

具有靛红结构的吡唑衍生物的合成及其诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的研究

张磊^{†,*a} 李文赞^{†,b} 刘来^a 郑诚月^a
王杨^a 徐应淑^a 史大斌^a 聂绪强^a
国佳莹^a 朱春媛^a 王京^{*,a}

(^a 遵义医学院药学院 遵义 563003)

(^b 成都大学四川抗菌素工业研究所 成都 610051)

摘要 基于药效团拼合的设计原理,以 4-羟基苯乙酮为原料,通过加成、环化、取代、肼解和缩合等多步反应构建了两类含有靛红结构的吡唑衍生物,共计 12 个目标产物,其结构经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证。采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)法测试目标产物对人非小细胞肺癌细胞 A549 的体外抑制作用,部分化合物显示出一定的抗增殖活性,其中 *N'*-(3-亚氨基-6-氯吲哚-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰肼(**7e**)和 *N'*-(3-亚氨基-6-溴吲哚-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡唑-5-甲酰肼(**7f**)的 IC₅₀ 值分别为 30.41 和 29.69 μmol/L。流式细胞术检测表明,化合物 **7f** 能够剂量依赖性地诱导 A549 细胞凋亡,并降低线粒体膜电位,但对细胞周期没有影响。上述研究证明,目标产物 **7f** 能够通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤活性。

关键词 吡唑; 靛红; 抗肿瘤活性; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

Synthesis of Novel Pyrazole Derivatives Containing Isatins as Potential Apoptosis Inducer in Non-small Lung Cancer A549 Cells

Zhang, Lei^{†,*a} Li, Wenyun^{†,b} Liu, Lai^a Zheng, Chengyue^a
Wang, Yang^a Xu, Yingshu^a Shi, Dabin^a Nie, Xuqiang^a
Guo, Jiaying^a Zhu, Chunyuan^a Wang, Jing^{*,a}

(^a School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563003)

(^b Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610051)

Abstract Two kinds of novel pyrazole derivatives containing isatins, total of 12 target compounds, were prepared from 4-hydroxyacetophenone via addition, cyclization, substitution, hydrazinolysis and condensation, which were characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. The anti-neoplastic activity of target molecules was evaluated against human non-small cell lung cancer cell line A549 using cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. The data showed that several compounds possessed potential anticancer effect. Among them, *N'*-(3-imino-6-chloroindole-2-one)-1-benzyl-3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazole-5-carbohydrazide (**7e**) and *N'*-(3-imino-6-bromoindole-2-one)-1-benzyl-3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazole-5-carbohydrazide (**7f**) exhibited IC₅₀ values of 30.41 and 29.69 μmol/L, respectively. Flow cytometry showed that compound **7f** could induce apoptosis of A549 cells, reduce the mitochondrial membrane potential, but have no effect on the cell cycle. Those data indicated that the anti-proliferative activity of molecule **7f** was mediated by apoptosis-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in A549 cells.

* Corresponding authors. E-mail: lzhang@zmc.edu.cn; wangjing@zmc.edu.cn

Received April 6, 2017; revised May 5, 2017; published online May 17, 2017.

Project supported by the Department of Science and Technology of Guizhou Province (Nos. [2014]7565, [2014]7557, [2015]6010), the Priming Scientific Research Foundation for Doctoral Program of Zunyi Medical University (No. F-631), the National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (No. 201510661009), the Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship of Zunyi Medical University (Nos. [2014]5811, [2014]2918) and the Discipline Construction Funding (Medicinal Chemistry) of Zunyi Medical University.

贵州省科技厅(Nos. [2014]7565, [2014]7557, [2015]6010)、遵义医学院博士科研启动基金(No. F-631)、国家级大学生创新创业(No. 201510661009)、遵义医学院大学生创新创业(Nos. [2014]5811, [2014]2918)和遵义医学院学科建设(药物化学)资助项目。

[†] 共同第一作者(These authors contributed equally to this work).

Keywords pyrazole; isatin; antineoplastic activity; cell apoptosis; mitochondrial membrane potential

肺癌是一种常见的恶性肿瘤, 对人类健康造成了严重的危害, 全世界每年大约有 160 万人死于肺癌^[1]. 2015 年, 中国癌症统计数据显示, 肺癌在我国癌症中发病率最高, 也是癌症死因之首^[2]. 肺癌主要分为两类: 非小细胞肺癌(Non-small Cell Lung Cancer, NSCLC)和小细胞肺癌(Small Cell Lung Cancer, SCLC). 其中, 非小细胞肺癌约占 80%, 它是一种对化疗和放射治疗都不敏感的亚型. 尽管已经有一些针对 NSCLC 的化学药物上市, 但 NSCLC 患者的治愈率仍然很低^[3]. 因此, 人们迫切需要发现能够有效治疗 NSCLC 的药物.

吡唑是一种具有潜在生物活性的氮杂环, 近年来的研究表明吡唑衍生物具有多种药理活性, 如抗肿瘤^[4]、抗菌^[5]和抗炎^[6]等; 此外, 吡唑衍生物还能够作为杀虫剂^[7]和除草剂^[8]. 目前, 含有吡唑结构的药物有非甾体抗炎药塞来西布^[9]、杀菌剂唑菌胺酯^[10]以及抗肿瘤药阿西替尼^[11]等. 近年来, 赵宝祥课题组^[12~15]构建了多种结构类型的 1-苯甲基-3-苯基吡唑类化合物库, 如酰肼、希夫碱、糖缀合物和羟肟酸衍生物. 实验结果显示, 部分 1-苯甲基-3-苯基吡唑衍生物具有显著的抗非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的活性. 如图 1 所示, 化合物 **a** 和 **b** 对 A549 细胞的 IC₅₀ 值分别为 2.08 和 6.77 $\mu\text{mol/L}$. 同时, Bertoša 等^[16]的研究结果表明, 1-苯甲基-3-苯基吡唑衍生物能够有效抑制 A549 细胞的增殖. 本课题组^[17~19]前期合成了一系列 1-苯甲基-3-苯基吡唑衍生物, 体外细胞毒测试结果表明, 部分化合物对 HepG2 细胞具有潜在的抗增殖活性.

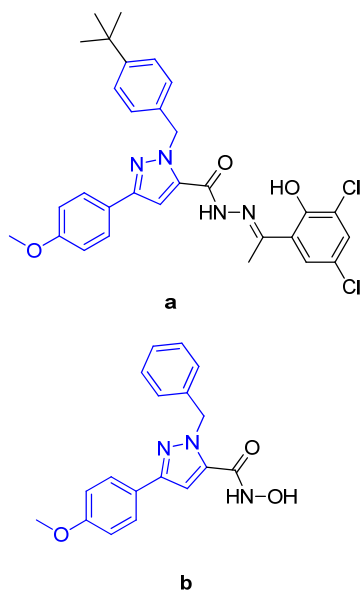


图 1 已报道的 1-苯甲基-3-苯基吡唑类化合物

Figure 1 Reported 1-benzyl-3-phenyl pyrazole derivatives

此外, 吡唑也是一种常见的氮杂环结构, 存在于众多天然活性产物、内源性物质和药物结构中, 被誉为“成药性”优势骨架^[20]. 其中, 靛红又称吡啶酮, 是吡啶的二酮形式, 其结构被广泛应用于抗肿瘤药物研究领域, 是具有抗肿瘤活性的药效团^[21,22]. 例如, 靛红片段存在于中药青黛抗肿瘤有效成分靛玉红^[23]和小分子多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼^[24]结构中. 本课题组^[25]研究发现, 靛红基团能够有效增强天然产物鬼臼毒素的抗肿瘤细胞耐药性. 近年来的研究还表明^[26~28], 靛红衍生物对 A549 细胞也有一定的抗增殖活性. 如图 2 所示, 化合物 **c** 和 **d** 对 A549 的 IC₅₀ 值分别为 9.6 和 27.6 $\mu\text{mol/L}$.

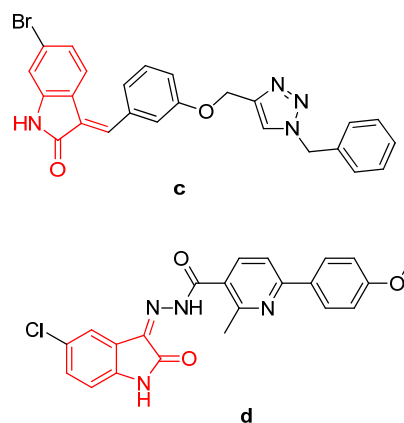


图 2 已报道的靛红类化合物

Figure 2 Reported isatin derivatives

基于 1-苯甲基-3-苯基吡唑和靛红结构均有一定的抗 A549 细胞增殖活性, 为了寻找具有潜在抗非小细胞肺癌的先导化合物, 本工作利用药效团拼合原理^[29,30], 将 1-苯甲基-3-苯基吡唑和靛红药效团进行缀合, 设计并合成了两种结构类型的含有靛红结构的吡唑衍生物(图 3), 同时采用 CCK-8 法测试目标分子对 A549 细胞的抑制活性, 并对其作用机制进行了初步的探索. 合成路线见 Schemes 1 和 2.

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

首先以 4-甲氧基苯乙酮(**1**)为原料, 在乙醇/乙醇钠体系中与草酸二乙酯反应, 制备中间体 **2**; **2** 与水合肼环合得到 3-(4-甲氧基苯基)-吡唑-5-羧酸乙酯(**3**); **3** 与溴苄进行取代反应得到中间体 **4**; **4** 与水合肼反应制得酰肼中间体 **5**; **5** 与(取代)靛红缩合制备得到席夫碱目标产物 **7a~7f** (Scheme 1). 其次, 中间体 **5** 与二硫化碳反应制得中间体 **8**; (取代)靛红 **6a~6f** 与 1,2-二溴乙烷进行取代

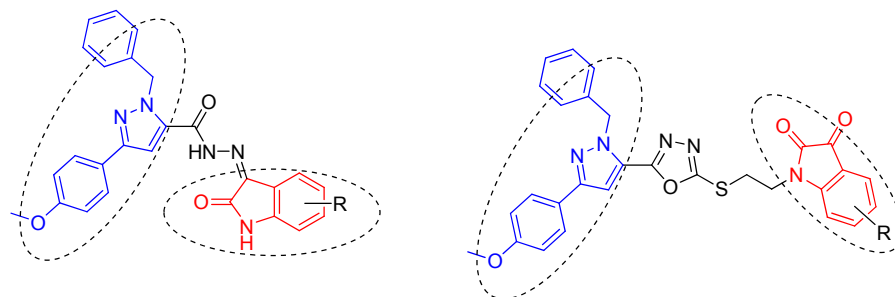
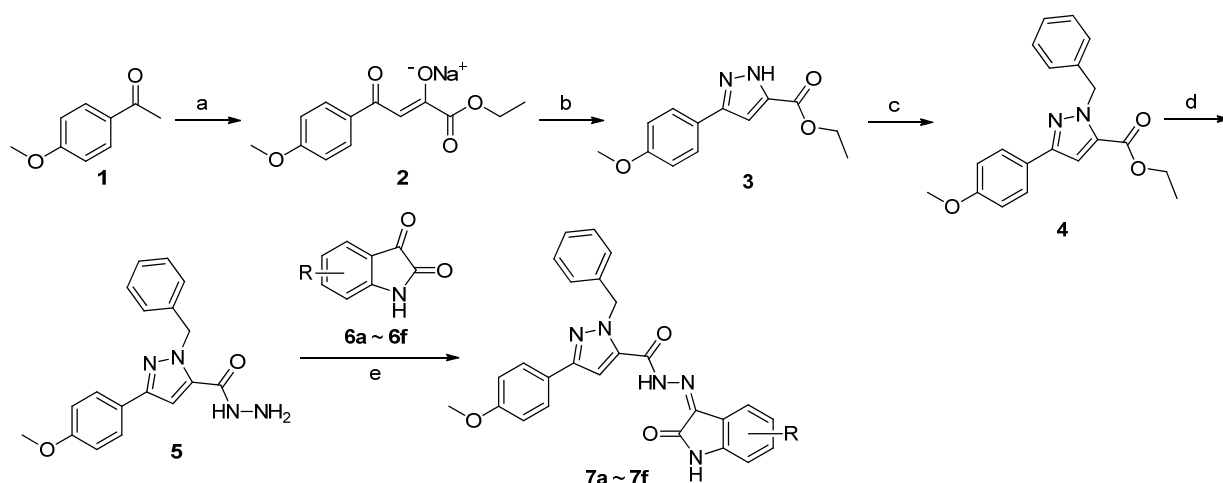


图3 目标产物设计

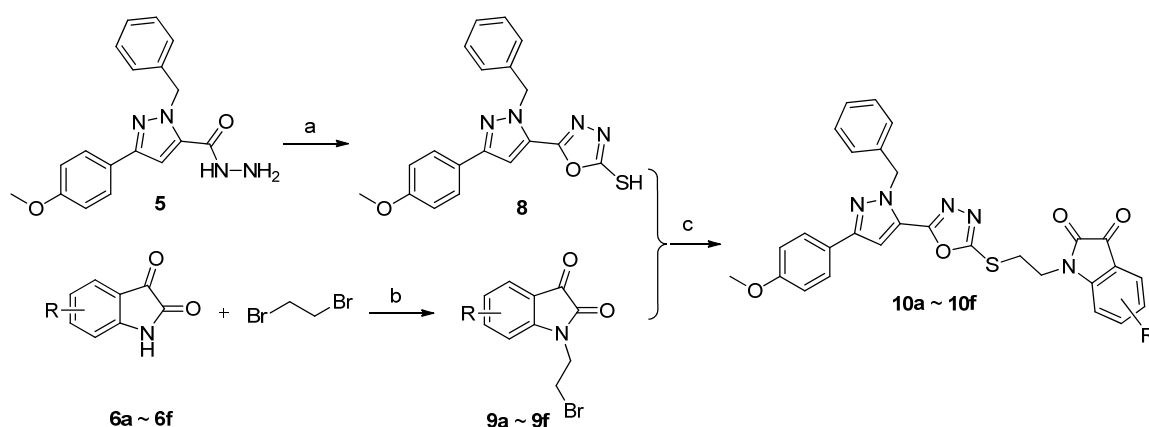
Figure 3 Design of target compounds



Reagents and conditions: (a) diethyl oxalate, EtONa, EtOH, 25 °C; (b) hydrazine hydrate, AcOH, reflux; (c) BnCl, K₂CO₃, CH₃CN, reflux; (d) hydrazine hydrate, EtOH, reflux; (e) EtOH, cat. H₂SO₄, reflux.

图式1 目标化合物 7a~7f 的合成

Scheme 1 Synthetic route of the target compounds 7a~7f



Reagents and conditions: (a) CS₂, KOH, EtOH, reflux; (b) 1,2-dibromoethane, NaH, DMF, 25 °C; (c) DMF, K₂CO₃, KI, 80 °C.

图式2 目标化合物 10a~10f 的合成

Scheme 2 Synthetic route of the target compounds 10a~10f

反应, 制得(取代)靛红溴代物中间体 9a~9f; 以碳酸钾为缚酸剂, 8 和 9a~9f 反应得到噁二唑目标产物 10a~10f, 合成路线如 Scheme 2 所示. 所有目标产物的结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证.

1.2 目标化合物的体外抗肿瘤活性

采用 CCK-8 法测试目标产物对 A549 细胞的抑制活性, 顺铂(DDP)作为阳性药, 实验结果如表 1 所示. 作用 72 h 后, 大部分目标化合物没有显示出显著的抗 A549

细胞增殖的活性, 只有部分化合物具有一定的抗肿瘤活性, 例如化合物 **7e**, **7f** 和 **10f**, 其 IC_{50} 值分别为 30.41, 29.69 和 58.48 $\mu\text{mol/L}$, 但均弱于阳性药顺铂($IC_{50}=8.18 \mu\text{mol/L}$).

表 1 目标化合物对 A549 细胞的体外抗增殖活性

Table 1 Antiproliferative activity of target compounds against A549 cells *in vitro*

Compd.	R	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
7a	H	>100
7b	4-Cl	>100
7c	4-Br	>100
7d	5-Cl	>100
7e	6-Cl	30.41
7f	6-Br	29.69
10a	H	>100
10b	4-Cl	>100
10c	4-Br	>100
10d	5-Cl	>100
10e	6-Cl	>100
10f	6-Br	58.48
DDP	—	8.18

初步构效关系显示, 目标产物的靛红结构片段中, 4 位、5 位卤素取代(氯代、溴代)对化合物抗肿瘤活性没

有影响, 而 6 位卤素取代则有利于提高化合物的抗肿瘤活性, 如 6-氯衍生物 **7e**、6-溴衍生物 **7f** 和 **10f**.

1.3 化合物 **7f** 对 A549 细胞周期的影响

细胞周期与肿瘤的发生发展有着密切的联系, 细胞周期也是抗肿瘤药物重要的作用靶点. 为了探索化合物 **7f** 的抗肿瘤作用是否与细胞周期相关, 我们采用 PI 单染法检测化合物 **7f** 对 A549 细胞周期的影响. A549 细胞与 **7f** (25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 48 h 后经流式细胞术检测, 结果如图 4 所示, A549 细胞周期分布未发生显著变化, 表明 **7f** 并非通过影响肿瘤细胞周期而发挥抗肿瘤作用, 可能与其它分子机制有关.

1.4 化合物 **7f** 对 A549 细胞凋亡的影响

凋亡是一种重要的细胞死亡方式, 大多数抗肿瘤通过诱导细胞凋亡的方式发挥抗肿瘤作用. 为了研究化合物 **7f** 是否通过诱导肿瘤细胞凋亡的机制而产生抗肿瘤活性, 我们采用 Annexin-V FITC/PI 双染法对 **7f** 诱导 A549 细胞凋亡情况进行了检测. A549 细胞与 **7f** (25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 48 h 后经流式细胞术检测, 结果如图 5 所示, A549 细胞的凋亡率分别为 18.27% 和 37.42%, 而空白对照组的细胞凋亡率为 8.48%. 上述结果表明,

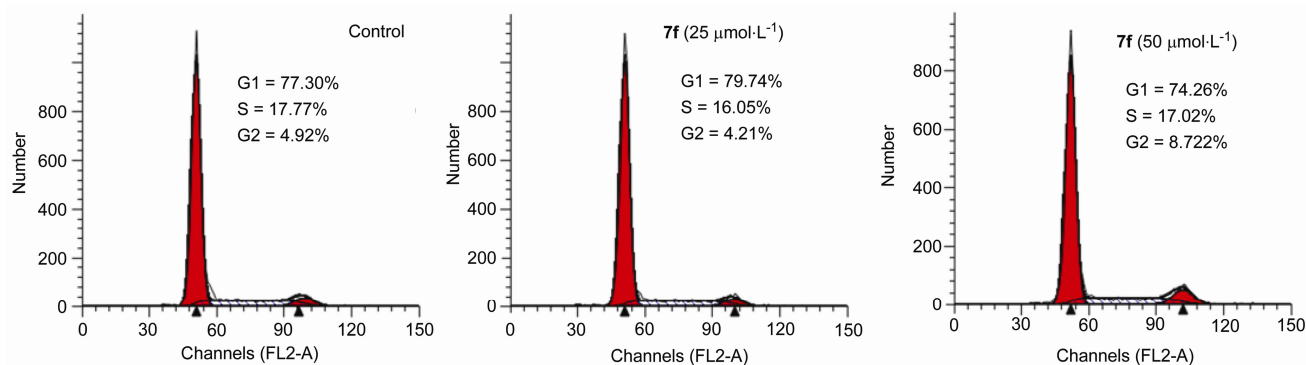


图 4 化合物 **7f** 对 A549 细胞周期的影响

Figure 4 Effects of compound **7f** on the cell cycle of A549 cells

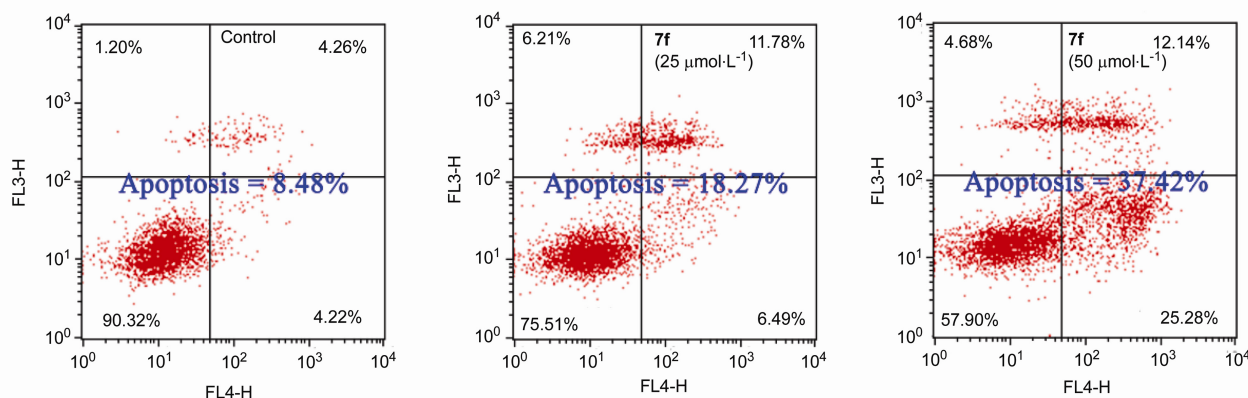


图 5 化合物 **7f** 对 A549 细胞凋亡的影响

Figure 5 Effects of compound **7f** on the apoptosis of A549 cells

化合物 **7f** 能够有效诱导 A549 细胞的凋亡, 并且, **7f** 的浓度越大, 诱导 A549 细胞的凋亡率越高。

此外, 我们还采用 Hoechst 33342 染色法进一步确证 **7f** 对 A549 细胞的凋亡诱导活性。如图 6 所示, A549 细胞与 **7f** (50 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 24 h 后, 细胞形态发生显著变化, 如皱缩、染色质固缩和裂解。此外, 凋亡细胞还出现亮蓝色荧光。而 **7f** 在 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的凋亡诱导效应不明显, 这与流式细胞术的检测结果一致, 在该浓度下, **7f** 诱导 A549 细胞的凋亡率较低。该结果进一步证明了化合物 **7f** 能够诱导 A549 细胞凋亡。

1.5 化合物 **7f** 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响

细胞凋亡过程中往往发生线粒体跨膜电位(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)的下降, 这也是细胞凋亡的标志性事件之一^[31]。因此, 我们进一步研究化合物 **7f** 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响。A549 细胞与 **7f** (25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵化 48 h 后, JC-1 作为荧光探针, 线粒体膜电位用流式细胞术进行检测。实验结果如图 7 所示, 随着 **7f** 浓度的增加, A549 细胞的线粒体跨膜电位显著降低, 表明化合物 **7f** 能够通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡。

2 结论

基于药效团拼合原理, 设计并合成了两个系列, 共 12 个结构新颖的含有靛红片段的吡唑衍生物。体外抗肿瘤活性结果显示, 部分目标产物对非小细胞肺癌 A549 细胞具有一定的抗增殖活性, 其中化合物 **7f** 的活性最强, IC_{50} 值为 29.69 $\mu\text{mol/L}$ 。初步的机制研究表明, **7f** 能够通过线粒体途径诱导 A549 细胞凋亡, 但其对细胞周期没有影响。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

熔点用 SGWX-4 显微熔点仪测定, 质谱仪为 Agilent Accurate-Mass-Q-TOF-MS 6520 型(HR-MS), 核磁共振仪为 Agilent-NMR-vnmrs 400 型(DMSO- d_6 或 CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标)。硅胶和薄层层析板购自青岛海洋化工厂, 所用试剂均为市售分析纯。

3.2 实验方法

中间体 **5** 的合成参考文献[12], 中间体 **8** 的合成参照文献[17]。

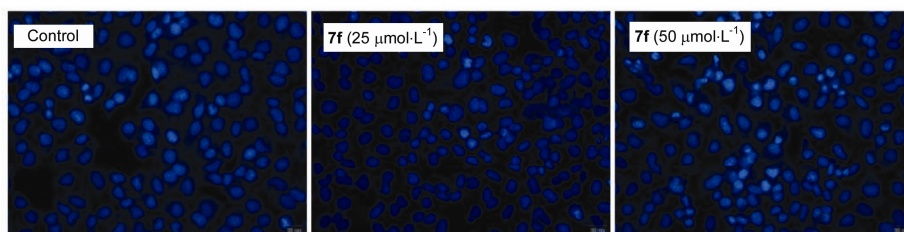


图 6 Hoechst 33342 染色
Figure 6 Hoechst 33342 staining

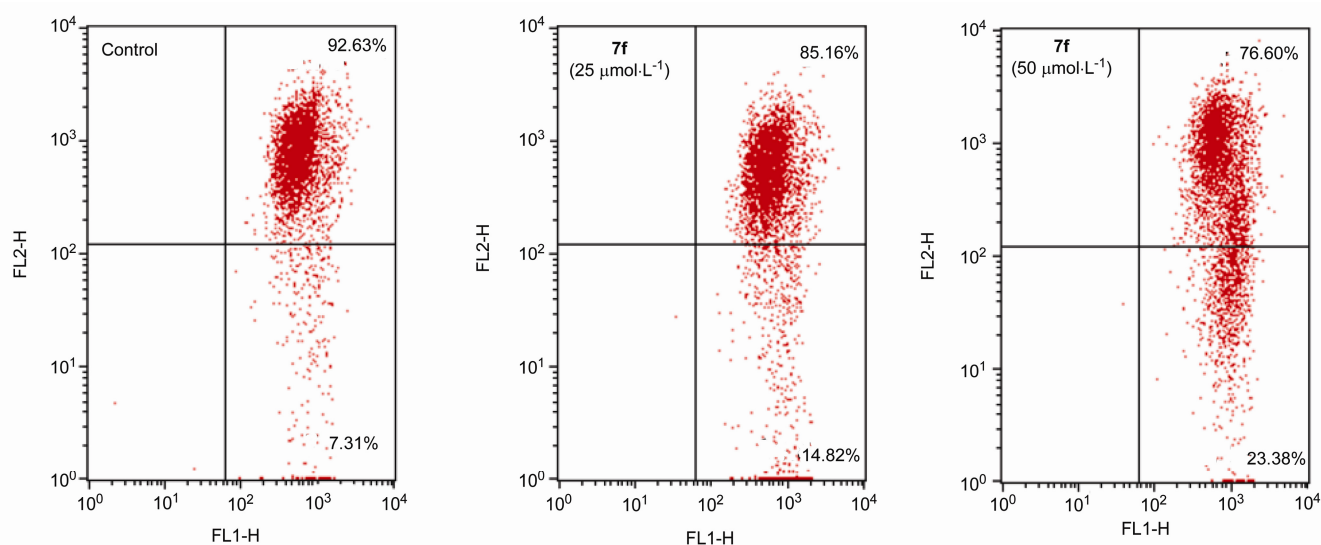


图 7 化合物 **7f** 对 A549 细胞线粒体膜电位的影响
Figure 7 Effects of compound **7f** on the mitochondrial membrane potential of A549 cells

3.2.1 *N'*-(3-亚氨基-(取代)吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7a**~**7f**)的合成

将 0.31 mmol 中间体 **5** 和 0.31 mmol 的(取代)靛红 **6a**~**6f** 加入到 25 mL 的圆底烧瓶中, 加入 5 mL 乙醇和 1 滴浓硫酸, N_2 保护下回流反应 4~5 h. 薄层色谱(TLC)监测反应完全后, 冷却, 抽滤, 滤饼用冰乙醇洗涤 3 次, 真空干燥, 得到目标产物 **7a**~**7f**.

N'-(3-亚氨基-吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7a**): 黄色固体, 产率 89%. m.p. 297~299 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.77 (s, 1H), 11.38 (s, 1H), 7.78 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.39~7.21 (m, 7H), 7.10 (t, $J=6.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.78 (s, 2H), 3.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.34, 159.83, 150.07, 143.08, 137.83, 132.53, 128.98, 128.00, 127.74, 127.15, 124.84, 123.28, 121.55, 120.02, 114.71, 111.76, 55.61, 54.67; HRMS calcd for $C_{26}H_{22}N_5O_3$ $[M+H]^+$ 452.1717, found 452.1720.

N'-(3-亚氨基-4-氯吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7b**): 黄色固体, 产率 93%. m.p. 281~283 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.96 (s, 1H), 11.59 (s, 1H), 7.75 (d, $J=6.8$ Hz, 2H), 7.38~7.24 (m, 6H), 7.14 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 5.79 (s, 2H), 3.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 162.82, 159.80, 144.35, 137.93, 133.22, 128.96, 127.94, 127.66, 126.98, 124.92, 124.27, 117.01, 114.74, 110.46, 55.62, 54.85; HRMS calcd for $C_{26}H_{21}ClN_5O_3$ $[M+H]^+$ 486.1327, found 486.1331.

N'-(3-亚氨基-4-溴吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7c**): 黄色固体, 产率 95%. m.p. 272~274 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.96 (s, 1H), 11.57 (s, 1H), 7.76 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.32~7.24 (m, 8H), 7.00 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.78 (s, 2H), 3.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 162.87, 159.80, 144.54, 137.94, 133.24, 128.96, 127.94, 127.65, 127.47, 127.02, 124.92, 118.68, 114.73, 110.88, 55.62, 54.81; HRMS calcd for $C_{26}H_{21}BrN_5O_3$ $[M+H]^+$ 530.0822, found 530.0824.

N'-(3-亚氨基-5-氯吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7d**): 黄色固体, 产率 92%. m.p. 310~312 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.70 (s, 1H), 11.49 (s, 1H), 7.79 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.45 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=7.6$ Hz, 4H), 6.99 (t, $J=9.2$ Hz, 3H), 5.78 (s,

2H), 3.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.16, 159.85, 150.10, 141.76, 137.79, 131.90, 128.98, 128.01, 127.74, 127.37, 127.17, 124.79, 121.77, 121.07, 114.71, 113.31, 55.63, 54.73; HRMS calcd for $C_{26}H_{21}ClN_5O_3$ $[M+H]^+$ 486.1327, found 486.1328.

N'-(3-亚氨基-6-氯吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7e**): 黄色固体, 产率 88%. m.p. 278~279 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.65 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 7.78 (s, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.31~7.00 (m, 10H), 5.78 (s, 2H), 3.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.34, 159.85, 150.10, 144.25, 137.80, 136.54, 128.98, 128.01, 127.73, 127.17, 124.80, 123.18, 122.96, 114.72, 111.82, 55.63, 54.71; HRMS calcd for $C_{26}H_{20}ClN_5NaO_3$ $[M+Na]^+$ 508.1147, found 508.1146.

N'-(3-亚氨基-6-溴吡啶-2-酮)-1-苯甲基-3-(4-甲氧基苯基)-1*H*-吡啶-5-甲酰肼(**7f**): 黄色固体, 产率 97%. m.p. 274~275 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.65 (s, 1H), 11.51 (s, 1H), 7.78 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.30~7.22 (m, 7H), 7.12 (s, 1H), 7.01 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 5.78 (s, 2H), 3.78 (s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 163.21, 159.85, 150.10, 144.29, 137.79, 128.98, 128.01, 127.72, 127.17, 126.05, 125.16, 123.13, 119.34, 114.72, 114.56, 55.63, 54.69; HRMS calcd for $C_{26}H_{21}BrN_5O_3$ $[M+H]^+$ 530.0822, found 530.0821.

3.2.2 *N*¹-(2-溴乙基)-(取代)吡啶-2-酮(**9a**~**9f**)的合成

将 0.68 mmol (取代)靛红 **6a**~**6f** 加入到 25 mL 的圆底烧瓶中, 再加入 4 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶解, 冰水浴冷却至 0 °C, 分批加入 1.36 mmol 氢化钠, 0 °C 下搅拌反应 15 min 后再加入 6.8 mmol 1,2-二溴乙烷, 室温反应 2~3 h. TLC 监测反应完全后, 加入 30 mL 饱和氯化铵溶液淬灭反应, 二氯甲烷萃取 3 次, 水洗 2 次, 饱和氯化钠溶液洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压除去有机溶剂, 得到粗品, 再经 200~300 目硅胶柱层析[洗脱剂: 二氯甲烷/甲醇($V:V=200:1$)]纯化得到中间体 **9a**~**9f**.

*N*¹-(2-溴乙基)-吡啶-2-酮(**9a**): 红色固体, 产率 76%. m.p. 128~129 °C(文献值^[32]: 122~125 °C); 1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.61 (t, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=6.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 182.64, 158.18, 150.42, 138.41, 125.68, 124.05, 117.59, 110.22, 41.93, 27.10.

*N*¹-(2-溴乙基)-4-氯吡啶-2-酮(**9b**): 黄色固体, 产率 62%. m.p. 167~169 °C(文献值^[32]: 145~149 °C); 1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.52 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.09

(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.61 (s, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 179.51, 157.29, 151.52, 138.51, 134.21, 125.60, 114.70, 108.54, 42.13, 27.08.

N^1 -(2-溴乙基)-4-溴吡啶-2-酮(**9c**): 黄色固体, 产率 70%. m.p. 177~179 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[32]: 190~193 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.43 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=6.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 157.23, 151.97, 138.31, 128.78, 122.07, 108.99, 42.03, 27.00.

N^1 -(2-溴乙基)-5-氯吡啶-2-酮(**9d**): 红色固体, 产率 65%. m.p. 111~113 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[32]: 116~118 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=6.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 181.66, 157.66, 148.79, 137.75, 129.89, 125.53, 118.39, 111.65, 42.17, 27.20.

N^1 -(2-溴乙基)-6-氯吡啶-2-酮(**9e**): 黄色固体, 产率 75%. m.p. 106~108 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[32]: 132~135 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.58 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 4.13 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J=6.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 181.12, 158.15, 151.46, 144.91, 126.70, 124.31, 115.89, 111.13, 42.19, 27.07.

N^1 -(2-溴乙基)-6-溴吡啶-2-酮(**9f**): 黄色固体, 产率 58%. m.p. 165~166 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[32]: 155~158 $^{\circ}\text{C}$); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.49 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.13 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.61 (t, $J=6.4$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 181.39, 158.02, 151.23, 133.70, 127.31, 126.60, 116.26, 113.96, 42.16, 27.07.

3.2.3 2-(1- N' -(取代)吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10a~10f**)的合成

将 0.27 mmol 中间体 **8**, 0.30 mmol N^1 -(2-溴乙基)-(取代)吡啶-2-酮 **9**, 0.41 mmol 碳酸钾和催化量的碘化钾加入到 10 mL 的圆底烧瓶中, 加入 4 mL DMF, 80 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 1~2 h. TLC 检测反应完全后, 将反应液倾入 80 mL 水中, 抽滤, 固体水洗 3 次, 真空干燥, 再经 200~300 目硅胶柱层析(洗脱剂: 二氯甲烷/石油醚, $V:V=4:1$)纯化得到目标产物 **10a~10f**.

2-(1- N' -吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10a**): 黄色固体, 产率 79%. m.p. 96~98 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (CDCl_3 , 400

MHz) δ : 7.79 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.61~7.59 (m, 2H), 7.36~7.23 (m, 6H), 7.12 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.97 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.92 (s, 2H), 4.25 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.54 (t, $J=7.2$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 182.74, 163.44, 159.82, 158.64, 158.30, 151.50, 150.35, 138.81, 136.55, 128.57, 127.81, 127.64, 127.38, 126.99, 125.61, 124.86, 124.09, 117.52, 114.15, 110.56, 105.61, 55.34, 55.09, 39.13, 29.00; HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{NaO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 560.1363, found 560.1368.

2-(1- N' -4-氯吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10b**): 橙黄色固体, 产率 68%. m.p. 200~202 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 7.81 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.61 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.32 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.25 (t, $J=8.8$ Hz, 4H), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.55 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 180.26, 164.12, 159.83, 158.23, 157.95, 152.07, 151.13, 139.10, 137.37, 131.54, 129.02, 128.08, 127.66, 127.13, 124.82, 124.66, 114.93, 114.64, 110.04, 105.98, 55.62, 54.71, 29.89; HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{ClN}_5\text{NaO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 594.0973, found 594.0972.

2-(1- N' -4-溴吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10c**): 黄色固体, 产率 80%. m.p. 193~195 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 7.81 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.52 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.32~7.23 (m, 7H), 7.00 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.55 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 180.81, 164.11, 159.83, 158.22, 157.91, 152.49, 151.12, 139.01, 137.37, 129.03, 128.07, 127.78, 127.65, 127.13, 124.82, 119.90, 116.55, 114.64, 110.45, 105.98, 55.62, 54.72, 29.86; HRMS calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{BrN}_5\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 616.0649, found 616.0647.

2-(1- N' -5-氯吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10d**): 橙黄色固体, 产率 66%. m.p. 219~220 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 7.82 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.34~7.23 (m, 6H), 6.99 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.56 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 182.31, 164.08, 159.83, 158.40, 158.22, 151.13, 149.25, 137.43, 137.37, 129.03, 128.07, 127.66, 127.13, 124.84, 124.37, 119.25, 114.64, 113.06, 105.99, 55.62, 54.70,

29.88; HRMS calcd for $C_{29}H_{22}ClN_5NaO_4S$ $[M+Na]^+$ 594.0973, found 594.0976.

2-(1-*N'*-6-氯吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10e**): 黄色固体, 产率 72%. m.p. 202~203 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.82 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.33 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.26 (t, $J=6.8$ Hz, 3H), 7.12 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.57 (s, 2H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 182.04, 164.11, 159.83, 158.73, 158.24, 151.85, 151.11, 142.97, 137.36, 129.01, 128.06, 127.70, 127.13, 126.30, 124.84, 123.58, 116.76, 114.64, 111.92, 105.99, 55.62, 55.36, 54.70, 29.85; HRMS calcd for $C_{29}H_{22}ClN_5NaO_4S$ $[M+Na]^+$ 594.0973, found 594.0972.

2-(1-*N'*-6-溴吡啶-2,3-二酮)-乙基-2-巯基)-5-(1-苯甲-3-(4-甲氧基苯基)吡啶-5-基)-1,3,4-噁二唑(**10f**): 黄色固体, 产率 78%. m.p. 223~224 °C; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 7.82 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.43 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.34~7.24 (m, 6H), 7.00 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.56 (s, 2H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 182.30, 164.13, 159.83, 158.65, 158.23, 151.64, 151.12, 137.36, 132.31, 129.02, 128.08, 127.69, 127.15, 126.57, 126.25, 124.83, 117.06, 114.64, 105.99, 55.62, 54.71, 29.87; HRMS calcd for $C_{29}H_{23}BrN_5O_4S$ $[M+H]^+$ 638.0468, found 638.0468.

3.2.4 体外抗肿瘤活性测试

以顺铂(DDP)为阳性药, 采用 CCK-8 法测试目标产物对 A549 细胞的体外抗增殖活性. 将 A549 细胞消化、计数, 接种于 96 孔板中, 在 37 °C, 5% CO_2 培养箱中孵化 24 h. 每孔加入 100 μ L 相应的含药(100 μ mol/L)培养基, 同时设立阴性对照组、阳性对照组、溶媒组, 再将 96 孔板置于培养箱中孵化 72 h. 药物作用后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵化 3 h. 酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值(OD), 并计算抑制率. 100 μ mol/L 浓度下, 抑制率大于 50% 的化合物, 重新设置浓度进行孵化 72 h. 实验结果通过 SPSS17.0 软件计算得出 IC_{50} 值.

3.2.5 PI 单染法检测细胞周期

将对数生长期的 A549 细胞消化接种到 6 孔板中, 孵化 24 h. 根据组别设置加入 **7f** 培养基, 同时设立阴性对照组. 药物作用 48 h 后, 收集、离心, 并用 70% 冰乙醇固定细胞. 加 100 μ L RNase A 孵化 30 min, 再加入 400 μ L PI 染色. 流式细胞仪记录 488 nm 处荧光.

3.2.6 Annexin-V APC/7-AAD 双染法检测细胞凋亡

将对数生长期的 A549 细胞消化接种到 6 孔板中,

孵化 24 h. 根据组别设置加入 **7f** 培养基, 同时设立阴性对照组. 加入 500 μ L 缓冲液(Binding Buffer)后, 再依次加入 5 μ L 别藻蓝蛋白标记的膜联蛋白 V (Annexin V-APC)和 5 μ L 7-氨基放线菌素(7-AAD), 混匀放置 15 min. 流式细胞仪记录细胞凋亡情况.

3.2.7 Hoechst 33342 染色

A549 细胞与 **7f** 孵化 24 h 后, 浸入 4% 的多聚甲醛固定液中 30 min, 加入 Hoechst 33342 染色液, 充分覆盖住待染色的细胞. 室温放置 10 min 后, 抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜下观察.

3.2.8 JC-1 染色法检测线粒体膜电位

将对数生长期的 A549 细胞消化接种到 6 孔板中, 孵化 24 h. 根据组别设置加入 **7f** 培养基, 同时设立阴性对照组. 药物作用 48 h 后, 收集细胞, 加入 500 μ L JC-1 工作液, 在 37 °C, 5% CO_2 的培养箱中孵化 15 min. 室温离心收集细胞, 流式细胞仪检测.

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

References

- [1] Brody, H. *Nature* **2014**, *513*, S1.
- [2] Chen, W.; Zheng, R.; Baade, P. D.; Zhang, S.; Zeng, H.; Bray, F.; Jemal, A.; Yu, X. Q.; He, J. *CA Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 115.
- [3] Chougule, M.; Patel, A. R.; Sachdeva, P.; Jackson, T.; Singh, M. *Lung Cancer* **2011**, *71*, 271.
- [4] Zhang, L.; Lin, Y.; Wang, J.; Zhu, X.; Yao, Q.; Yao, Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, *35*, 497 (in Chinese). (张磊, 林娅, 王京, 朱心玲, 姚秋雨, 姚其正, 有机化学, **2015**, *35*, 497.)
- [5] Yu, L. G.; Ni, T. F.; Gao, W.; He, Y.; Wnag, Y. Y.; Cui, H. W.; Yang, C. G.; Qiu, W. W. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 10.
- [6] Chavan, H. V.; Bandgar, B. P.; Adsul, L. K.; Dhakane, V. D.; Bhale, P. S.; Thakare, V. N.; Masand, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1315.
- [7] Yan, T.; Yu, S. J.; Liu, P. F.; Liu, Z.; Wang, B. L.; Xiong, L. X.; Li, Z. M. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 919.
- [8] Wen, Y.; Zhang, S.; Hou, G.; Yu, Y.; Gao, J. *Chin. J. Org. Chem.* **2016**, *36*, 642 (in Chinese). (温彦鹏, 张爽, 侯广峰, 于颖慧, 高金胜, 有机化学, **2016**, *36*, 642.)
- [9] Penning, T. D.; Talley, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Carter, J. S.; Collins, P. W.; Docter, S.; Graneto, M. J.; Lee, L. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Rogers, R. S.; Rogier, D. J.; Yu, S. S.; Anderson, G. D.; Burton, E. G.; Cogburn, J. N.; Gregory, S. A.; Koboldt, C. M.; Perkins, W. E.; Seibert, K.; Veenhuizen, A. W.; Zhang, Y. Y.; Isakson, P. C. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1347.
- [10] Hou, Q. Q.; Li, Z. N.; Liu, C. L. *Pesticides* **2002**, *41*, 41 (in Chinese). (侯春青, 李志念, 刘长令, 农药, **2002**, *41*, 41.)
- [11] Hu-Lowe, D. D.; Zou, H. Y.; Grazzini, M. L.; Hallin, M. E.; Wickman, G. R.; Amundson, K.; Chen, J. H.; Rewolinski, D. A.; Yamazaki, S.; Wu, E. Y.; McTigue, M. A.; Murray, B. W.; Kania, R. S.; O'Connor, P.; Shalinsky, D. R.; Bender, S. L. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7272.
- [12] Xia, Y.; Dong, Z. W.; Zhao, B. X.; Ge, X.; Meng, N.; Shin, D. S.;

- Miao, J. Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6893.
- [13] Zheng, L. W.; Wu, L. L.; Zhao, B. X.; Dong, W. L.; Miao, J. Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1957.
- [14] Song, L.; Su, H.; Zhao, B. X.; Liu, W. Y.; Zheng, L. W.; Miao, J. Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7085.
- [15] Zhang, J. F.; Li, M.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 516.
- [16] Vujasinović, I.; Paravić-Radičević, A.; Mlinarić-Majerski, K.; Brajša, K.; Bertoša, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2101.
- [17] Wang, J.; Zhang, L.; Yao, Q. Z. *Chin. J. Synth. Chem.* **2014**, *22*, 730 (in Chinese).
(王京, 张磊, 姚其正, 合成化学, **2014**, *22*, 730.)
- [18] Zhang, L.; Wang, J.; Zhu, X. L.; Liu, Y.; Yao, Q. Z. *Chem. Reag.* **2015**, *37*, 25 (in Chinese).
(张磊, 王京, 朱心玲, 林娅, 姚其正, 化学试剂, **2015**, *37*, 25.)
- [19] Zhang, L.; Wang, J.; Lin, Y.; Zhu, X. L.; Yao, Q. Z. *Chin. J. Synth. Chem.* **2015**, *23*, 499 (in Chinese).
(张磊, 王京, 林娅, 朱心玲, 姚其正, 合成化学, **2015**, *23*, 499.)
- [20] Welsch, M. E.; Snyder, S. A.; Stockwell, B. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 347.
- [21] Vine, K. L.; Matesic, L.; Locke, J. M.; Ranson, M.; Skropeta, D. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 397.
- [22] Zhang, Y.; Lv, M.; Zhang, Y.; Chen, L.; Wang, W.; Li, B. *Chin. J. Org. Chem.* **2017**, *37*, 1789 (in Chinese).
(张颖, 吕梦娇, 张娅玲, 陈丽, 王伟, 李宝林, 有机化学, **2017**, *37*, 1789.)
- [23] Hsuan, S. L.; Chang, S. C.; Wang, S. Y.; Liao, T. L.; Jong, T. T.; Chien, M. S.; Lee, W. C.; Chen, S. S.; Liao, J. W. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 61.
- [24] Sun, L.; Liang, C.; Shirazian, S.; Zhou, Y.; Miller, T.; Cui, J.; Fukuda, J. Y.; Chu, J. Y.; Nematalla, A.; Wang, X.; Chen, H.; Sistla, A.; Luu, T. C.; Tang, F.; Wei, J.; Tang, C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1116.
- [25] Zhang, L.; Chne, F.; Wang, J.; Chen, Y.; Zhang, Z.; Lin, Y.; Zhu, X. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 97816.
- [26] Nagarsenkar, A.; Guntuku, L.; Guggilapu, S. D.; Bai K, D.; Gan-noju, S.; Naidu, V. G. M.; Bathini, N. B. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 782.
- [27] Eldehna, W. M.; Altoukhy, A.; Mahrous, H.; Abdel-Azizc, H. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 684.
- [28] Evdokimova, N. M.; Magedov, I. V.; McBrayer, D.; Kornienko, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1558.
- [29] Meunier, B. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *41*, 69.
- [30] Shaveta, S. M.; Singh, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 500.
- [31] Ly, J. D.; Grubb, D. R.; Lawen, A. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115.
- [32] Cao, S.; Xu, X.; Liao, J.; Ma, L.; Ding, P.; Lin, H.; Gao, M. *CN 104311470*, **2015** [*Chem. Abstr.* **2015**, *162*, 272777].

(Zhao, C.)