山荷叶素异羟肟酸和硫醇衍生物的合成与抑制肿瘤细胞增殖活性

赵育 倪春燕 张虞婷 朱俐*

(南通大学航海医学研究所 南通 226001)

摘要 通过药效团整合策略将天然抗肿瘤活性木脂素山荷叶素与组蛋白去乙酰化酶抑制剂的药效团长链异羟肟酸或长链硫醇进行拼合,得到了7个未见文献报道的山荷叶素衍生物,通过核磁共振氢谱、碳谱、高分辨质谱等方法进行了结构表征,并采用了噻唑蓝法(MTT)法对这些化合物的体外抑制肿瘤细胞增殖活性进行了测试,异羟肟酸类衍生物具有较强的活性。

关键词 山荷叶素; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 抗肿瘤; 合成

Synthesis and Antiproliferatory Activity of Novel Diphyllin Hydroxamic Acid and Mercaptan Derivatives

Zhao, Yu Ni, Chunyan Zhang, Yuting Zhu, Li*

(Institute of Nautical Medicine, Nantong University, Nantong 226001)

Abstract Seven novel diphyllin derivatives have been synthesized by incorporating histone deacetylase inhibitory functional groups into diphyllin. The structures were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HRMS. Their antiproliferative activity against three human cancer cell lines was investigated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

Keywords diphyllin; histone deacetylase inhibitors; antitumor; synthesis

组蛋白的可逆乙酰化是调节多种蛋白活性的转录后修饰的重要过程。组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACI)可以使染色质组蛋白乙酰化水平提高,导致特定基因表达激活,相应地导致细胞的末端分化或癌细胞的凋亡,因此组蛋白去乙酰化酶(HDAC)已成为抗肿瘤药物研究领域重要的靶标^[1,2]。目前上市 HDACI SAHA (*N*-羟基-*N'*-苯基辛二酰胺)为广谱 HDACI,具有明显的胃、血液、心脏以及神经毒性。随着人们对 HDAC 认识的不断深入,目前研究热点已经转向具有亚型选择性的 HDACI 和与具有多靶点作用的 HDACI^[3-8]。

山荷叶素(diphyllin)是具有4位羟基的一种萜基木脂素,研究表明山荷叶素的衍生物具有优异的抗肿瘤活性,其作用机制与抑制拓扑异构酶 II (Topo II)和影响微管组装有关^[9,10]。随着对肿瘤信号转导通路研究的不断深入,人们发现通过单一肿瘤靶点的抑制难以达到理想的阻断肿瘤发生发展通路的效果,因此作用于多靶点的抗肿瘤药物引起高度关注。研究表明同时抑制 HDAC

和 Topo II 具有明显的协同增效作用^[11]。我们采用药效团整合策略将 diphyllin 和 HDACI 的药效团进行整合,以 diphyllin 作为 HDACI 的 CAP 区,分别以异羟肟酸和硫醇^[12]作为锌离子螯合基团(ZBG),设计并合成两类多靶点 HDACI 抑制剂 1~7,实现多靶点抗肿瘤的目的(见图 1)。

1 结果与讨论

1.1 化学合成

异羟肟酸类衍生物的合成是将山荷叶素与溴代脂肪酸乙酯在 K_2CO_3 和相转移催化剂四丁基碘化铵(TBAI)的作用下成醚 8~11,然后在 LiOH 的作用下酯基水解,得到酸 12~15,最后采用 2-(7-偶氮苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)和 *N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA)的缩合体系,将酸与盐酸羟胺缩合得到异羟肟酸 1~4(图 2)。我们首先采用中间体 8~11 直

* E-mail: zhulili65@163.com

Received August 31, 2012; revised September 24, 2012; published online October 9, 2012.

Project supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011390) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

江苏省自然科学基金(No. BK2011390)、江苏省高校优势学科(PAPD)资助项目。

图1 目标化合物异羟肟酸 1~4 与硫醇 5~7
Figure 1 Hydroxamic acids 1~4 and mercaptans 5~7

图2 山荷叶素异羟肟酸衍生物 1~4 的合成
Figure 2 Synthesis of hydroxamic acids diphyllin derivatives 1~4

接在甲醇中与现场制备的羟胺进行的氨解反应来制备目标化合物异羟肟酸, 反应过程中发现由于该中间体在甲醇中溶解性较差, 氨解反应不能顺利进行. 于是采用了先酯水解得到酸, 然后在缩合剂的作用下进行缩合, 顺利地制备得到目标化合物 1~4.

硫醇类衍生物的合成是将山荷叶素与二溴烷烃在 K_2CO_3 的作用下生成醚 16~18. 然后与硫代乙酸钾发生取代反应, 得到硫代乙酸酯 19~21, 最后在碱性条件下脱除乙酰基, 得到目标化合物 5~7(图 3)在最后一步脱除乙酰基的反应中发现, 山荷叶素的内酯结构在 NaOH , NaOMe 等碱的作用下中极易被破坏, 导致产率过低, 最后严格控制加入 NaOH 的量, 使反应体系碱性适中, 完成了乙酰基的脱除.

1.2 生物活性

我们以 TopoII 抑制剂 Etoposide 和抗微管药物紫杉醇(Paclitaxel)作为阳性对照, 选取对山荷叶素类化合物较为敏感的两中实体瘤细胞, 人结肠癌细胞 HCT116 和人非小细胞肺癌细胞 A549, 以及对紫杉醇耐药人非小细胞肺癌细胞 A549/T 三种肿瘤细胞进行了 MTT 测

试, 考察 7 个目标化合物抑制肿瘤细胞增殖活性(表 1).

表1 山荷叶素衍生物 1~7 对三种肿瘤细胞的增殖抑制活性
Table 1 Antiproliferatory activity against three cancer cell lines of diphyllin derivatives 1~7

Compd.	Cancer cells $\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	HCT116	A549	A549/T
1	10.3	14.1	8.3
2	8.1	10.4	7.8
3	1.2	6.9	7.3
4	7.5	8.1	7.8
5	>100	>100	>100
6	>100	>100	>100
7	>100	>100	>100
Paclitaxel	1.1	0.1	>100
Etoposide	13.5	21.4	85.8

MTT 测试结果表明, 山荷叶素异羟肟酸衍生物 1~4 对 HCT116, A549 细胞的抑制增殖活性比 Etoposide 更强, 但是比紫杉醇活性弱. 对于紫杉醇耐药细胞株 A549/T 的抑制增殖活性与 A549 细胞接近, 这表明这些化合物的抑制增殖机制与紫杉醇不同, 对紫杉醇耐药细胞同样有效. 这 4 个异羟肟酸衍生物对 HCT116 细胞的

图3 山荷叶素硫醇衍生物 5~7 的合成

Figure 3 Synthesis of mercaptans diphyllin derivatives 5~7

抑制增殖活性要强于 A549 细胞, 其中化合物 **3** 活性最好. 表明该类化合物抑制肿瘤细胞增殖的活性与连接臂的链长有关, 其中己酸衍生物的活性最佳, 丁酸衍生物活性最弱. 而山荷叶素硫醇衍生物 **5~7** 对于所测试的三种肿瘤细胞的抑制增殖活性都比较弱, 说明异羟肟酸取代基活性优于硫醇取代基. 这 7 个化合物对三种肿瘤细胞的增殖抑制没有明显的选择性.

2 结论

我们以山荷叶素为原料, 合成了异羟肟酸和硫醇两类共 7 个山荷叶素衍生物. 并对这些化合物进行了结构确证. MTT 实验表明, 山荷叶素异羟肟酸衍生物对所测试的三种肿瘤细胞都具有一定的抑制增殖活性, 并对紫杉醇耐药细胞有效. 该类化合物抑制肿瘤细胞增殖的活性与连接臂的链长有关, 其中己酸衍生物的活性最佳, 丁酸衍生物活性最弱. 所合成的山荷叶素硫醇衍生物未显示出对所测试的肿瘤细胞的增殖抑制活性. 异羟肟酸类衍生物有必要进行进一步的药理学研究, 包括对 HDAC 酶的抑制活性以及荷瘤动物模型实验.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 采用 Bruker ARX-300 型核磁共振仪 (TMS 为内标) 测定; 质谱采用 Q-TOF Global Mass 质谱仪测定. 所用试剂均为市售化学纯或分析纯.

3.2 化合物合成

3.2.1 4-山荷叶素氧基烷酸乙酯(**8~11**)的合成

将 2 mmol diphyllin 溶于丙酮 60 mL 中, 依次加入 5 mmol K_2CO_3 , 0.2 mmol TBAI 和 4 mmol 溴代烷酸乙酯, 在 N_2 保护下于 56°C 反应 3 h. 反应结束后, 旋蒸除去溶剂丙酮, 用乙酸乙酯 30 mL 稀释残液, 去离子水洗涤 (50 mL $\times$ 3), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚) = 1 : 3] 得到固体.

4-山荷叶素氧基丁酸乙酯(**8**): 产率 62%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.52 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.95 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.80~6.76 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.07 (d, $J=14.4$ Hz, 2H, CH_2), 5.45 (s, 2H, CH_2), 4.27 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.18 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.06 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.78 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.63 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 2.26 (dd, $J=6.3, 12.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.24 (t, $J=6.9$ Hz, 3H, CH₃); ESI-MS m/z : 495 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-山荷叶素氧基戊酸乙酯(**9**): 产率 67%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.54 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.95 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.80~6.79 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.07 (d, $J=12.9$ Hz, 2H, 7'-CH₂), 5.46 (s, 2H, CH_2), 4.22 (t, $J=5.7$ Hz, 2H, CH_2), 4.11 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2), 4.05 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.88 (d, $J=5.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.79 (s, 3H, 7-OCH₃), 1.95 (s, 2H, CH_2), 1.56 (s, 2H, CH_2), 1.24 (t, $J=3.6$ Hz, 3H, CH₃); ESI-MS m/z : 509 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-山荷叶素氧基己酸乙酯(**10**): 产率 64%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.52 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.95 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.80~6.76 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.07 (dd, $J=1.2, 14.1$ Hz, 2H, CH_2), 5.46 (s, 2H, CH_2), 4.22 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.12 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.04 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.78 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.37 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.95 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.78 (t, $J=8.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.64 (q, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2), 1.25 (t, $J=3.6$ Hz, 3H, CH₃); ESI-MS m/z : 523 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-山荷叶素氧基庚酸乙酯(**11**): 产率 69%. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.53 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.95 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.81~6.79 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.07 (dd, $J=1.5, 14.4$ Hz, 2H, CH_2), 5.46 (s, 2H, CH_2), 4.20 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.12 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.04 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.79 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.31 (t, $J=7.5$ Hz, 2H, CH_2), 1.91 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, CH_2),

1.68 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.61 (t, $J=5.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.46 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH₂), 1.24 (t, $J=5.1$ Hz, 3H, CH₃); ESI-MS m/z : 537 [M+H]⁺.

3.2.2 山荷叶素异羟肟酸衍生物 1~4 的合成

将 1 mmol 4-山荷叶素氧基烷酸乙酯溶于 20 mL 甲醇中, 加入 10 mmol LiOH, 在 N₂ 保护下于 60 °C 搅拌 3 h, TLC 检测至反应结束. 旋蒸除去溶剂甲醇, 用水稀释, 1 mol·L⁻¹ HCl 酸化, 用 CH₂Cl₂ (50 mL×3) 萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 [V (二氯甲烷): V (甲醇)=40:1] 得 4-山荷叶素氧基烷酸, 直接进行下步缩合反应.

将 0.5 mmol 4-山荷叶素氧基烷酸, 0.5 mmol 2-(7-偶氮苯并三唑)- N,N,N',N' -四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)和 1 mmol N,N -二异丙基乙胺(DIPEA)溶于 10 mL 二氯甲烷(DCM)中, 待溶解后加入 0.75 mmol 盐酸羟胺, 室温反应 3 h. 反应结束后, 加入 10 mL CH₂Cl₂ 稀释, 水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩. 将产物用柱层析 [V (二氯甲烷): V (甲醇)=60:1] 纯化得异羟肟酸.

4-山荷叶素氧基丁酸羟胺(1): 白色固体, 两步产率 34%. m.p. 96~99 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.36 (s, 1H, 5-ArH), 6.84 (s, 1H, 8-ArH), 6.80 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.63~6.56 (m, 2H, 5',6'-ArH), 5.90 (d, $J=10.8$ Hz, 2H, CH₂), 5.34 (s, 2H, CH₂), 4.12 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.65 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.17 (s, 2H, CH₂), 2.01 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 171.3, 170.3, 151.5, 150.1, 147.4, 146.5, 134.3, 130.3, 128.2, 126.2, 125.4, 123.6, 118.7, 110.7, 107.9, 105.9, 101.3, 100.4, 66.9, 60.5, 56.1, 55.6, 29.7, 25.9; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 718, 806, 926, 1167, 1224, 1259, 1381, 1457, 1506, 1562, 1743, 2923, 3459 cm⁻¹; ESI-MS calcd for C₂₅H₂₂NO₉ (M⁺-H)⁻ 480.1372, found 480.1314.

4-山荷叶素氧基戊酸羟胺(2): 白色固体, 两步产率 30%. m.p. 92~94 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.50 (s, 1H, 5-ArH), 7.02 (s, 1H, 8-ArH), 6.94 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.79~6.77 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.07 (d, $J=12.3$ Hz, 2H, CH₂), 5.45 (s, 2H, CH₂), 4.22 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH₂), 4.03 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.77 (s, 3H, 7-OCH₃), 1.95 (s, 2H, CH₂), 1.84 (s, 2H, CH₂), 1.64 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 171.2, 170.1, 151.6, 150.2, 147.5, 147.4, 146.9, 134.4, 130.6, 128.5, 126.4, 125.4, 123.6, 119.1, 110.8, 108.1, 106.2, 101.3, 100.6, 72.3, 66.9, 56.1, 55.8, 32.5, 28.7, 25.1; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 719, 827, 926, 1168, 1229, 1258, 1453, 1505, 1556, 1748, 2927, 3452 cm⁻¹. ESI-MS calcd for C₂₆H₂₆NO₉ (M+H)⁺ 496.1607, found 496.1602.

4-山荷叶素氧基己酸羟胺(3): 白色固体, 两步产率 35%. m.p. 123~125 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.45 (s, 1H, 5-ArH), 6.98 (s, 1H, 8-ArH), 6.90 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.75~6.70 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.04 (d, $J=11.4$ Hz, 2H, CH₂), 5.40 (s, 2H, CH₂), 4.14 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, CH₂), 4.00 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.74 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.17 (s, 2H, CH₂), 1.87 (s, 2H, CH₂), 1.73 (s, 2H, CH₂), 1.57 (s, 2H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 171.1, 170.0, 151.5, 150.2, 147.5, 147.4, 146.9, 134.4, 130.5, 128.4, 126.4, 125.4, 123.6, 119.0, 110.7, 108.1, 106.1, 101.3, 100.5, 72.2, 66.9, 56.1, 55.8, 32.6, 29.9, 25.6, 25.1; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 710, 810, 931, 1165, 1226, 1261, 1396, 1457, 1505, 1562, 1649, 1758, 2923, 3446 cm⁻¹. ESI-MS calcd for C₂₇H₂₈NO₉ (M+H)⁺ 510.1764, found 510.1739.

4-山荷叶素氧基庚酸羟胺(4): 白色固体, 两步产率 33%. m.p. 93~96 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 7.49 (s, 1H, 5-ArH), 6.99 (s, 1H, 8-ArH), 6.92 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 2'-ArH), 6.77~6.73 (m, 2H, 5',6'-ArH), 6.04 (d, $J=12$ Hz, 2H, CH₂), 5.43 (s, 2H, CH₂), 4.18 (t, $J=6$ Hz, 2H, CH₂), 4.01 (s, 3H, 6-OCH₃), 3.76 (s, 3H, 7-OCH₃), 2.15 (t, $J=6$ Hz, 2H, CH₂), 1.89 (t, $J=6.6$ Hz, 2H, CH₂), 1.68 (t, $J=6$ Hz, 2H, CH₂), 1.58 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ : 170.9, 169.8, 151.5, 150.3, 147.5, 147.4, 146.9, 134.4, 130.6, 128.5, 126.4, 125.4, 123.6, 119.2, 110.8, 108.2, 106.2, 101.2, 100.7, 72.4, 66.8, 56.1, 55.8, 31.9, 29.4, 25.8, 25.8, 25.2; IR (KBr) $\nu_{\max}$: 710, 810, 931, 1165, 1226, 1261, 1396, 1457, 1505, 1562, 1649, 1758, 2923, 3446, 726, 807, 934, 1168, 1226, 1258, 1351, 1450, 1505, 1556, 1649, 1755, 2930, 3429 cm⁻¹. ESI-MS calcd for C₂₈H₃₀NO₉ (M+H)⁺ 524.1920, found 524.1915.

3.2.3 4-山荷叶素氧基烷基硫醇 5~7 的合成

溴代烃中间体 16~18 按照文献[13]方法制备.

将 0.37 mmol 硫代乙酸钾溶于 5 mL N,N -二甲基甲酰胺(DMF)中, 加入 0.33 mmol 溴代烃中间体 16~18, 室温搅拌 4~5 h. 反应结束后, 用乙酸乙酯稀释残液, 去离子水洗涤(50 mL×3), 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩、柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚)=1:3] 得到 4-山荷叶素氧基烷基硫代乙酰酯 19~21. 纯化后直接进行下步脱乙酰基反应.

将 0.3 mmol 硫代乙酰酯溶于 10 mL 甲醇中, 冰浴下加入 4 mL 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 室温反应 8 h. 反应结束后, 加入稀 HCl 调节 pH 至 7, 旋蒸除去溶剂甲醇, 用氯仿稀释残液, 去离子水洗涤(50 mL×3), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 柱层析 [V (乙酸乙酯): V (石油醚)=1:3] 得到山荷叶素硫醇衍生物 5~7.

4-山荷叶素氧基烷基硫醇(5): 白色固体, 两步产率 26%. m.p. 139~141 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.52 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.94 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.79 (s, 1H, 2'-ArH), 6.75 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 5'-ArH), 6.06 (d, $J=12.9$ Hz, 2H, CH_2), 5.45 (s, 2H, CH_2), 4.20 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.04 (s, 3H, 6- OCH_3), 3.78 (s, 3H, 7- OCH_3), 2.73 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.95~1.90 (m, 2H, CH_2), 1.84~1.79 (m, 2H, CH_2), 1.75~1.67 (m, 2H, CH_2), 1.58 (s, 1H, SH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 169.6, 151.6, 150.3, 147.5, 147.4, 146.9, 134.5, 130.7, 128.5, 126.4, 125.4, 123.6, 119.3, 110.8, 108.2, 106.2, 101.2, 100.6, 72.3, 66.7, 56.1, 38.7, 29.9, 28.8, 25.1; IR (KBr) ν_{max} : 726, 812, 923, 1162, 1221, 1255, 1344, 1452, 1504, 1553, 1648, 1766, 2024, 2922, 3005, 3067 cm^{-1} . MALDI-MS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{SNa}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 505.1297, found 505.1292.

4-山荷叶素氧基烷基硫醇(6): 白色固体, 两步产率 36%. m.p. 101~103 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.52 (s, 1H, 5-ArH), 7.03 (s, 1H, 8-ArH), 6.94 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.79 (s, 1H, 2'-ArH), 6.75 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, 5'-ArH), 6.06 (d, $J=13.8$ Hz, 2H, CH_2), 5.44 (s, 2H, CH_2), 4.19 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.03 (s, 3H, 6- OCH_3), 3.78 (s, 3H, 7- OCH_3), 2.69 (t, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.95~1.86 (m, 2H, CH_2), 1.78~1.69 (m, 2H, CH_2), 1.63~1.58 (m, 2H, CH_2), 1.56~1.51 (m, 2H, CH_2), 1.23 (s, 1H, SH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 169.7, 151.5, 150.3, 147.5, 147.4, 147.0, 134.4, 130.6, 128.5, 126.4, 154.4, 123.6, 119.2, 110.8, 108.2, 106.2, 101.2, 100.6, 72.4, 66.7, 56.0, 38.7, 30.2, 29.1, 28.2, 25.9; IR (KBr) ν_{max} : 735, 813, 932, 1172, 1224, 1262, 1349, 1459, 1503, 1537, 1618, 1757, 2032, 2926, 3010, 3100 cm^{-1} . MALDI-MS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{SNa}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 519.1453, found 519.1452.

4-山荷叶素氧基烷基硫醇(7): 白色固体, 两步产率 14%. m.p. 84~87 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.53 (s, 1H, 5-ArH), 7.04 (s, 1H, 8-ArH), 6.94 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, 6'-ArH), 6.79 (s, 1H, 2'-ArH), 6.75 (d, $J=8.1$ Hz, 1H, 5'-ArH), 6.06 (d, $J=13.8$ Hz, 2H, CH_2), 5.45 (s, 2H, CH_2), 4.21 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.03 (s, 3H, 6- OCH_3), 3.78 (s, 3H, 7- OCH_3), 2.69 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, CH_2), 1.95~1.87 (m, 2H, CH_2), 1.75~1.58 (m, 8 H, $\text{CH}_2 \times 3$), 1.43 (s, 1H, SH); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 169.6, 151.6, 150.3, 147.5, 147.4, 146.9, 134.5, 130.7, 128.5, 126.4, 125.4, 119.3, 110.8, 108.2, 106.2, 101.2, 111.6, 72.3, 66.7, 56.1, 38.7, 29.9, 29.7, 28.8, 25.1; IR (KBr) ν_{max} : 721, 811, 929, 1187, 1225, 1259, 1349, 1459, 1503, 1537, 1618,

1685, 1760, 2854, 2924, 3008, 3091 cm^{-1} ; MALDI-MS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{SNa}$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ 533.1610, found 533.1592.

3.3 MTT 法检测化合物抑制肿瘤细胞增殖活性

将对数生长期的细胞制成细胞悬液, 用血球计数板计数并将细胞终浓度稀释至 $1 \sim 2 \times 10^4$ cell/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔体积 100 μL . 另将不含细胞的孔设为空白组, 只加入 100 μL 培养基, 孵育 48 h 使细胞贴壁. 将待测的化合物用 DMSO 助溶, 同时用完全培养基稀释至相应浓度(DMSO 浓度为 0.1%). 肿瘤细胞药物设浓度梯度浓度, 分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每孔加入 90 μL 药液, 每个浓度设 6 个复孔, 药物作用 72 h. 加药培养时间结束后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 37 °C 条件下避光培养 4 h, 之后每个孔再加入甲臞溶解液 100 μL , 37 °C 下孵育 5~6 h, 酶标仪在 570 nm 波长下检测 OD 值, 并且计算抑制率. 计算公式如下:

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 OD} - \text{处理组 OD}) / (\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD}) \times 100\%$$

采用 Sigma plot 计算 IC_{50} 值.

References

- [1] Bolden J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 769.
- [2] Zhang, L.; Fang, H.; Xu, W. F. *Med. Res. Rev.* **2010**, 30, 585.
- [3] Qian, C. G.; Lai, C. J.; Bao, R.; Wang, D. G.; Wang, J.; Xu, G. X.; Atoyan, R.; Qu, H.; Yin, L.; Samson, M.; Zifcak, B.; Ma, A. W. S.; DellaRocca, S.; Borek, M.; Zhai, H. X.; Cai, X.; Voi M. *Clin Cancer Res.* **2010**, 18, 4104.
- [4] Witt, O.; Deubzer, H. E.; Milde, T.; Oehme, I. *Cancer Lett.* **2009**, 277, 8.
- [5] Cai, X.; Zhai, H. X.; Wang, J.; Forrester, J.; Qu, H.; Yin, L.; Lai, C. J.; Bao, R.; Qian, C. G. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 2000.
- [6] Chen, L. Q.; Petrelli, R.; Gao, G. Y.; Wilson, D. J.; Mclean, G. T.; Jayaram, H. N.; Sham, Y. Y.; Pankiewicz, K. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 5950.
- [7] Passarella, D.; Comi, D.; Vanossi, A.; Paganini, G.; Colombo, F.; Ferrante, L.; Zucco, V.; Danieli, B.; Zunino, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6358.
- [8] Li, X. H.; Huang, D. W.; Sun, L.; Xiu, Z. L.; Nishino, N. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, 31, 312 (in Chinese). (李晓晖, 黄大卫, 孙蕾, 修志龙, 西野宪和, 有机化学, **2011**, 31, 312.)
- [9] Zhao, Y.; Ni, C. Y.; Zhang, Y. T.; Zhu, L. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2012**, 8, 622.
- [10] Zhao, Y.; Hui, J.; Wang, D.; Zhu, L. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58, 1324.
- [11] Guerrant, W.; Patil, V.; Canzonieri, J. C.; Oyelere A. K. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1465.
- [12] Liu, X. H.; Song, H. Y.; Zhang, J. X.; Han, B. C.; Wei, X. N.; Ma, X. H.; Cui, W. K.; Chen, Y. Z. *Mol. Inf.* **2010**, 29, 407.
- [13] Zhao, Y.; Wang, D.; Hui, J.; Zhu, L. *Med. Chem. Res.* **2010**, 19, 71.

(Li, L.; Fan, Y.)