熊果酸 A 环衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

孟艳秋* 曹佳 汤义 鹿学宇 刘立伟

(沈阳化工大学制药工程教研室 沈阳 110142)

摘要 以天然产物熊果酸为起始原料, 在 A 环上引入含氮、氧杂环, 同时对其 C(28)位羧基进行酰胺化结构修饰, 设计合成了 10 个新的熊果酸衍生物, 其结构经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS 和元素分析确认。采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法, 选用高表达人口腔表皮样癌细胞(KB)和人胃癌细胞(SGC7901)对它们进行初步的体外抗肿瘤活性研究。结果表明, 所测化合物对 KB 和 SGC7901 肿瘤细胞的抑制活性均明显强于熊果酸, 其中化合物 $\text{UA}_{4.1}$ 和 $\text{UA}_{4.2}$ 对 SGC7901 肿瘤细胞的抑制效果显著, 在 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度下 IC_{50} 值分别为 0.289 和 $0.04\text{ }\mu\text{mol/L}$, 活性明显高于已上市药物吉非替尼($\text{IC}_{50}=1.03\text{ }\mu\text{mol/L}$)。

关键词 五环三萜类化合物; 熊果酸; 抗肿瘤活性

Synthesis and Anti-tumor Activity of Derivatives of Ring A of Ursolic Acid

Meng, Yanqiu* Cao, Jia Tang, Yi Lu, Xueyu Liu, Liwei

(Department of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142)

Abstract Ten derivatives were successfully synthesized by the introduction of nitrogen- and oxygen- containing heterocyclic compounds at ring A and the modification of the amidation at C(28) position in the natural product ursolic acid, which structures were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS and elemental analysis. Their anti-tumor activities against KB and SGC7901 cells *in vitro* were evaluated by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. These results indicated that all of derivatives can inhibit cell proliferation of KB and SGC7901 cells better than ursolic acid (UA), and $\text{UA}_{4.1}$ ($\text{IC}_{50}=0.289\text{ }\mu\text{mol/L}$) and $\text{UA}_{4.2}$ ($\text{IC}_{50}=0.04\text{ }\mu\text{mol/L}$) were also found to have especially more potent inhibitory activity on SGC7901 tumor cells than that of the positive control drug gefitinib ($\text{IC}_{50}=1.03\text{ }\mu\text{mol/L}$).

Keywords pentacyclic triterpenoid, ursolic acid, anti-tumor activity

熊果酸(Ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸, 属于五环三萜类化合物^[1], 在自然界中广泛分布于白花蛇舌草、女贞子、乌梅、夏枯草等植物中。熊果酸及其衍生物具有广泛的生物活性, 包括抗病毒^[2]、抗菌^[3]、保肝和抗炎^[4]以及抗肿瘤作用^[5]。通过对熊果酸的抗肿瘤活性研究, 发现其通过抑制细胞的增殖来诱导细胞凋亡^[6,7]。近年来, 熊果酸结构修饰主要集中于对 A 环、C 环和 C(28)位羧基的改造^[8,9]。熊果酸 C(3)位羟基通过 EDCI 介导的偶联反应^[10]得到相应的化合物 **1**, 产率较高。Meng 课题组^[11]在 C(3), C(28)位引入氨基酸、氨基醇、氨基酸酯以及芳胺等不同基团, 体外 HeLa 细胞抑制试

验显示, C(3)位羟基乙酰化和 C(28)位同时连有氨基醇或苄胺或杂环胺类化合物的结构类似物抗肿瘤活性均高于 UA; 但若 C(3)位乙酰基水解, 只保留 C(28)酰胺结构, 化合物活性下降; C(28)酰胺结构的烷基支链越多对抗肿瘤活性越不利, 若支链上含有苯环的结构, 其活性普遍很好, 且苯环上具有供电子基团的化合物作用效果比无取代基或连有吸电子基团的化合物要强^[12~15]。Chen 课题组^[16]对熊果酸 A 环及 C(28)位进行结构修饰, 得到化合物 **2**。体内和体外的抗骨髓瘤细胞活性研究结果表明, 化合物 **2** 通过诱导骨肉瘤细胞凋亡和阻滞细胞分裂 G1 期, 显著抑制骨肉瘤细胞的存活率, 同时抑制应激

* E-mail: mengyanqiu@hotmail.com

Received October 28, 2015; revised December 16, 2015; published online January 4, 2015.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21372156), the Education Department of Higher School Outstanding Talent Support Program in Liaoning Province (No. LR2013017) and the Science and Technology Project in Shenyang (No. F 16-230-6-00).

国家自然科学基金(No. 21372156)、辽宁省教育厅高等学校优秀人才支持计划(No. LR2013017)和沈阳市科学技术计划(No. F16-230-6-00)资助项目。

活化蛋白激酶(JNK)信号通路,使得 caspase-3 蛋白增加. Fu 等^[17]通过对熊果酸 C(28)位引入酰胺, C(3)位连接苯并异噁唑环得到化合物 **3** 来增加其对 TPH-1 的抑制活性,显著抑制蛋白质 TPH-1 及其 mRNA 的表达. 表面等离子体共振技术(SPR)研究表明,化合物 **3** 具有较强的亲和力,通过抑制血清素的生物合成防止骨质流失,而无去卵巢雌激素副作用.

以上文献报道对熊果酸的结构修饰主要集中在 C(3)位羟基以及 C(28)位羧基. 本文是对熊果酸进行研究,主要对熊果酸 A 环及 C(28)位进行结构修饰,获得相应的衍生物,并运用计算机辅助药物分子对接进行模拟,在 A 环上引入含氮、氧杂环,同时对其 C(28)位羧基进行酰胺化结构修饰,设计合成了 10 个新型熊果酸衍生物,并对化合物进行了体外抗肿瘤活性的研究.

1 结果与讨论

1.1 化学合成

以 UA 为原料,将 C(3)位羟基与 Jones 试剂反应得到 3-氧代熊果酸(UA₁),同时 C(28)位羧基与胺反应成酰胺,得到 UA₂ 系列 5 个 *N*-(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)胺类化合物. 在甲酸乙酯、甲醇钠的反应条件下,将熊果酸 C(2)位引入醛基,得到 UA₃ 系列 5 个 *N*-(2-羟甲基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-胺类化合物. 进一步与水合肼(或盐酸羟胺)反应,在 A 环引入吡唑和异噁唑环,分别得到 UA₄ 系列 5 个 *N*-{乌索烷并[2,3]吡唑-12-烯-28-酰}-胺类化合物、UA₅ 系列 5 个 *N*-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-胺类化合物. 目标化合物的合成路线见 Scheme 1.

1.2 生物活性评价

以吉非替尼(Gefitinib)和阿霉素(adriamycin)为阳性对照物,采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法测试目标化合物体外抗肿瘤活性,活性数据见表 1.

从表 1 中可以看出,所测试的目标化合物对 KB 和 SGC7901 细胞的生长均具有一定的抑制作用,且优于母体 UA. 尤其是化合物 UA₄₋₁、UA₄₋₂ 对 2 种肿瘤细胞表现出显著的抑制作用,在 10 μmol/L 浓度下对 KB 细胞的抑制率分别为 52.78%和 60.21%,其 IC₅₀ 值分别为 13.23 和 6.88 μmol/L; 对 SGC7901 细胞的抑制率分别为 55.98%和 66.72%,其 IC₅₀ 值分别为 0.298 和 0.04 μmol/L,尤其是对 SGC7901 细胞的抑制率分别是阳性对照物吉非替尼的 3.6 和 25.8 倍,是阿霉素的 6.6 和 47.8 倍.

经化合物 UA₄₋₁ 和 UA₄₋₂ 处理 72 h 后,KB 和 SGC7901 细胞形态发生变化(见图 1 和图 2).

表 1 目标化合物对 KB 细胞和 SGC7901 细胞的活性抑制

Table 1 Inhibitory activity of the target compounds on the KB and SGC7901 cells.

Compd.	抑制率 ^a /%		IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	
	KB	SGC7901	KB	SGC7901
UA	11.63	9.31	> 50	> 50
UA ₄₋₁	52.78	55.98	13.23	0.29
UA ₄₋₂	60.21	66.72	6.88	0.04
UA ₄₋₃	51.41	42.55	25.63	18.71
UA ₄₋₄	39.82	43.27	28.52	16.58
UA ₄₋₅	33.28	40.46	> 50	> 50
UA ₅₋₁	29.71	32.67	29.60	> 50
UA ₅₋₂	37.88	40.98	7.69	> 50
UA ₅₋₃	32.17	27.33	30.17	20.23
UA ₅₋₄	28.06	29.58	> 50	12.35
UA ₅₋₅	33.47	23.47	> 50	> 50
吉非替尼	42.95	45.21	20.48	1.03
阿霉素	46.88	48.29	2.33	1.91

^a 化合物浓度为 10 μg/mL, 经过 72 h 处理后的细胞抑制率.

Reagents and conditions: (a) Jones, acetone, r.t., 1 h; (b) (COCl)₂, NH₂R/TEA, CH₂Cl₂, r.t., 4 h; (c) HCOOEt/EtONa, CH₂Cl₂, r.t., 10 h; (d) NH₂NH₂·H₂O, Ethanol, r.t., 4 h, 85 °C; (e) NH₂OH·HCl, ethanol, 4 h, 85 °C

图式 1 熊果酸衍生物的合成
Scheme 1 Synthesis of derivatives of ursolic acid

图 1 不同化合物给药 72 h 后 KB 细胞形态变化及正常细胞对照图
Figure 1 Morphological changes of KB cells induced by different compounds after 72 h
(a) Normal KB cells; (b) UA; (c) UA₄₋₁; (d) UA₄₋₂; (e) Gefitinib; (f) Adriamycin

分析肿瘤细胞形态变化图可知,持续用药蓄积 72 h 后,菱形呈片状分布的 SGC7901 细胞逐步呈现碎块状、空泡,逐步出现细胞凋亡的形态特征,而空白对照组的 SGC7901 细胞仍具有完整细胞膜,细胞株呈连片堆积的恶性增殖状态.由对比观察可以得出,化合物 UA₄₋₁ 和 UA₄₋₂ 对其细胞有显著的抑制作用.

1.3 分子对接

由于 Tph-1 的晶体结构被建立(PDB 编号: 1mlw),

本文将化合物用 molegro virtual docker 软件与之对接,并用 Discovery studio 4.0 直观分析化合物与靶点的结合情况.发现所设计的熊果酸衍生物插入了靶点的疏水口袋当中,与周围的一些氨基酸紧密相连.从图 3 可以观察到 UA₄₋₂、UA₅₋₂ 与氨基酸利用疏水键、 π - σ 键和 π -alkyl 键等相互作用,使化合物分子在疏水口袋里牢固的固定.键能在此次分子对接过程中没有测量.

图2 不同化合物给药 72 h 后 SGC7901 细胞形态变化及正常细胞对照图

Figure 2 Morphological changes of SGC7901 cells induced by different compounds after 72 h
(a) Normal KB cells; (b) UA; (c) UA_{4.1}; (d) UA_{4.2}; (e) Gefitinib; (f) adriamycin

图3 UA_{4.2} 和 UA_{5.2} 与人源性 Tph-1 结晶模型的分子对接模型

Figure 3 Molecular docking model of UA_{4.2} and UA_{5.2} with human derived Tph-1 crystal model

2 结论

为了寻求抗肿瘤活性好的新候选化合物,熊果酸(UA)为先导化合物,运用计算机辅助药物分子对接进行模拟,在A环上引入含氮、氧杂环,同时C(28)位羧基成酰胺,最终设计合成的10个新型的熊果酸衍生物,其结构经¹H NMR和MS所表征.对人口腔表皮样癌细胞(KB)和人胃癌细胞(SGC7901)均表现出较好的增殖抑制活性.尤其是化合物UA_{4.1}和UA_{4.2}对SGC7901细胞的抑制率分别是阳性对照物吉非替尼的3.6和25.8倍,是

阿霉素的6.6和47.8倍.在化合物UA₄系列中,对SGC7901细胞的IC₅₀值UA_{4.2}>UA_{4.1}>UA_{4.4}>UA_{4.3}>UA_{4.5},说明苯环上碳链的延长和吸电子基团不利于抗肿瘤活性. UA_{4.1}、UA_{4.2}>UA_{5.1}>UA_{5.2},说明熊果酸A环引入吡唑环比异噁唑环抗肿瘤活性更好.这对熊果酸衍生物的进一步结构设计、优化和药理活性研究具有一定的指导意义,为今后研究和开发高效、低毒的抗肿瘤药物打下良好的基础.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

Büchi B-540 型熔点测定仪; Bruker ARX-600 型核磁共振分析仪, CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标; 热电-菲尼根 LCQ 型质谱仪. 熊果酸购于广西昌洲天然产物有限公司; 薄层色谱硅胶 GF254 购于深圳市宇恒硅橡胶制品有限公司; 显色剂为 10% 硫酸乙醇溶液; 活性测试所用的 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素); 溴化四氮唑盐(MTT)、蛋白酶 K(Proteinase K)和小牛血清蛋白(BSA)购于上海图赫实业有限公司; KB 细胞和 SGC7901 细胞由沈阳药科大学药理教研室提供; 阳性对照物吉非替尼 J20070047 购于阿斯利康制药有限公司. 所有试剂均为分析纯或化学纯.

3.2 实验方法

3.2.1 中间体的合成

3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酸(UA_1)的合成^[10]: 于茄形瓶中加入 300 mg (0.66 mol)熊果酸, 30 mL 丙酮, 冰水浴冷却下滴加新配置的 Jones 试剂至反应液 10 min 内红褐色不褪去, 升温至室温, 反应 1 h, TLC 监测反应终点[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$]. 反应完毕, 加 4 mL 异丙醇, 反应液变绿, 室温搅拌 30 min, 淬灭剩余的氧化剂. 反应完成后, 用乙酸乙酯和饱和的食盐水萃取 3 次, 合并有机相(清亮液体), 加入无水硫酸钠干燥过夜, 抽滤旋蒸, 浓缩得白色 3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酸(即 3-氧代熊果酸)粗品 291 mg. 快速柱层析[洗脱剂为 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$], 分离纯化浓缩, 室温干燥得固体, 产率为 83.33%. m.p. 233.2~234.5 $^{\circ}\text{C}$.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)胺类(UA_2)的合成^[17]: 于茄形瓶中加入上一反应产物 200 mg, 20 mL 二氯甲烷, 2 mL 草酰氯, 加入 2 滴 DMF 作为催化剂, 在室温下搅拌 4 h, TLC 监测反应终点[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$], 反应完毕, 减压蒸除溶剂二氯甲烷, 用环己烷洗两次再进行旋蒸, 得 3-氧代-乌苏烷型-12-烯-28-酰氯粗品, 用二乙胺调 pH 至 8~9, 待 pH 稳定后再加入 4 mL 胺类, 室温搅拌 24 h, TLC 监测反应终点[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{丙酮})=3:1$], 反应完成后, 加入 30 mL 水, 使其分层, 用 HCl 调 pH 至 3, 减压蒸除反应溶剂, 浓缩得黄色 N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)胺类粗品.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-苄胺($\text{UA}_{2,1}$)的合成: 照化合物 UA_2 的合成方法, 将化合物 UA_2 中 C(28)位引入苄胺. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$], 得淡黄色固体, 产率为

60.3%. m.p. 193.4~194.6 $^{\circ}\text{C}$.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-苄胺($\text{UA}_{2,2}$)的合成: 照化合物 UA_2 的合成方法, 将化合物 UA_2 中 C(28)位引入苄胺. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$], 得淡黄色固体, 产率为 58.7%. m.p. 198.7~199.5 $^{\circ}\text{C}$.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-间甲氧基苄胺($\text{UA}_{2,3}$)的合成: 照化合物 UA_2 的合成方法, 将化合物 UA_2 中 C(28)位引入间甲氧基苄胺. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$], 得淡黄色固体, 产率为 47.3%. m.p. 202.5~203.9 $^{\circ}\text{C}$.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-对异丙基苄胺($\text{UA}_{2,4}$)的合成: 照化合物 UA_2 的合成方法, 将化合物 UA_2 中 C(28)位引入对异丙基苄胺. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$], 得淡黄色固体, 产率为 43.3%. m.p. 210.6~211.4 $^{\circ}\text{C}$.

N -(3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-3-氯-4-氟苄胺($\text{UA}_{2,5}$)的合成: 照化合物 UA_2 的合成方法, 将化合物 UA_2 中 C(28)位引入 3-氯-苄胺. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=5:1$], 得淡黄色固体, 产率为 48.1%. m.p. 213.8~214.5 $^{\circ}\text{C}$.

N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-胺类(UA_3)的合成^[18]: 于茄形瓶中加入上一反应产物 100 mg, 20 mL 二氯甲烷, 甲醇钠 0.1 g, 甲酸乙酯 0.1 mL, 反应 10 h, TLC 监测反应终点[展开剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=3:1$], 反应完毕减压蒸除反应溶剂二氯甲烷, 用乙酸乙酯和饱和食盐水萃取 3 次, 合并有机相(黄色澄清液体), 减压蒸除乙酸乙酯, 得到 N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-胺类粗品.

N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-苄胺($\text{UA}_{3,1}$)的合成: 按照化合物 UA_3 的合成方法, 由化合物 $\text{UA}_{2,1}$ 和甲醇钠、甲酸乙酯反应, 得到中间体 $\text{UA}_{3,1}$, 该化合物为烯醇结构不稳定, 所以无需处理直接投入下一步反应.

N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-苄胺($\text{UA}_{3,2}$)的合成: 按照化合物 UA_3 的合成方法, 将化合物 $\text{UA}_{2,2}$ 和甲醇钠、甲酸乙酯反应, 得到中间体 $\text{UA}_{3,2}$, 该化合物为烯醇结构不稳定, 所以无需处理直接投入下一步反应.

N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-间甲氧基苄胺($\text{UA}_{3,3}$)的合成: 按照化合物 UA_3 的合成方法, 将化合物 $\text{UA}_{2,3}$ 和甲醇钠、甲酸乙酯反应, 得到中间体 $\text{UA}_{3,3}$, 该化合物为烯醇结构不稳定, 所以无需处理直接投入下一步反应.

N -(2-羟甲叉基-3-羰基-乌索烷-12-烯-28-酰)-对异

丙基苯胺(**UA_{3.4}**)的合成: 按照化合物 **UA₃** 的合成方法, 将化合物 **UA_{2.4}** 和甲醇钠、甲酸乙酯反应, 得到中间体 **UA_{3.4}**, 该化合物为烯醇结构不稳定, 所以无需处理直接投入下一步反应。

N-(2-羟甲基-3-羰基-乌索烷型-12-烯-28-酰)-3-氯-4-氟苯胺(**UA_{3.5}**)的合成: 按照化合物 **UA₃** 的合成方法, 将化合物 **UA_{2.5}** 和甲醇钠、甲酸乙酯反应, 得到中间体 **UA_{3.5}**, 该化合物为烯醇结构不稳定, 所以无需处理直接投入下一步反应。

3.2.2 目标化合物的合成

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-胺类(**UA₄**)的合成^[18]: 于茄形瓶中加入上一反应产物 100 mg, 乙醇 20 mL, 水合肼 0.1 mL, 83 °C 冷凝回流 4 h, TLC 监测反应终点[展开剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1], 反应完毕减压蒸除反应溶剂无水乙醇, 用乙酸乙酯和饱和食盐水萃取 3 次, 合并有机相(黄色澄明液体), 减压蒸除乙酸乙酯, 得到 **N**-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-胺类粗品。

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-苯胺(**UA_{4.1}**)的合成: 按照化合物 **UA₄** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.1}** 和水合肼反应。粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1], 得淡黄色固体, 产率为 58.3%。m.p. 183.5~184.7 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.82 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.45 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.30 (d, *J*=6.5 Hz, 3H), 7.11 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 2.61 (d, *J*=16.6 Hz, 1H), 2.20~2.05 (m, 6H), 1.72~1.53 (m, 4H), 1.50~1.5 (m, 6H), 1.06 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.81 (d, *J*=6.4 Hz, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.73 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 177.6, 172.9, 139.7, 138.2, 128.5, 127.8, 127.3, 120.3, 113.6, 54.0, 53.9, 45.6, 43.2, 42.5, 39.6, 38.9, 38.4, 37.1, 35.5, 34.6, 32.0, 30.8, 28.6, 27.8, 24.7, 23.1, 21.1, 18.5, 17.0, 16.7, 15.3; MS (70 eV) *m/z* (%): 1107 (M⁺, 78), 944 (37), 819 (35), 555 (35), 554 (100), 287 (25). Anal. calcd for C₃₇H₅₁N₃O: C 80.24, H 9.28, N 7.59; found C 80.21, H 9.22, N 7.53.

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-苄胺(**UA_{4.2}**)的合成: 按照化合物 **UA₄** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.2}** 和水合肼反应。粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1], 得淡黄色固体, 产率为 54.6%。m.p. 187.4~188.7 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.78 (s, 1H), 7.40~7.27 (m, 3H), 7.23 (s, 2H), 7.15 (s, 1H), 6.16 (t, *J*=5.1 Hz, 1H), 5.27 (d, *J*=3.3 Hz, 1H), 4.52 (dd, *J*=14.5, 5.8 Hz, 1H), 4.23 (dd, *J*=14.5, 4.6 Hz, 1H), 2.53 (d, *J*=15.1 Hz, 1H), 2.07~1.78 (m, 7H),

1.75~1.62 (m, 3H), 1.56~1.41 (m, 7H), 1.30 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.81 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 177.6, 172.9, 150.0, 139.7, 138.2, 128.5, 127.8, 127.3, 125.3, 113.6, 54.0, 53.3, 47.7, 45.9, 43.6, 42.5, 39.6, 38.9, 38.4, 37.1, 35.5, 34.6, 32.0, 30.8, 28.7, 27.8, 24.7, 23.1, 21.1, 18.6, 17.0, 16.7, 15.3; MS (70 eV) *m/z* (%): 763 (M⁺, 37), 750 (24), 598 (21), 584 (45), 568 (100), 558 (23), 471 (16), 407 (19). Anal. calcd for C₃₈H₅₃N₃O: C 80.37, H 9.41, N 7.40; found C 80.41, H 9.34, N 7.41.

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-间甲氧基苯胺(**UA_{4.3}**)的合成: 按照化合物 **UA₄** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.3}** 和水合肼反应。粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1], 得黄色固体, 产率为 46.9%。m.p. 189.6~190.4 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.73 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.36 (d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.45 (d, *J*=15.1 Hz, 1H), 2.13~1.94 (m, 6H), 1.87~1.70 (m, 4H), 1.60~1.51 (m, 4H), 1.31 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.93 (d, *J*=6.4 Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 175.8, 172.9, 162.2, 150.1, 140.3, 136.2, 131.1, 129.5, 125.3, 115.7, 113.6, 108.6, 55.3, 54.2, 53.3, 48.3, 45.9, 42.6, 39.8, 39.5, 39.0, 38.4, 37.0, 35.5, 34.6, 31.9, 30.8, 28.7, 27.8, 24.9, 23.2, 23.0, 21.1, 18.6, 17.1, 16.6, 15.4; MS (70 eV) *m/z* (%): 1059 (M⁺, 31), 721 (37), 720 (49), 633 (22), 582 (49), 583 (100). Anal. calcd for C₃₈H₅₃N₃O₂: C 78.17, H 9.15, N 7.20; found C 78.21, H 9.21, N 7.17.

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-对异丙基苯胺(**UA_{4.4}**)的合成: 按照化合物 **UA₄** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.4}** 和水合肼反应。粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: *V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=10:1], 得黄色固体, 产率为 44.8%。m.p. 193.1~194.5 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ : 7.72 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.40 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.23 (d, *J*=4.5 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 3.12 (s, 1H), 2.30~2.23 (m, 1H), 2.15~2.02 (m, 3H), 1.95~1.84 (m, 3H), 1.76~1.53 (m, 4H), 1.41~1.37 (m, 4H), 1.35~1.31 (m, 6H), 1.25 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.86 (d, *J*=4.6 Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.71 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 176.1, 172.9, 150.0, 144.2, 140.1, 138.4, 136.5, 126.8, 125.7, 113.5, 54.2, 53.3, 48.6, 45.9, 42.6, 39.8, 39.4, 39.2, 38.7, 36.9, 35.5, 34.6, 31.9, 31.7, 30.7, 29.6, 28.7, 27.8, 24.9, 24.4, 24.1, 23.4, 23.1, 21.1, 18.6, 17.1, 16.5, 15.4; MS (70 eV)

m/z (%): 595 (M^+ , 100), 598 (45), 594 (25), 593 (20). Anal. calcd for $C_{40}H_{57}N_3O$: C 80.62, H 9.64, N 7.05; found C 80.54, H 9.61, N 6.99.

N-{乌索烷并[2,3]吡啶-12-烯-28-酰}-3-氯-4-氟苯胺(**UA_{4.5}**)的合成: 按照化合物 **UA₄** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.5}** 和水合肼反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1], 得黄色固体, 产率为 47.7%. m.p. 197.5~198.1 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.78 (s, 1H), 7.64 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 2.94 (d, $J=15.1$ Hz, 1H), 2.10~1.96 (m, 6H), 1.75 (dd, $J=28.3$, 18.7 Hz, 4H), 1.46~1.38 (m, 6H), 1.36 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.94 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 176.1, 172.9, 159.7, 150.0, 143.2, 140.1, 136.5, 128.3, 121.8, 119.7, 113.4, 108.5, 54.2, 53.3, 48.6, 45.9, 42.6, 39.8, 39.4, 39.2, 38.7, 36.9, 35.5, 34.3, 31.9, 30.7, 29.6, 28.7, 27.8, 24.9, 23.4, 23.0, 21.1, 18.6, 17.1, 16.5, 15.4; MS (70 eV) m/z (%): 721 (M^+ , 50), 658 (31), 606 (100), 553 (35), 508 (25). Anal. calcd for $C_{37}H_{49}ClFN_3O$: C 73.30, H 8.15, N 6.93; found C 73.24, H 8.09, N 7.01.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-胺类(**UA₅**)的合成^[19]: 于茄形瓶中加入上一反应产物 100 mg, 乙醇 20 mL, 盐酸羟胺 0.1 mL, 83 °C 恒温冷凝回流 4 h, TLC 监测反应终点[展开剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=3:1], 反应完毕减压蒸除反应溶剂无水乙醇, 用乙酸乙酯和饱和食盐水萃取 3 次, 合并有机相(黄色澄明液体), 减压蒸除乙酸乙酯, 得到 *N*-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-胺类粗品.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-苯胺(**UA_{5.1}**)的合成: 按照化合物 **UA₅** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.1}** 和盐酸羟胺反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1], 得淡黄色固体, 产率为 57.4%. m.p. 198.9~199.5 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.86 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.48 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=6.5$ Hz, 3H), 5.62 (s, 1H), 2.70 (d, $J=16.6$ Hz, 1H), 2.25~2.10 (m, 6H), 1.86~1.76 (m, 4H), 1.63~1.50 (m, 6H), 1.48 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 177.6, 174.2, 146.0, 139.7, 137.2, 128.5, 127.3, 120.3, 113.6, 54.0, 48.7, 45.2, 43.3, 42.5, 39.6, 38.9, 38.4, 37.1, 35.5, 34.6, 32.0, 30.8, 28.7, 27.6, 24.7, 23.1, 21.0, 18.6, 17.0, 16.7, 15.3; MS (70 eV) m/z (%): 588 (M^+ , 21), 556 (33), 553 (50), 554 (100), 493 (32). Anal. calcd for $C_{37}H_{50}N_2O_2$: C 80.10,

H 9.08, N 5.09; found C 80.03, H 9.05, N 5.09.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-苄胺(**UA_{5.2}**)的合成: 按照化合物 **UA₅** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.2}** 和盐酸羟胺反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1], 得淡黄色固体, 产率为 55.9%. m.p. 201.8~202.6 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.85 (s, 1H), 7.46~7.28 (m, 3H), 7.25 (s, 2H), 6.24 (t, $J=5.1$ Hz, 1H), 5.34 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 4.62 (dd, $J=14.5$, 5.8 Hz, 1H), 4.31 (dd, $J=14.5$, 4.6 Hz, 1H), 2.57 (d, $J=15.11$ Hz, 1H), 2.10~1.93 (m, 7H), 1.90~1.72 (m, 3H), 1.60~1.41 (m, 7H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 177.6, 174.2, 150.0, 145.2, 139.7, 138.2, 128.5, 127.3, 125.3, 113.6, 54.0, 53.3, 47.7, 45.9, 43.6, 42.5, 39.6, 38.9, 38.4, 37.1, 35.5, 34.6, 32.0, 30.8, 28.7, 27.8, 24.7, 23.1, 21.1, 18.6, 17.0, 16.7, 15.3; MS (70 eV) m/z (%): 896 (M^+ , 33), 758 (43), 595 (32), 569 (100), 279 (42). Anal. calcd for $C_{35}H_{52}N_2O_2$: C 80.24, H 9.21, N 4.92; found C 80.16, H 9.17, N 4.89.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-间甲氧基苯胺(**UA_{5.3}**)的合成: 按照化合物 **UA₅** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.3}** 和盐酸羟胺反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1], 得黄色固体, 产率为 44.3%. m.p. 205.7~206.4 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.84 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.53 (d, $J=15.1$ Hz, 1H), 2.17~1.98 (m, 6H), 1.90~1.72 (m, 4H), 1.67~1.55 (m, 4H), 1.32 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.92 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ : 175.8, 174.2, 162.2, 153.7, 150.1, 140.3, 131.1, 129.7, 121.3, 115.7, 113.6, 108.6, 55.3, 54.2, 53.3, 48.3, 45.9, 42.6, 39.8, 39.5, 39.0, 38.4, 37.0, 35.5, 34.6, 31.9, 30.8, 28.7, 27.8, 24.9, 23.2, 23.0, 21.1, 18.6, 17.1, 16.6, 15.4; MS (70 eV) m/z (%): 627 (M^+ , 20), 613 (40), 584 (45), 553 (21), 524 (15), 492 (15). Anal. calcd for $C_{38}H_{52}N_3O_3$: C 78.04, H 8.96, N 4.79; found C 78.01, H 9.01, N 4.79.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-对异丙基苯胺(**UA_{5.4}**)的合成: 按照化合物 **UA₅** 的合成方法, 由化合物 **UA_{3.4}** 和盐酸羟胺反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: V (石油醚): V (乙酸乙酯)=10:1], 得黄色固体, 产率为 48.7%. m.p. 207.3~204.7 °C; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 7.85 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=4.5$ Hz, 2H), 5.33 (s, 1H), 3.12 (s, 1H), 2.26~2.23 (m, 1H), 2.15~2.03 (m, 3H), 1.93~1.82 (m,

3H), 1.75~1.54 (m, 4H), 1.40~1.38 (m, 4H), 1.35~1.31 (m, 6H), 1.27 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.86 (d, $J=4.6$ Hz, 3H), 0.74 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 176.1, 174.2, 152.6, 150.0, 144.2, 140.1, 136.5, 126.8, 125.7, 113.5, 54.2, 53.3, 48.6, 45.9, 42.6, 39.8, 39.4, 39.2, 38.7, 36.9, 35.5, 34.6, 31.9, 31.7, 30.7, 29.6, 28.7, 27.8, 24.9, 24.6, 24.4, 23.4, 23.1, 21.1, 18.6, 17.1, 16.5, 15.4; MS (70 eV) m/z (%): 620 (M^+ , 17), 598 (32), 596 (100), 595 (25), 524 (19). Anal. calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_2$: C 80.49, H 9.46, N 4.69; found C 80.41, H 9.43, N 4.67.

N-{乌索烷并[2,3]异噁唑-12-烯-28-酰}-3-氯-4-氟苯胺(UA_{5-5})的合成: 按照化合物 UA_5 的合成方法, 由化合物 UA_{3-5} 和盐酸羟胺反应. 粗品用硅胶柱色谱纯化[洗脱剂: $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=10:1$], 得黄色固体, 产率为53.6%. m.p. 211.4~212.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 7.88 (s, 1H), 7.68 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 3.11 (d, $J=15.1$ Hz, 1H), 2.62~2.07 (m, 6H), 1.86 (dd, $J=28.3$ Hz, 18.7 Hz, 4H), 1.71~1.55 (m, 6H), 1.43 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 0.99 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 176.1, 174.2, 159.7, 153.5, 150.0, 140.1, 136.5, 128.3, 121.8, 119.7, 113.4, 108.5, 54.2, 53.3, 48.6, 45.9, 42.6, 39.8, 39.4, 39.1, 38.7, 36.9, 35.5, 34.6, 31.9, 30.7, 29.6, 28.7, 27.8, 24.9, 23.0, 23.1, 21.1, 18.6, 17.1, 16.5, 15.4; MS (70 eV) m/z (%): 908 (M^+ , 27), 906 (57), 577 (40), 607 (100), 606 (61). Anal. calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{ClFN}_2\text{O}_2$: C 73.18, H 7.97, N 4.61; found C 73.18, H 7.92, N 4.58.

3.2.3 初步体外细胞毒活性测试

以吉非替尼为阳性对照药, 采用 MTT 法对合成的目标化合物进行体外抗肿瘤活性测试, 所选用的肿瘤细胞为人口腔表皮样癌细胞(KB)、人胃癌细胞(SGC7901). 对数生长期肿瘤细胞培养于 96 孔培养板内, 每孔 100 μL (大约含 4000 个细胞), 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养, 培养 24 h 后, 给药组加入含有浓度为 10^{-5} mol/L 的测试物, 至少设 3 个平行孔, 阴性对照组加入与给药组等体积的溶剂, 并设只加培养基的空白对照组, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养, 48 h 后弃培养液, 每孔加入 50 μL (1 mg/mL) MTT 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4 h, 弃上

清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解甲臜颗粒, 轻度振荡溶解. 在酶标仪波长 490 nm 条件下测定各孔光密度 (OD) 值, 计算所测化合物对细胞的抑制率和 IC_{50} . 试验重复 3 次, 结果取平均值.

辅助材料(Supporting Information) ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 MS 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Wang, P.; Zhang, Z. Y.; Wu, Z. J. *Chin. Med. Mater.* **2000**, 23, 717.
- [2] Kazakova, O. B.; Giniyatullina, G. V.; Yamansarov, E. Y.; Tolstikov, G. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4088.
- [3] Cunha, W. R.; de Matos, G. X.; Souza, M. G.; Tozatti, M. G.; Andrade, E.; Silva, M. L.; Martins, C. H.; da Silva, R.; Da Silva Filho, A. A. *Pharm. Biol.* **2010**, 48, 166.
- [4] Jin, Y. R.; Jin, J. L.; Li, C. H.; Piao, X. X.; Jin, N. G. *Pharm. Biol.* **2012**, 50, 523.
- [5] Liu, W.; Tan, X.; Shu, L.; Sun, H.; Song, J.; Jin, P.; Yu, S.; Sun, M.; Jia, X. *Molecules* **2012**, 17, 9104.
- [6] Wang, J.; Liu, L.; Qiu, H.; Zhang, X.; Guo, W.; Chen, W.; Tian, Y.; Fu, L.; Shi, D.; Cheng, J.; Huang, W.; Deng, W. *PLoS One* **2013**, 8, 63872.
- [7] Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A.; Jing, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 5774.
- [8] Nobuchika, S.; Kouhei, T.; Nicole, H.; Kenji, D.; Reiko, T.; Shiro, M. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 5000.
- [9] Meng, Y. Q.; Zhan, L. F. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2015**, 11, 1.
- [10] Fu, H. J.; Zhou, Y. R.; Bao, B. H.; Jia, M. X.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Li, J. X.; He, H. L.; Zhou, X. M. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 4692.
- [11] Liu, D.; Meng, Y. Q.; Zhao, J. *Chem. Res. Chin. Univ.* **2008**, 24, 42.
- [12] Shen, L. H.; Lai, Y. S.; Zhang, Y. H. *J. Chin. Med. Univ.* **2008**, 39, 103 (in Chinese).
(申利红, 赖宜生, 张奕华, 中国药科大学学报, **2008**, 39, 103.)
- [13] Bi, Y.; Xu, J. Y.; Wu, X. M. *Chin. J. New Drugs* **2005**, 14, 23 (in Chinese).
(毕毅, 徐进宜, 吴晓明, 中国新药杂志, **2005**, 14, 23.)
- [14] Li, D.; Zhou, J. P.; Wu, X. M. *Pharm. Dev.* **2004**, 28, 120 (in Chinese).
(李丹, 周金培, 吴晓明, 药学进展, **2004**, 28, 120.)
- [15] Meng, Y. Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 848.
- [16] Chen, J.; Fu, H.; Wang, Z.; Yin, F.; Li, J.; Hua, Y. *Cell. Phys. Biochem.* **2014**, 34, 724.
- [17] Fu, H. J.; Yang, Z.; Zhou, Y. R.; Bao, B. H.; Yun, D.; Li, J. X. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, 76, 33.
- [18] Chen, J.; Liu, J.; Zhang, L. Y.; Wu, G. Z.; Hua, W. Y.; Wu, X. M.; Sun, H. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2915.
- [19] Qiu, W. W.; Shen, Q.; Yang, F.; Wang, B.; Zou, H.; Li, J. Y.; Li, J.; Tang, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6618.

(Qin, X.)