养 44 h 后, 白血

病 K562 细胞的数量. 由图 2C 可清楚地看到, 在化合物 **2g** 的作用下, 白血病 K562 细胞的数量明显减少, 说明化合物 **2g** 具有抑制白血病 K562 细胞系增殖的活性.

化合物 **2g** 使白血病 K562 细胞凋亡的凋亡形态图(图 3)进一步表明, **2g** 具有抑制白血病 K562 细胞系增殖的活性. 在 **2g** 的作用下, 肿瘤细胞皱缩出芽、核裂解及凋亡小体形成(图 3B, C). 上述形态学的改变, 损伤或破坏了 K562 细胞线粒体和细胞核的正常结构, 从而影

图2 化合物 **2g** 抑制白血病 K562 细胞系增殖图

Figure 2 Growth inhibition of **2g** to leukemic K562 cells

(A) K562 cells before cultured; (B) K562 cells were cultured for 44 h; (C) K562 cells were cultured with compound **2g** for 44 h

图3 化合物 **2g** 使白血病 K562 细胞凋亡的凋亡形态图

Figure 3 Apoptotic diagram of **2g** to leukemic K562 cells

(A) Normal K562 cells; (B) Nuclei shrinkage of K562 cells; (C) Nuclei cracking of K562 cells

响了细胞的正常功能,有效地抑制了白血病 K562 细胞增殖。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

Bruker Avance 400 型超导核磁仪(TMS 为内标, DMSO- d_6 为溶剂); Nicolet AVATAR-370DTGS 型红外光谱仪(KBr 压片); Agilent Triple Quad LC/MS 6410B 型液相色谱质谱联用仪; 2400 型分析仪; XT4A 显微熔点仪; Bio-RAD 680 型酶标仪; 显微镜为日本尼康(Nikon)公司 810818 型; 温度计和压力计均未经校正。MTT 为 Sigma Aldrich 公司产品; 人白血病 K562 细胞, 卵巢癌 HO-8910 细胞以及肝癌 SMMC-7721 细胞均购于上海中国科学院细胞库。其余所用试剂均为市售化学纯或分析纯, 甲苯使用前新蒸。化合物 *N*-取代苄基-3,5-二苄亚甲基-4-哌啶酮(**1a**~**1p**)按文献[5]方法合成。

2.2 目标化合物 2a~2n 的合成

以 4-对氟苄基-6-对甲基苄基-8-对氟苄亚甲基-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2a**)的合成^[13,14]为例。

向 25 mL 干燥的圆底烧瓶中加入 0.002 mol 乙醇钠和 8 mL 无水乙醇, 待其溶解后再加入 0.002 mol *N*-对甲基苄基-3,5-二对氟苄亚甲基哌啶-4-酮(**1a**)和 0.004 mol 脲, 回流反应约 8 h, 薄层色谱(TLC)跟踪反应进程。反应结束后冷却至室温, 旋去溶剂, 选用乙酸乙酯和石油醚(*V*:*V*=1:3)对产物进行柱色谱分离提纯, 得到目标化合物 **2a**。

4-(4-氟苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(4-氟苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2a**): 黄色固体, 产率 80%。m.p. 177~178 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.33 (s, 1H), 7.15~7.01 (m, 13H), 4.83 (s, 1H), 3.43~3.32 (m, 4H), 3.02 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.60 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H); IR (KBr) ν : 3400, 1714, 1600, 1582, 1506, 1462, 834 cm^{-1} ; MS (ESI) *m/z*: 457 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: C 73.51, H 5.51, N 9.18; found C 73.48, H 5.53, N 9.17.

4-(3-氟苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(3-氟苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2b**): 黄色固体, 产率 73%。m.p. 178~179 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.36 (s, 1H), 7.12~6.89 (m, 13H), 4.84 (s, 1H), 3.45~3.28 (m, 4H), 3.02 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.60 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H); IR (KBr) ν : 3400, 1714, 1600, 1506, 1462, 834 cm^{-1} ; MS (ESI) *m/z*: 457 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: C 73.51, H 5.51, N 9.18; found C 73.48, H 5.53, N 9.17.

4-(4-氯苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(4-氯苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2c**): 黄色固体, 产率 75%。m.p. 184~186 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.37 (s, 1H), 7.84~6.43 (m, 13H), 4.84 (s, 1H), 3.58~3.38 (m, 4H), 3.03 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.59 (d, *J*=16.1 Hz, 1H), 2.26~2.11 (m, 3H); IR (KBr) ν : 3411, 1703, 1601, 1496, 1453, 825 cm^{-1} ; MS (ESI) *m/z* 490 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$: C 68.57, H 5.14, N 8.57; found C 68.58, H 5.17, N 8.56.

4-(2-氯苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(2-氯苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2d**): 黄色固体, 产率 72%。m.p. 185~187 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.57 (s, 1H), 7.47~6.92 (m, 13H), 5.30 (d, *J*=1.84 Hz, 1H), 3.40~3.33 (m, 4H), 3.13 (d, *J*=14.0 Hz, 1H), 2.61 (d, *J*=16.3 Hz, 1H), 2.26~2.19 (m, 3H); IR (KBr) ν : 3420, 1697, 1600, 1578, 1532, 1499, 827 cm^{-1} ; MS (ESI) *m/z*: 490 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$: C 68.57, H 5.14, N 8.57; found C 68.55, H 5.17, N 8.58.

4-苄基-6-(4-甲基苄基)-8-苄亚甲基-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2e**): 白色固体, 产率 78%。m.p. 118~120 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.32 (s, 1H), 7.39~6.97 (m, 15H), 4.80 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 3.38 (s, 4H), 3.04 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.63 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H); IR (KBr) ν : 3409, 1687, 1598, 1558, 1506, 1472, 825 cm^{-1} . Anal. calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}$: C 79.78, H 6.46, N 9.97; found C 79.81, H 6.45, N 9.95.

4-(4-甲基苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(4-甲基苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2f**): 黄色固体, 产率 87%。m.p. 185~187 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.25 (s, 1H), 7.22~6.89 (m, 13H), 4.74 (s, 1H), 3.37 (s, 4H), 3.00 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.60 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 2.40~2.08 (m, 9H); IR (KBr) ν : 3407, 1699, 1604, 1565, 1514, 1487, 819 cm^{-1} . Anal. calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}$: C 80.14, H 6.95, N 9.35; found C 80.11, H 6.96, N 9.37.

4-(4-异丙基苄基)-6-(4-甲基苄基)-8-(4-异丙基苄亚甲基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2g**): 黄色固体, 产率 71%。m.p. 172~174 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.29 (s, 1H), 7.25~6.90 (m, 13H), 4.74 (s, 1H), 3.57~3.36 (m, 4H), 3.01 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 2.91~2.79 (m, 2H), 2.64 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 1.20 (t, *J*=7.0 Hz, 12H); IR (KBr): 3418, 1645, 1600, 1578, 1452, 1421, 858 cm^{-1} ; MS (ESI) *m/z*: 505 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Anal. calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$: C 80.75, H 7.77, N 8.31;

found C 80.73, H 7.78, N 8.31

4-(4-氟苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(4-氟苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2h**): 黄色固体, 产率 66%. m.p. 115~117 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.25 (s, 1H), 7.79~6.73 (m, 13H), 4.36 (t, *J*=5.0 Hz, 1H), 3.95~3.39 (m, 4H), 3.16 (d, *J*=5.2 Hz, 1H), 2.74 (d, *J*=36.5 Hz, 1H); IR (KBr) ν: 3406, 1683, 1601, 1580, 1496, 1453, 820 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 461 ([M+H]⁺). Anal. calcd for C₂₇H₂₂F₃N₃O: C 70.27, H 4.81, N 9.11; found C 70.25, H 4.80, N 9.13.

4-(3-氟苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(3-氟苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2i**): 黄色固体, 产率 63%. m.p. 135~137 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.35 (s, 1H), 7.30~7.14 (m, 13H), 4.36 (s, 1H), 3.80~3.41 (m, 4H), 3.25 (s, 1H), 2.68 (s, 1H); IR (KBr) ν: 3411, 1643, 1601, 1582, 1496, 1453, 821 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 461 ([M+H]⁺). Anal. calcd for C₂₇H₂₂F₃N₃O: C 70.27, H 4.81, N 9.11; found C 70.26, H 4.80, N 9.10.

4-(4-氯苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(4-氯苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2j**): 白色固体, 产率 70%. m.p. 220~222 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.37 (s, 1H), 7.84~6.43 (m, 13H), 4.84 (s, 1H), 3.58~3.38 (m, 4H), 3.03 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.59 (d, *J*=16.1 Hz, 1H); IR (KBr) ν: 3410, 1703, 1609, 1578, 1521, 1498, 820 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₇H₂₂Cl₂FN₃O: C 65.59, H 4.49, N 8.50; found C 65.58, H 4.51, N 8.51.

4-(2-氯苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(2-氯苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2k**): 黄色固体, 产率 73%. m.p. 10~112 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.58 (s, 1H), 7.48~6.93 (m, 13H), 5.31 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 3.38~3.34 (m, 4H), 3.09 (d, *J*=17.0 Hz, 1H), 2.61 (d, *J*=16.3 Hz, 1H); IR (KBr) ν: 3427, 1703, 1601, 1586, 1507, 1467, 858 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₇H₂₂Cl₂FN₃O: C 65.59, H 4.49, N 8.50; found C 65.55, H 4.47, N 8.51.

4-苯基-6-(4-氟苄基)-8-苄基-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2l**): 白色固体, 产率 75%. m.p. 120~122 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.35 (s, 1H), 7.36~6.95 (m, 15H), 4.83 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 3.33 (s, 4H), 3.01 (d, *J*=16.2 Hz, 1H), 2.67 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); IR (KBr) ν: 3409, 1687, 1598, 1558, 1506, 1472, 825 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₇H₂₄N₃O: C 76.21, H 5.69, N 9.88; found C 76.22, H 5.71, N 9.85.

4-(4-甲基苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(4-甲基苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2m**): 黄色固体, 产率 80%. m.p. 218~220 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.26 (s, 1H), 7.44~6.59 (m, 13H), 4.74 (s, 1H), 3.40 (s, 4H), 3.01 (d, *J*=15.8, 1H), 2.60 (d, *J*=16.2, 1H), 2.29 (d, *J*=9.7 Hz, 6H); IR (KBr) ν: 3418, 1701, 1587, 1518, 1487, 1457, 858 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₉H₂₈FN₃O: C 76.80, H 6.22, N 9.26; found C 76.82, H 6.23, N 9.23.

4-(4-甲氧基苯基)-6-(4-氟苄基)-8-(4-甲氧基苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2n**): 黄色固体, 产率 79%. m.p. 169~171 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.23 (s, 1H), 7.21~6.82 (m, 13H), 4.73 (s, 1H), 3.75 (d, *J*=2.0 Hz, 6H), 3.46~3.32 (m, 4H), 2.98 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 2.60 (d, *J*=15.9 Hz, 1H); IR (KBr) ν: 3410, 1732, 1614, 1558, 1510, 1448, 858 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₉H₂₈FN₃O₃: C 71.74, H 5.81, N 8.65; found C 71.77, H 5.80, N 8.63.

4-(4-甲基苯基)-6-(3-氟苄基)-8-(4-甲基苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2o**): 黄色固体, 产率 56%. m.p. 217~228 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.27 (s, 1H), 7.48~6.63 (m, 13H), 4.77 (s, 1H), 3.41 (s, 4H), 3.00 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 2.64 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 2.29 (d, *J*=9.4 Hz, 6H); IR (KBr) ν: 3420, 1701, 1582, 1521, 1487, 1455, 848 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₉H₂₈FN₃O: C 76.80, H 6.22, N 9.26; found C 76.83, H 6.21, N 9.23.

4-(4-甲基苯基)-6-(2-氟苄基)-8-(4-甲基苄基)-1,2,5,6-四氢吡啶并[4,3-*d*]-3,4-二氢嘧啶-2-酮(**2p**): 黄色固体, 产率 61%. m.p. 218~219 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.28 (s, 1H), 7.42~6.58 (m, 13H), 4.74 (s, 1H), 3.41 (s, 4H), 3.03 (d, *J*=15.5 Hz, 1H), 2.62 (d, *J*=16.3 Hz, 1H), 2.31 (d, *J*=9.8 Hz, 6H); IR (KBr) ν: 3416, 1703, 1585, 1519, 1487, 1452, 852 cm⁻¹. Anal. calcd for C₂₉H₂₈FN₃O: C 76.80, H 6.22, N 9.26; found C 76.82, H 6.24, N 9.24.

2.3 目标化合物的抗癌活性测试

采用标准的噻唑蓝比色法, 测定目标化合物抑制白血病 K562 细胞, 卵巢癌 HO-8910 细胞, 肝癌 SMMC-7721 细胞等 3 种癌细胞系增殖的抑制活性(%)^[15].

实验在 96 孔板中进行, 体系含 1×10⁵ 细胞及 300 μg/mL 的目标化合物全培养液. 每孔总体积 100 μL, 设置药物颜色对照孔(不含细胞)和含细胞与药物的培养孔, 分别培养 44 h 后, 在各孔中加入 MTT (5 mg/mL, 10

μL), 继续培养 4 h, 再加入 10% SDS 100 μL 终止反应, 37 °C 过夜, 用酶联免疫检测各孔在 570 nm 的吸光度 A 值. 并依下式计算目标化合物对白血病 K562 细胞, 卵巢癌 HO-8910 细胞, 肝癌 SMMC-7721 细胞等 3 种癌细胞系增殖的抑制率(%).

$$\text{抑制率} = \frac{A(\text{对照}) - A(\text{实验})}{A(\text{对照})} \times 100\%$$

致谢 委托上海师范大学动物细胞-分子生物学实验室, 合作完成了目标化合物的抗癌活性测定.

References

- [1] Zhou, Y.-Y.; Guo, Q.-H.; Gu, X.-X. *Chin. J. Chem. Educ.* **2004**, (5), 10 (in Chinese).
(周勇义, 郭启华, 古学新, 化学教育, **2004**, (5), 10.)
- [2] Jamieson, C. H.; Ailles, L. E.; Dylla, S. J.; Muijtjens, M.; Jones, C.; Zehnder, J. L.; Gotlib, J.; Li, K.; Manz, M. G.; Keating, A.; Sawyers, C. L.; Weissman, I. L. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*(7), 657.
- [3] Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Gentle, C.; Gottesman, M. M. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 219.
- [4] O'Connor, R. *Curr. Cancer Drug Targets* **2009**, *9*, 273.
- [5] Wang, J.; Meng, W.; Ni, Z. J.; Xue, S. J. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 2421.
- [6] Perez-Rebolledo, A.; Ayala, J. D.; de Lima, G. M.; Marchini, N.; Bombieri, G.; Zani, C. L.; Souza-Fagundes, E. M.; Beraldo, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 467.
- [7] Liu, X.; Go, M.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 153.
- [8] Huang, S. L.; Lin, R. H.; Yu, Y.; Lu, Y. H.; Peter, J. C.; George, C.; Li, S. J.; Stuart, L. E.; Steven, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1243.
- [9] Bazgira, A.; Khanaposhtani, M. M.; Soorki, A. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5800.
- [10] Nair, V.; Chi, G.; Shu, Q.; Julander, J.; Smee, D. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1425.
- [11] Fang, Z. K.; Xue, S. J.; Chen, L.; Xu, Y.; Yin, A. Q.; Li, C. Y. *Chin. J. Chem.* **2009**, *27*, 397.
- [12] Tu, S. J.; Han, Z. G.; Miao, C. B.; Shi, F.; Ma, N.; Zhang, G. J. *Comb. Chem.* **2010**, *12*, 16.
- [13] El-Subbagh, H. I.; Abu-Zaid, S. M.; Mahran, M. A.; Badria, F. A.; Al-Obaid, A. M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2915.
- [14] Al-Omar, M. A.; Youssef, K. M.; El-Sherbeny, M. A.; Awadalla, S. A. A.; El-Subbagh, H. I. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, *338*, 175.
- [15] Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. J. *Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203.

(Qin, X.)