螺杂环单羰基姜黄素类似物的合成、晶体结构与抗肿瘤活性研究

吴建章^a 翁碧霞^a 仇佩虹^a 蔡志坚^{a,b} 范蕾^a
应士龙^a 张秀华^{*,a,b} 吴晓萍^{*,a,c} 梁广^a

(^a温州医科大学药学院 化学生物学研究中心 温州 325035)

(^b温州医科大学附属第一医院药剂科 温州 325000)

(^c暨南大学组织移植与免疫实验中心 广州 510632)

摘要 为了发现新型姜黄素类抗肿瘤先导化合物, 通过 1,3-偶极环加成反应合成了 14 个螺杂环单羰基姜黄素类似物. 该反应利用无需加催化剂的“一锅煮”方法合成, 具有环境友好的优点. 所有化合物结构经 ESI-MS、ESI-HRMS 和 ¹H NMR 确认, 通过 X 衍射确证 **B6** 的晶体结构为单斜晶系, 该类化合物的合成具有良好的区域选择性和立体选择性. 通过噻唑兰(MTT)法测定所有化合物对人胃癌细胞 SGC-7901、神经胶质瘤细胞 U251、人大细胞肺癌细胞株 NCI-H460 的增殖抑制活性, 部分化合物表现出了较好的活性. 其中 **B1**、**B6**、**B7** 和 **B11** 对三种肿瘤细胞均表现出较好的抗肿瘤活性, 而对正常人肝细胞 HL-7702 显示了相对较低的细胞毒性. 化合物 **B1** 和 **B7** 均能明显诱导凋亡相关蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (caspase3)和多聚 ADP-核糖聚合酶(PARP)的活化, 诱导肿瘤细胞发生凋亡. 所合成的螺杂环单羰基姜黄素类似物为新型的抗肿瘤化合物, 该类化合物可能在靶向抗肿瘤药物研发方面具有较好的研究前景.

关键词 单羰基姜黄素类似物; 螺杂环; 抗肿瘤; 合成

Synthesis, Crystal Structure, Antitumor Activity of Spiro-heterocyclic Mono-carbonyl Analogues of Curcumin

Wu, Jianzhang^a Weng, Bixia^a Qiu, Peihong^a Cai, Zhijian^{a,b} Fan, Lei^a
Ying, Shilong^a Zhang, Xiuhua^{*,a,b} Wu, Xiaoping^{*,a,c} Liang, Guang^a

(^a Chemical Biology Research Center, College of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035)

(^b Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000)

(^c Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract To discover novel lead compounds with good antitumor activity and low toxicity, 14 spiroheterocycle mono-carbonyl analogs of curcumin (MCACs) were synthesized by 1,3-dipolar cycloaddition reaction. The one-pot reaction was carried out without catalyst, which showed the advantage of environmentally friendly. The structures of all compounds were characterized by ESI-MS, ESI-HRMS and ¹H NMR. The crystal structure of **B6** was confirmed as monoclinic system by X-ray diffraction, which indicated high region-selectivity and stereo-selectivity in the reaction of these compounds. All compounds were screened for their abilities to inhibit the growth of human gastric cell SGC-7901, glioma cell U251, human large cell lung cancer cell lines NCI-H460 by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay, and some of them showed good antitumor activity. Among the active compounds, **B1**, **B6**, **B7** and **B11** exhibited strong antitumor efficacy on the three tumor cells and low cytotoxicity against human liver cells HL-7702. Both compounds **B1** and **B7** can significantly induce the activation of apoptosis related proteins cysteinyl aspartate specific proteinase (caspase3) and poly ADP-ribose polymerase (PARP), and induce the apoptosis of tumor cell. The synthesized spiro heterocycles derived from MCACs in this study were novel antitumor compounds, and these compounds appeared to possess good research prospect in the area of anti-tumor drugs.

* E-mail: wjzwmc@126.com, wujianzhang6@163.com

Received February 5, 2014; revised April 5, 2014; published online May 5, 2014.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81272462, 81102310), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Nos. LY12H30004, Y4090379), the Technology Foundation for Medical Science of Zhejiang Province (No. 2012KYA129), the Project of Wenzhou Sci-Tech Bureau (No. S20100045), the Zhejiang Provincial Project of Key Scientific Group (No. 2010R50042-04).

国家自然科学基金(Nos. 81272462, 81102310)、浙江省自然科学基金(Nos. LY12H30004, Y4090379)、浙江省医药卫生科技计划(No. 2012KYA129)、温州市科技局(No. S20100045)、浙江省重点科技创新团队(Nos. 2010R50042-04)资助项目.

Keywords mono-carbonyl analogs of curcumin; spiro-heterocyclic; antitumor; synthesis

姜黄素是一种广泛存在于姜科植物中的多酚类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒和抗菌等广泛的药理活性,对各种恶性肿瘤、糖尿病、关节炎和其它慢性疾病具有良好的治疗潜力^[1]. 由于姜黄素具有良好的药理活性,且几乎无毒,自 1996 年以来全球总共有超过 60 项的临床试验,但尚无一例取得成功,这主要是由于它的 β -二酮结构,导致其在体内吸收少、代谢过快和生物利用度低,限制了其临床应用^[2]. 因此,以提高姜黄素稳定性,并保留其药理活性和安全性为目的姜黄素类似物的药物化学研究逐渐成为天然药物化学研究的热点之一. 把 β -二酮结构改为具有单羰基结构的单羰基姜黄素类似物(mono-carbonyl analogues of curcumin, MCACs),即 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3 酮类似物(Scheme 1)和 1,3-二芳基-2-烯-1-酮类似物,它们在提高体外稳定性和改善体内生物利用度的同时,能保留甚至改善生物学活性^[2~5]. 目前已经发现多个 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3 酮类似物具有好的抗肿瘤活性,如类似物 **B19**、**B63** 能基于激活内质网应激途径,诱导肿瘤细胞凋亡,具有明显的体外和体内抗肿瘤活性^[6,7]; 类似物 **EF24** 具有很好的抗肺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌和前列腺癌等肿瘤活性^[8~10]; 但到目前为止,该类化合物由于靶点较多、毒性较大等原因,尚未有 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3 酮类 MCACs 抗肿瘤药物在临床上取得成功^[2,11]. 因此,寻找高效低毒的新型姜黄素类似物成为姜黄素类抗肿瘤

瘤药物研发的新需要. 靶向抗肿瘤药物具有高效低毒的优点,是抗肿瘤药物研发的热点. 激酶抑制剂是最常见的靶向抗肿瘤药物,吡唑酮结构骨架是 **SU5402**、**Sunitinib** 等酪氨酸激酶抑制剂的共有活性基团^[12,13],靛红作为吡唑酮合成的先导物. 靛红还可以作为亚甲胺叶立德环加成反应的先导物^[14,15],和各种 α -氨基酸反应生成 1,3-偶极子^[16]. 因此,本文利用药物化学拼合原理,对 MCACs 分子中间五碳桥连部分的二烯键改构,通过 1,3-偶极环加成反应,引入吡唑酮结构,设计出一类螺杂环类 MCACs,并对其抗肿瘤活性进行初步研究,发现了多个具有较好抗肿瘤活性、且毒性极低的类似物.

1 结果与讨论

1.1 合成

在参考螺杂环查尔酮化合物合成方法的基础上^[17],将等物质的量的靛红、肌氨酸和 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3 酮类 MCACs (**A** 类)溶解在甲醇中,不需催化剂,采用“一锅煮”的合成方法,在油浴回流下反应,因此,该反应符合绿色合成化学的宗旨. 反应完后,将反应溶液适当浓缩,在室温下用甲醇或甲醇:氯仿重结晶,即可得到螺杂环类单羰基姜黄素类似物(**B** 类)的纯品. 本文共设计合成了 14 个化合物,其合成路线和化合物结构见 Scheme 1.

Compd.	X	R	Compd.	X	R
1	NCH ₂ CH ₂ CH ₃	2-Cl	8	NCH ₃	2-Br
2	NCH ₂ CH ₃	2-Cl	9	O	2,6-F ₂
3	NCH ₂ CH ₃	4-F	10	O	4-F
4	NCH ₂ CH ₃	2-Br	11	O	3-OCH ₃ , 4-OH
5	NCH ₂ CH ₃	3,4-(OCH ₃) ₂	13	S	2-Cl
6	NCH ₃	2-F	14	S	2-CF ₃
7	NCH ₃	2-Cl	15	S	2-Br

Scheme 1

1.2 B6 的晶体结构和可能的反应机制

通过 X 衍射解析化合物 **B6** 的单晶结构(CCDC No. 979579), 其晶体结构见图 1. 晶体的分子式是 $C_{30}H_{26}F_2N_3O_2$, 分子量 498.54, 属于单斜晶系, 空间群为 $P2_1/c$, 晶胞参数 $a=10.2853(9)$ Å, $b=15.9349(14)$ Å, $c=17.3282(12)$ Å, $V=4782.9(10)$ Å³, $Z=4$, $D_x=1.342$ Mg·m⁻³, $\mu=0.10$ mm⁻¹, $F(000)=1044$. 最终偏离因子 $R_{int}=0.044$, $wR(F^2)=0.152$. A 类化合物骨架为 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3-酮, 分子两端苯环与中间的五碳连接链是一个共轭体系, 因此分子两端的两个苯环一般是近乎平面的结构^[18,19]. A 类化合物反应形成螺杂环 B 类化合物后, 五碳连接共轭链中一侧的 α,β -不饱和碳与 1,3-偶极子反应后, 两个碳原子均转变为手性碳原子, C(10)、C(23)的绝对构型分别为 *S*、*R*; 五碳连接共轭链因此而中断, 整个分子由近乎共平面结构变成螺杂环立体结构. **B6** 中分子两端的两个苯环[C(1)—C(6)及 C(25)—C(30)]接近垂直, 其二面角为 84.54°, 它们与吡啶酮中苯环[C(15)—C(20)]所成二面角分别为 61.19°, 38.50°. 分子中间 *N*-甲基吡啶酮[C(8)、C(9)、C(10)、C(11)、C(12)和 N(1)]为椅式构象.

B 类化合物的合成反应为 1,3-偶极环加成反应, 其可能反应机制为(图 2), 加热条件下靛红、肌氨酸反应生成亚甲胺叶立德 1,3-偶极子, 偶极子再与 A 类化合物的 α,β -不饱和碳发生环加成反应后, 即得到产物. 由 ¹H NMR 和单晶结构可知, 该环加成反应表现出很好的区域选择性和立体选择性. 对于区域选择性, 偶极子的电

图 1 化合物 **B6** 的晶体结构
Figure 1 The crystal structure of **B6**

子富集碳加成到 A 类化合物的 α,β -不饱和碳碳双键的 β 碳上. 对于立体选择性, 偶极子在与 A 类化合物的 α,β -不饱和碳碳双键反应时, 从碳碳双键平面空间位阻较小的一侧去进攻(图 2), 未发现从位阻较大一侧进攻所得的立体异构体.

1.3 细胞毒活性

为了发现具有抗肿瘤活性的先导化合物, 用 MTT 法测定所有化合物对三种肿瘤细胞系(H460、SGC7901 和 U251)的生长抑制活性, 化合物的半数抑制浓度(IC₅₀)见表 1. 化合物表现出对 SGC7901 较好的抑制活性, 对 SGC7901 的总体抑制作用明显强于其它两种肿瘤细胞系. 目前已经发现多个具有较好抗肿瘤活性的 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3-酮类 MCACs, 如 EF24 等活性化合物对肿瘤细胞的 IC₅₀ 一般为 3 μ mol/L 左右的水平^[2,3]. 除以

图 2 合成螺杂环类单羰基姜黄素类似物的反应机制
Figure 2 The reaction mechanism of synthesizing spiro-heterocyclic MCACs

N-乙基哌啶酮杂合的化合物 **B2**, **B4** 和 **B5** 几乎无抑制活性以外, 其它化合物均表现出不同程度的抗肿瘤活性, 其中化合物 **B1**, **B6** 和 **B11** 对三种肿瘤细胞均表现出一定的抗肿瘤活性, **B1** 和 **B6** 对 SGC7901 和 U251 的 IC_{50} 均小于 $10 \mu\text{mol/L}$. 本文中螺杂环 MCACs 的整体抗肿瘤活性低于姜黄素和 EF24, 但化合物 **B1**, **B10** 和 **B11** 对 SGC7901 的抑制活性略强于姜黄素和 EF24, 已达到较好的活性水平.

虽然 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3-酮类 MCACs 具有较好的抗肿瘤活性, 但是其对正常细胞也存在同等甚至更大的细胞毒性, 因此, 限制其进一步的临床应用. 因此, 寻找特异靶向肿瘤细胞, 但对正常细胞无毒的抗肿瘤药物成为了姜黄素类抗肿瘤药物研发的新的方向. 为发现高效低毒的姜黄素类抗肿瘤药物, 选择出具有较好抗肿瘤活性的化合物 **B1**, **B6**, **B7** 和 **B11**, 用 MTT 法检测活性化合物对正常人肝细胞 HL-7702 的细胞毒性(表 1). 除 **B1** 的 IC_{50} 为 $24 \mu\text{mol/L}$ 外, **B6**, **B7** 和 **B11** 对肝细胞的 IC_{50} 均大于 $30 \mu\text{mol/L}$, 而 EF24 和姜黄素的 IC_{50} 分别为 5.8, $28.6 \mu\text{mol/L}$, 因此活性化合物对肝细胞的毒性明显低于 EF24, 并比姜黄素低或与其相当的肝细胞毒性. 除 **B7** 对 U251 之外, 四个活性化合物对肿瘤细胞的 IC_{50} 均明显小于对肝细胞的 IC_{50} , 即与姜黄素同样表现出对肿瘤细胞的选择性生长抑制活性. 而 EF24 对肿瘤细胞和肝细胞具有相当的 IC_{50} , 未表现出对肿瘤细胞的选择性生长抑制活性. EF24 等 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3-酮类 MCACs 毒性大的原因可能与其能够同时作用于多个靶点相关, 如 Brown A 测试 EF31 等对 50 种常见激酶的抑制活性, 发现其在 $5 \mu\text{mol/L}$ 时对 10 种激酶的抑制活性大于 85%^[11]. 而引入吡啶酮结构单元的螺杂环 MCACs 表现出较好的对肿瘤细胞的抑制活性^[20], 这可能与作用于肿瘤细胞生长相关的靶点有关. 因此, 螺杂环类 MCACs 可能具有更好的靶向选择性的研发前景, 但该类化合物的抗肿瘤构效关系、靶点机制、毒性等还有待于进一步深入研究.

1.4 B1 和 B7 诱导 SGC7901 细胞凋亡

用 Western Blotting 法, 测定活性化合物 **B1** 和 **B7** (10 , 15 和 $30 \mu\text{mol/L}$) 诱导 SGC7901 中凋亡相关蛋白 Caspase3(半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3)和 RARP (Caspase 的切割底物)表达的量效关系(图 3). **B1** 和 **B7** 均能明显诱导 Pro-caspase-3 和 Pro-RARP 表达的降低, 从而致使 SGC7901 细胞凋亡.

2 结论

通过亚甲胺叶立德的 1,3-偶极环加成反应合成的 14 个螺杂环单羰基姜黄素类似物, 该合成具有环境友

表 1 化合物对肿瘤细胞增殖的半数抑制浓度^a

Table 1 The half inhibition concentration of compounds against cell proliferation

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	SGC-7901	U251	H460	HL-7702
B1	3.7 ± 0.2	6.3 ± 0.1	17.2 ± 1.6	24.1 ± 1.0
B2	>60	>60	>60	—
B3	42.9 ± 2.6	>60	>60	—
B4	>60	>60	>60	—
B5	>60	>60	>60	—
B6	20.9 ± 0.1	45.9 ± 2.9	17.7 ± 0.3	51.9 ± 6.2
B7	14.9 ± 0.1	>60	18.6 ± 13.9	46.6 ± 1.8
B8	43.1 ± 1.6	>60	>60	—
B9	27.4 ± 0.4	>60	>60	—
B10	3.7 ± 0.5	>60	>60	—
B11	4.8 ± 0.1	9.2 ± 0.9	19.2 ± 6.1	33.7 ± 1.8
B13	24.6 ± 2.1	>60	>60	—
B14	21.9 ± 0.3	>60	>60	—
B15	18.3 ± 0.2	>60	>60	—
EF24	6.5 ± 0.8	4.5 ± 6.7	6.0 ± 2.3	5.8 ± 2.1
Curcumin	8.6 ± 2.1	8.6 ± 1.4	8.5 ± 1.1	28.6 ± 7.4

^a “—”为未进行测定.

图 3 化合物 **B1** 和 **B7** 对 SGC7901 中 caspase-3 和 RARP 激活的影响

Figure 3 The effect of compounds **B1** and **B7** on the activation of caspase-3 and RARP in SGC7901 cells

好, 及高度的区域选择性和立体选择性. 虽然该类化合物的整体抗肿瘤活性低于先导化合物姜黄素, 只有部分化合物显示出较好的抗肿瘤活性, 但活性化合物 **B1**, **B6**, **B7** 和 **B11** 基本表现出较好的对肿瘤细胞的抑制活性, 且对肝细胞具有相对较低的细胞毒性. 化合物 **B1** 和 **B7** 均能明显诱导凋亡相关蛋白 Caspase3 和 RARP 的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡. 本文所合成的螺杂环单羰基姜黄素类似物为新型的姜黄素类抗肿瘤化合物, 该类化合物可能在靶向抗肿瘤药物研发方面具有较好的研究前景, 但该类化合物的抗肿瘤活性、靶点及机制都还有待于进一步研究.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Esquire HCT 液质联用仪(Bruker Esquire); Bruker micrOTOF-Q II 质谱仪(Bruker Daltonics); 600M AVANCE III 核磁共振仪(Bruker); Fisher-Johns 型显微熔

点仪; Spectra Max M2 多功能酶标仪(Molecular Devices), 倒置显微镜(日本尼康), 凝胶成像仪(Bio-rad). 薄层和柱层析用硅胶均为青岛海洋化工厂产品. RPMI-1640 培养基、DMEM 高糖培养基、0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)和胎牛血清均购自 HyClone 公司. 青-链霉素(100×), PBS 均购自吉诺生物医药科技有限公司. 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)粉末, 二甲基亚砷(DMSO)均购自 Sigma. 台盼蓝(上海生科生物有限公司). PVDF 膜、30%丙烯酰胺溶液、考马斯亮蓝染色液、TEMED、脱脂奶粉、Tris 和 SDS 购买于 Bio-rad 中国公司(上海, 中国). pro-RARP、pro-caspase-3、GAPDH 一抗, 羊抗兔 IgG-HRP, 鼠抗羊 IgG-HRP 抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司(Santa Cruz, CA). 人胃癌细胞(SGC-7901)购于中国典型培养物保藏中心(武汉, 中国). 神经胶质瘤细胞(U251)、人大细胞肺癌细胞株(NCI-H460)和人肝细胞(HL-7702)均购于中国科学院上海细胞库(上海, 中国).

3.2 实验方法

3.2.1 合成

将芳香醛与杂环酮按照 1 : 2 的量混合溶解在 20 mL 乙醇溶液中, 以 40% NaOH 为催化剂, 用冰浴维持 5~8 °C 反应温度 3~5 h, TLC 监测反应进程. 待反应结束后, 调 pH 至中性, 加入适量水, 有沉淀析出, 抽滤得到 A 类化合物的粗产物, 粗产品用石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂, 柱色谱纯化得到 1,5-二芳基-1,4-戊二烯-3-酮类 MCACs 的纯品^[19,21]. 其中 **A1**, **A4**, **A5**, **A6**, **A7** 均为本课题组前期合成并已报道过的化合物, 它们的结构表征数据见参考文献[21]. 其余化合物的结构表征数据如下:

(3*E*,5*E*)-3,5-二(2-氯苯亚甲基)-1-乙基哌啶-4-酮 (**A2**): 淡黄色粉末, 产率 80%. m.p. 111.4~113.87 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 8.022 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.449~7.460 (m, 2H, Ar-H⁶×2), 7.298~7.329 (m, 4H, Ar-H³×2, Ar-H⁴×2), 7.236~7.251 (m, 2H, Ar-H⁵×2), 3.178 (s, 4H, NCH₂×2), 2.555 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, NCH₂), 0.985 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); ESI-MS *m/z*: 372.3 [M+H]⁺.

(3*E*,5*E*)-3,5-二(4-氟苯亚甲基)-1-乙基哌啶-4-酮 (**A3**): 淡黄色粉末, 产率 57.7%. m.p. 139.0~140.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.791 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.382 (dd, *J*=6.0, 7.8 Hz, 4H, Ar-H²×2, Ar-H⁶×2), 7.121 (t, *J*=8.4 Hz, 4H, Ar-H³×2, Ar-H⁵×2), 3.820 (s, 4H, CH₂NCH₂), 2.637 (q, *J*=7.2 Hz, 2H, NCH₂), 1.072 (t, *J*=7.2 Hz, 3H, CH₃); ESI-MS *m/z*: 340.1 [M+H]⁺.

(3*E*,5*E*)-3,5-二(2-溴苯亚甲基)-1-甲基哌啶-4-酮 (**A8**): 淡黄色粉末, 产率 85.4%. m.p. 144.2~146.0 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.987 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.683

(d, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H³×2), 7.376 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H⁵×2), 7.239~7.287 (m, 4H, Ar-H⁴×2, Ar-H⁶×2), 3.652 (s, 4H, CH₂NCH₂), 2.407 (s, 3H, NCH₃); ESI-MS *m/z*: 448.0 [M+H]⁺.

(3*E*,5*E*)-3,5-二(2,6-二氟苯亚甲基)-四氢吡喃-4-酮 (**A9**): 淡黄色粉末, 产率 80.46%. m.p. 244.9~246.3 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.578 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H⁴×2), 7.522 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.525 (t, *J*=7.8 Hz, 4H, Ar-H³×2, Ar-H⁵×2), 4.548 (s, 4H, CH₂OCH₂); ESI-MS *m/z*: 349.0 [M+H]⁺.

(3*E*,5*E*)-3,5-二(4-氟苯亚甲基)-四氢吡喃-4-酮 (**A10**): 黄色晶体, 产率 52%. m.p. 188.5~190.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.794 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.307 (dd, *J*=5.4, 8.4 Hz, 4H, Ar-H²×2, Ar-H⁶×2), 7.104~7.142 (m, 4H, Ar-H³×2, Ar-H⁵×2), 4.901 (d, *J*=1.8 Hz, 4H, CH₂OCH₂); ESI-MS *m/z*: 313.1 [M+H]⁺.

(3*E*,5*E*)-3,5-二(4-羟基-3-甲氧基苯亚甲基)-四氢吡喃-4-酮(**A11**): 黄绿色粉末, 产率 53.03%. m.p. 196.8~198.7 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 9.680 (s, 2H, OH×2), 7.600 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.020 (s, 2H, Ar-H²×2), 6.889 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, Ar-H⁶×2), 6.870 (d, *J*=8.4 Hz, 2H, Ar-H⁵×2), 4.909 (s, 4H, CH₂OCH₂), 3.828 (d, *J*=8.4 Hz, 3H, OCH₃); ESI-MS *m/z*: 369.3 [M+H]⁺.

(3*Z*,5*Z*)-3,5-二(2-氯苯亚甲基)-四氢噻喃-4-酮 (**A13**): 淡黄色粉末, 产率 49.8%. m.p. 128.7~130.8 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.694 (s, 2H, ArCH=CH×2), 7.594 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, Ar-H³×2), 7.460 (t, *J*=9.6 Hz, 2H, Ar-H⁵×2), 7.442~7.458 (m, 2H, Ar-H⁴×2), 7.442~7.458 (m, 2H, Ar-H⁶×2), 3.858 (s, 4H, SCH₂×2); ESI-MS *m/z*: 361.2 [M+H]⁺.

(3*Z*,5*Z*)-3,5-二(2-(三氟甲基)苯亚甲基)-四氢噻喃-4-酮(**A14**): 淡黄色粉末, 产率 55.74%. m.p. 133.5~135.7 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.909 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.745 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H³×2), 7.582 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H⁵×2), 7.472 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H⁴×2), 7.313 (d, *J*=7.8 Hz, 2H, Ar-H⁶×2), 7.261 (s, 4H, CH₂SCH₂); ESI-MS *m/z*: 429.1 [M+H]⁺.

(3*Z*,5*Z*)-3,5-二(2-溴苯亚甲基)-四氢噻喃-4-酮 (**A15**): 黄色粉末, 产率 59.0%. m.p. 167.2~170.9 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.800 (s, 2H, ArCH=C×2), 7.655 (dd, *J*=1.2, 7.8 Hz, 2H, Ar-H³×2), 7.351 (dt, *J*=1.2, 7.8 Hz, 2H, Ar-H⁵×2), 7.273 (dd, *J*=1.2, 7.8 Hz, 2H, Ar-H⁶×2), 7.224 (dt, *J*=1.2, 7.8 Hz, 2H, Ar-H⁴×2), 3.729 (s, 4H, SCH₂×2); ESI-MS *m/z*: 451.0 [M+H]⁺.

将 A 类化合物、靛红和肌氨酸按照 1 : 1 : 1 的量混

合于 15 mL 甲醇溶液中, 回流反应, TLC 监测反应进程. 待反应结束后, 室温下用甲醇或甲醇/氯仿重结晶, 得到螺杂环类 MCACs 的纯品. 表征数据如下:

1-甲基-4-(2-氯苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-丙基-5'-[(2-氯苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B1**): 黄色粉末, 产率 50.5%. m.p. 191.3~194.2 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.995 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{3'}), 7.698 (s, 1H, ArCH=C), 7.302~7.371 (m, 3H, Ar-H^{3'}, Ar-H^{6'}, Ar-H⁶), 7.117~7.263 (m, 5H, Ar-H³, Ar-H⁵, Ar-H^{4'}, Ar-H^{5'}, Ar-H^{5''}), 6.958~6.984 (m, 2H, Ar-H^{4''}, Ar-H^{6''}), 6.672 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 5.150 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 4-CH), 3.996 (t, $J=9.0$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.489 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.231 (d, $J=15.0$ Hz, 2H, 5-CH₂), 2.151 (s, 3H, 1-N-CH₃), 1.853 (d, $J=11.4$ Hz, 2H, 1'-NCH₂), 1.113 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, 1'-NCCH₃), 0.650 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, 1'-NCCCH₃); ESI-MS m/z : 560.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 560.1872, found 560.1867.

1-甲基-4-(2-氯苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-乙基-5'-[(2-氯苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B2**): 淡黄色粉末, 产率 44.2%. m.p. 236.7~239.2 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.987 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, Ar-H^{3'}), 7.697 (s, 1H, ArCH=C), 7.303~7.371 (m, 3H, Ar-H^{3'}, Ar-H^{6'}, Ar-H⁶), 7.136~7.199 (m, 5H, Ar-H^{5'}, Ar-H^{5''}, Ar-H^{4'}, Ar-H³, Ar-H⁵), 6.960~6.985 (m, 2H, Ar-H^{4''}, Ar-H^{6''}), 6.665 (s, 1H, Ar-H⁴), 5.153 (s, 1H, 4-CH), 4.006 (s, 2H, 6'-CH₂), 3.502 (s, 2H, 2'-CH₂), 3.211 (d, $J=14.4$ Hz, 2H, 5-CH₂), 2.210~2.250 (m, 2H, 1'-NCH₂), 2.167 (s, 3H, 1-NCH₃), 0.708 (t, $J=6.6$ Hz, 3H, 1'-NCCH₃); ESI-MS m/z : 546.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 546.1715, found 546.1714.

1-甲基-4-(4-氟苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-乙基-5'-[(4-氟苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B3**): 白色粉末, 产率 76.5%. m.p. 217.6~218.8 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.351 (q, $J=8.4$ Hz, 2H, Ar-H^{2'}, Ar-H^{6'}), 7.223 (q, $J=8.4$ Hz, 2H, ArCH=C, Ar-H⁶), 7.135~7.190 (m, 4H, Ar-H³, Ar-H⁵, Ar-H^{2''}, Ar-H^{6''}), 7.096 (s, 1H, Ar-H⁴), 7.006~7.033 (m, 1H, Ar-H^{3''}), 6.850 (d, $J=4.2$ Hz, 2H, Ar-H^{3'}, Ar-H^{5'}), 6.585 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{5''}), 4.620 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, 4-CH), 3.757 (t, $J=9.0$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.230 (q, $J=8.4$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 2.905~3.125 (m, 2H, 5-CH₂), 2.067~2.257 (m, 2H, 1'-NCH₂), 1.959 (s, 3H, 1-NCH₃), 0.757 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, 1'-NCCH₃); ESI-MS m/z : 514.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 514.2306, found 514.2289.

1-甲基-4-(2-溴苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-

[3.3']-1'-乙基-5'-[(2-溴苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B4**): 淡黄色晶体, 产率 76.5%. m.p. 213.8~218.7 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.078 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{3'}), 7.695 (s, 1H, ArCH=C), 7.586 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H^{3''}), 7.555 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{6'}), 7.382 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H^{5'}), 7.221 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{6''}), 7.107~7.178 (m, 4H, Ar-H^{4'}, Ar-H^{6'}, Ar-H³, Ar-H⁵), 7.013 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{6''}), 6.966 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H^{4''}), 6.702 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 5.103 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 4-CH), 3.978 (t, $J=9.0$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.538 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.216 (d, $J=15.0$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 2.214~2.270 (m, 2H, 1'-NCH₂), 2.160 (s, 3H, 1-NCH₃), 0.720 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, 1'-NCCH₃); ESI-MS m/z : 636.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 636.0684, found 636.0717.

1-甲基-4-(3,4-甲氧基苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-乙基-5'-[(3,4-甲氧基苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B5**): 桔黄色粉末, 产率 72.2%. m.p. 187.1~188.8 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.105 (s, 1H, ArCH=C), 6.988~7.027 (m, 2H, Ar-H³, Ar-H^{6'}), 6.916 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 6.870 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{4'}), 6.833 (d, $J=7.2$ Hz, 2H, Ar-H^{2'}, Ar-H^{6''}), 6.800 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, Ar-H^{5'}), 6.742 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, Ar-H^{2''}, Ar-H^{6''}), 6.593 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H^{5''}), 4.527 (q, $J=7.2$ Hz, 1H, 4-CH), 3.715 (s, 12H, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃, 3''-OCH₃, 4''-OCH₃), 3.302 (d, $J=15.0$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.184 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 2.884 (q, $J=8.4$ Hz, 2H, 5-CH₂), 2.078~2.256 (m, 2H, 1'-NCH₂), 1.941 (s, 3H, 1-NCH₃), 0.774 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, 1'-NCCH₃); ESI-MS m/z : 598.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 598.2917, found 598.2916.

1-甲基-4-(2-氟苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-甲基-5'-[(2-氟苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B6**): 淡黄色晶体, 产率 65.6%. m.p. 198.8~201.8 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 7.667 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, ArCH=C), 7.380 (q, $J=6.6$ Hz, 1H, Ar-H^{4'}), 7.321 (q, $J=6.6$ Hz, 1H, Ar-H^{4''}), 7.045~7.253 (m, 8H, Ar-H³, Ar-H⁵, Ar-H^{6'}, Ar-H^{3'}, Ar-H^{5'}, Ar-H^{6'}, Ar-H^{3''}, Ar-H^{6''}), 6.839 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, Ar-H⁴, Ar-H^{5''}), 4.820 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, 4-CH), 3.230~3.876 (m, 2H, 6'-CH₂), 3.091 (d, $J=15.0$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.021 (t, $J=14.4$ Hz, 2H, 5-CH₂), 1.959 (s, 3H, 1-NCH₃), 1.901 (s, 3H, 1'-NCCH₃); ESI-MS m/z : 500.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 500.2150, found 500.2145.

1-甲基-4-(2-氯苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-甲基-5'-[(2-氯苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B7**): 淡黄色晶体, 产率 69.4%. m.p. 222.0~224.8 °C; ^1H NMR

(CDCl₃) δ : 7.965 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H²), 7.635 (s, 1H, ArCH=C), 7.349 (dd, $J=7.2, 4.2$ Hz, 2H, Ar-H³, Ar-H³), 7.316 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 7.120~7.264 (m, 5H, Ar-H⁵, Ar-H⁴, Ar-H⁵, Ar-H³, Ar-H⁴), 6.982 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.931 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 6.690 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 5.147 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 4-CH), 3.987 (t, $J=9.0$ Hz, 1H, 5-CH₂), 3.510 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 5-CH₂), 3.136 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 3.000 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 2.951 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 2.166 (s, 3H, 1-NCH₃), 1.951 (s, 3H, 1'-NCH₃), 1.830 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, 2'-CH₂); ESI-MS m/z : 532.0 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₃₀H₂₈Cl₂N₃O₂ [M+H]⁺ 532.1559, found 532.1539.

1-甲基-4-(2-溴苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-1'-甲基-5'-[(2-溴苯)亚甲基]哌啶-4'-酮(**B8**): 淡黄色粉末, 产率 67.2%. m.p. 225.2~227.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 8.036 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H³), 7.612 (s, 1H, ArCH=C), 7.531~7.557 (m, 2H, Ar-H³, Ar-H⁶), 7.363 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 7.193 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 7.090~7.159 (m, 4H, Ar-H⁵, Ar-H⁴, Ar-H³, Ar-H⁶), 6.996 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 6.926 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.690 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 5.077 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 4-CH), 3.932 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.530 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.110 (d, $J=15$ Hz, 2H, 5-CH₂), 2.140 (s, 3H, 1-NCH₃), 1.938 (s, 3H, 1'-NCH₃); ESI-MS m/z : 621.8 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₃₀H₂₈Br₂N₃O₂ [M+H]⁺ 622.0528, found 622.0500.

1-甲基-4-(2,6-二氟苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-[(2,6-二氟苯)亚甲基]四氢吡喃-4'-酮(**B9**): 淡黄色粉末, 产率 62.2%. m.p. 213.6~214.5 °C; ¹H NMR (DMSO) δ : 7.365~7.455 (m, 2H, Ar-H³, Ar-H⁵), 7.058~7.130 (m, 5H, Ar-H³, Ar-H⁵, Ar-H⁴, Ar-H⁴, Ar-H³), 6.901 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.870 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 6.794 (s, 1H, ArCH=C), 6.642 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H²), 5.049 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, 4-CH), 4.781 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 4.196~4.229 (m, 1H, 5-CH₂), 4.143 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 3.762 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 3.207 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 3.135 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, 5-CH₂), 1.997 (s, 3H, 1-NCH₃); ESI-MS m/z : 523.1 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₂₉H₂₃F₄N₂O₃ [M+H]⁺ 523.1645, found 523.1628.

1-甲基-4-(4-氟苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-[(4-氟苯)亚甲基]四氢吡喃-4'-酮(**B10**): 淡黄色晶体, 产率 59.8%. m.p. 206.8~209.0 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 7.365~7.389 (m, 2H, Ar-H², Ar-H⁶),

7.125~7.190 (m, 7H, Ar-H³, Ar-H⁵, Ar-H², Ar-H⁶, Ar-H³, Ar-H⁵, ArCH=C), 7.605 (dd, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1H, Ar-H³), 6.903 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.887 (d, $J=6.0$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 6.629 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H²), 4.638 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, 4-CH), 4.413 (dd, $J=15.0, 1.8$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 4.241 (d, $J=12.0$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 3.994 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 3.777 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, 5-CH₂), 3.290 (t, $J=8.4$ Hz, 1H, 5-CH₂), 2.844 (d, $J=12.6$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 2.000 (s, 3H, 1-NCH₃); ESI-MS m/z : 487.1 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₂₉H₂₅F₂N₂O₃ [M+H]⁺ 487.1833, found 487.1815.

1-甲基-4-(3-甲氧基-4-羟基苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-[(3-甲氧基-4-羟基苯)亚甲基]四氢吡喃-4'-酮(**B11**): 黄色粉末, 产率 55.0%. m.p. 144~148 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.590 (brs, 1H, 1''-NH), 7.058~7.112 (m, 3H, ArCH=C, Ar-H³, Ar-H⁶), 6.936 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 6.876 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H²), 6.819~6.837 (m, 2H, Ar-H⁴, Ar-H⁶), 6.670 (d, 1H, Ar-H²), 6.551 (s, 1H, Ar-H⁵), 6.535 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 5.864 (s, 1H, Ar-H⁵), 5.586 (s, 1H, 4-CH), 4.438 (d, $J=12.6$ Hz, 1H, 6'-CH₂), 4.376 (dd, $J=2.4, 15.0$ Hz, 1H, 2'-CH₂), 4.204 (d, $J=14.4$ Hz, 1H, 5-CH₂), 3.902 (s, 3H, Ar-3'-OCH₃), 3.837 (s, 3H, Ar-3''-OCH₃); ESI-MS m/z : 543.2 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₃₁H₃₁N₂O₇ [M+H]⁺ 543.2131, found 543.2108.

1-甲基-4-(2-氯苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-[(2-氯苯)亚甲基]四氢噻喃-4'-酮(**B13**): 淡黄色柱状晶体, 产率 88.8%. m.p. 213.4~215.9 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.944 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H³), 7.833 (brs, 1H, 1''-NH), 7.542 (s, 1H, ArCH=C), 7.367 (t, $J=7.2$, 2H, Ar-H³, Ar-H⁶), 7.327 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 7.191~7.264 (m, 5H, Ar-H⁴, Ar-H⁵, Ar-H⁵, Ar-H³, Ar-H⁵), 7.035 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 6.960 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.800 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 5.178 (t, $J=9.0$ Hz, 1H, 4-CH), 4.056~4.071 (m, 1H, 6'-CH₂), 3.505~3.539 (m, 1H, 2'-CH₂), 3.434 (dd, $J=6.0, 14.4$ Hz, 1H, 5-CH₂), 2.199 (s, 3H, 1'-NCH₃); ESI-MS m/z : 534.9 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₂₉H₂₅Cl₂N₂O₂S [M+H]⁺ 535.1014, found 535.0992.

1-甲基-4-(2-三氟甲基苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-[(2-三氟甲基苯)亚甲基]四氢噻喃-4'-酮(**B14**): 淡黄色粉末, 产率 48.0%. m.p. 228.1~230.2 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 8.404 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H³), 7.610~7.661 (m, 3H, ArCH=C, Ar-H³, Ar-H⁵), 7.584 (s, 1H, Ar-H⁵), 7.434 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 7.367 (t, $J=$

7.8 Hz, 2H, Ar-H³, Ar-H⁶), 7.263 (t, $J=9.6$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 7.218 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁵), 7.038 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 6.902 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.840 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 5.147 (t, $J=4.0$ Hz, 1H, 4-CH), 3.932 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, 6'-CH₂), 3.648 (t, $J=8.4$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 3.197 (d, $J=13.8$ Hz, 1H, 5-CH₂), 2.192 (s, 3H, 1'-NCH₃); ESI-MS m/z : 603.0 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₃₁H₂₅F₆N₂O₂S [M+H]⁺ 603.1541, found 603.1512.

1-甲基-4-(2-溴苯基)吡咯-(螺[2.3]吡啶酮)-螺-[3.3']-5'-(2-溴苯)亚甲基四氢噻喃-4'-酮(**B15**): 白色粉末, 产率 57.6%. m.p. 236.2~238.3 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.983 (d, $J=6.6$ Hz, 1H, Ar-H³), 7.679 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H³), 7.627 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 7.475 (t, $J=15.0$ Hz, 1H, ArCH=C), 7.337 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, Ar-H⁵, Ar-H⁵), 7.280 (q, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁶), 7.194~7.241 (m, 2H, Ar-H³, Ar-H⁵), 7.063 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 6.940~6.986 (m, 2H, Ar-H⁴, Ar-H⁶), 6.780 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, Ar-H⁴), 4.932 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, 4-CH), 3.435~3.828 (m, 2H, 6'-CH₂), 2.704 (q, $J=14.4$ Hz, 2H, 2'-CH₂), 2.183 (d, $J=14.4$ Hz, 2H, 5-CH₂), 1.951 (s, 3H, 1'-NCH₃); ESI-MS m/z : 624.8 [M+H]⁺; HRMS calcd for C₂₉H₂₅Br₂N₂O₂S [M+H]⁺ 624.9983, found 624.9953.

3.2.2 单晶衍射

室温下用甲醇为溶剂对 **B6** 重结晶, 得到淡黄色柱状晶体. 在 293 K 下用 Bruker SMARTAPEXII X 射线单晶衍射仪测定 **B6** 的单晶结构. 用石墨晶体单色器, 在 Mo K α 射线($\lambda=0.71073$ Å)下, 以 φ - ω 扫描方式, 在 $2.2^\circ < \theta < 25.4^\circ$ 收集衍射数据 (SMART 程序).

3.2.3 MTT 法测定对细胞增殖抑制活性的半数抑制浓度

人大细胞肺癌细胞株 (NCIH460) 和人肝细胞 (HL-7702) 所用完全培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基. 人胃癌细胞 (SGC-7901)、神经胶质瘤细胞 (U251) 所用完全培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基. 取对数期生长的细胞经胰蛋白酶消化后, 用相应培养液配置成细胞悬液, 加入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 4000 个细胞/孔, 37 °C 过夜培养, 贴壁后, 更换新鲜培养基, 每孔加入 1 μ L DMSO 溶解的药物溶液, 继续培养 72 h. 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L, 置培养箱中培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 100 μ L DMSO 置摇床上震荡, 10 min 后在酶标仪上测定 OD (490 nm) 值. 测定时以不加药物的 DMSO 组为空白对照, 用姜黄素为阳性对照, 每个药物设置 5 个浓度梯度 (0.096, 0.48, 2.4, 12, 60 μ mol/L), 重复 3 次实验, 每次 3 个复孔. 计算每个药物浓度下的细胞生存抑制率, 用 Graphpad

prism 5 拟合细胞抑制率-药物浓度曲线, 计算细胞生存半数抑制浓度 (IC₅₀).

3.2.4 蛋白免疫印迹 (Western Blotting)

取对数期生长的人胃癌细胞 SGC-7901 接种于 6 孔板 (3.0×10^5 个/皿) 中, 过夜贴壁培养后, 更换培养基, 加入 DMSO 溶解的药物溶液, 孵育 24 h 后, 收集细胞和总蛋白. 每个样品上样总蛋白为 80 μ g, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 再电转到 PVDF 膜上. 将转移蛋白后的 PVDF 膜用 5% 的脱脂牛奶封闭 90 min 后, 再用 pro-RARP、pro-caspase-3 及 GAPDH 的特异性一抗室温孵育 2 h 后, 4 °C 孵育过夜, 再用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 将膜放入凝胶成像仪 (Bio-rad) 中用 ECL 显影液暗室孵育 1~2 min, 通过凝胶成像系统成像.

References

- [1] Bar-Sela, G.; Epelbaum, R.; Schaffer, M. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 190.
- [2] Zhao, C.; Liu, Z.; Liang, G. *Curr. Pharm. Design* **2013**, *19*, 2114.
- [3] Agrawal, D. K.; Mishra, P. K. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 818.
- [4] Wu, J.; Wang, C.; Cai, Y.; Yang, S.; Zheng, X.; Qiu, P.; Peng, J.; Wu, X.; Liang, G.; Li, X. *Chin. J. Org. Chem.* **2010**, *30*, 884 (in Chinese).
(吴建章, 王聪, 蔡跃飘, 杨树林, 郑晓咏, 仇佩虹, 彭景, 吴晓萍, 梁广, 李校堃, 有机化学, **2010**, *30*, 884.)
- [5] Wu, J.; Li, J.; Cai, Y.; Pan, Y.; Ye, F.; Zhang, Y.; Zhao, Y.; Yang, S.; Li, X.; Liang, G. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8110.
- [6] Wang, Y.; Xiao, J.; Zhou, H.; Yang, S.; Wu, X.; Jiang, C.; Zhao, Y.; Liang, D.; Li, X.; Liang, G. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3768.
- [7] Xiao, J.; Wang, Y.; Peng, J.; Guo, L.; Hu, J.; Cao, M.; Zhang, X.; Zhang, H.; Wang, Z.; Li, X.; Yang, S.; Yang, H.; Liang, G. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1455.
- [8] Selvendiran, K.; Tong, L.; Vishwanath, S.; Bratasz, A.; Trigg, N. J.; Kutala, V. K.; Hideg, K.; Kuppusamy, P. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28609.
- [9] Wilken, R.; Veena, M. S.; Wang, M. B.; Srivatsan, E. S. *Mol. Cancer* **2011**, *10*, 12.
- [10] Subramaniam, D.; May, R.; Sureban, S. M.; Lee, K. B.; George, R.; Kuppusamy, P.; Ramanujam, R. P.; Hideg, K.; Dieckgraefe, B. K.; Houchen, C. W.; Anant, S. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1962.
- [11] Brown, A.; Shi, Q.; Moore, T. W.; Yoon, Y.; Prussia, A.; Maddox, C.; Liotta, D. C.; Shim, H.; Snyder, J. P. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3456.
- [12] Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28.
- [13] Liang, G.; Liu, Z.; Wu, J.; Cai, Y.; Li, X. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 531.
- [14] Dandia, A.; Jain, A. K.; Laxkar, A. K. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 8423.
- [15] George, R. F.; Ismail, N. S.; Stawinski, J.; Girgis, A. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *68*, 341.
- [16] Maheswari, S. U.; Balamurugan, K.; Perumal, S.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7278.
- [17] Wu, J.; Li, W.; Chen, L.; Chu, S.; Zhao, C. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 2141 (in Chinese).
(吴建章, 李物兰, 陈玲姿, 楚生辉, 赵承光, 卫涛, 杨树林, 李校堃, 有机化学, **2012**, *32*, 2141.)
- [18] Liang, G.; Yang, S. L.; Shao, L. L.; Zhao, C. G.; Xiao, J.; Lv, Y.

- X.; Yang, J.; Zhao, Y.; Li, X. K. *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 957.
- [19] Liang, G.; Yang, S.; Zhou, H.; Shao, L.; Huang, K.; Xiao, J.; Huang, Z.; Li, X. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 915.
- [20] Katritzky, A. R.; Girgis, A. S.; Slavov, S.; Tala, S. R.; Stoyanova-Slavova, I. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5185.
- [21] Wu, J.; Zhang, Y.; Cai, Y.; Wang, J.; Weng, B.; Tang, Q.; Chen, X.; Pan, Z.; Liang, G.; Yang, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3058.

(Li, L.; Lu, Z.)