

含有 3,4-二氯苯基的酰胺类化合物的合成及抗肿瘤活性研究

王博珍^{†,a,b} 张 婕^{†,b} 粘春惠^b 金茗茗^b
孔苗苗^c 李物兰^c 何文斐^{*,b} 吴建章^{*,a,b}^(a) 温州医科大学附属眼视光医院 浙江温州 325027)^(b) 温州医科大学药学院 浙江温州 325035)^(c) 温州医科大学附属第一医院 浙江温州 325035)

摘要 为了寻找高效抗肿瘤活性化合物,根据药物化学拼合原理,在姜黄素骨架中引入酰胺键和3,4-二氯取代,设计并合成了19个新型含有3,4-二氯苯基的酰胺类化合物.用噻唑蓝比色法(MTT)检测化合物对AGS和BGC-823胃癌细胞的体外抗肿瘤活性.结果表明,部分化合物表现出良好的抑制胃癌细胞生长的活性,其中(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-(2-(3-(4-(三氟甲基)苯基)丙酰基)乙氨基)丙-2-烯-1-酮(**17**)对AGS细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)值为(1.94±0.94) μmol/L.此外,细胞集落形成、划痕、流式细胞术以及蛋白质印迹(Western blot)实验结果表明,化合物**17**能明显抑制AGS细胞的生长和迁移,阻滞细胞周期于G0/G1期,并诱导促凋亡相关蛋白多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶降解产物(Cleaved-PARP)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)呈剂量依赖性上调,诱导抗凋亡蛋白Bcl-2下调,从而诱导细胞凋亡.初步的机制研究显示,化合物**17**可能通过抑制双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶1A(DYRK1A)-蛋白激酶B(PKB, AKT)信号通路起到体外抗胃癌作用.综上所述,研究结果表明含有3,4-二氯苯基的酰胺类化合物可能是一类有药用研究前景的小分子化合物,化合物**17**有望成为一种抗肿瘤候选化合物.

关键词 姜黄素类似物; 3,4-二氯苯基; 酰胺键; 合成; 抗肿瘤活性

Synthesis and Antitumor Activity of 3,4-Dichlorophenyl Amides

Wang, Bozhen^{†,a,b} Zhang, Jie^{†,b} Nian, Chunhui^b Jin, Mingming^b
Kong, Miaomiao^c Li, Wulan^c He, Wenfei^{*,b} Wu, Jianzhang^{*,a,b}^(a) The Eye Hospital, School of Ophthalmology & Optometry, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325027)^(b) School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035)^(c) The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract In order to find efficient antitumor compounds, 19 novel 3,4-dichlorophenyl amides were designed and synthesized by introducing amide bonds and 3,4-dichloro substitution into the curcumin skeleton according to the principles of medicinal chemistry combination. The *in vitro* antitumor activity of the compounds against AGS and BGC-823 gastric cancer cells were detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The results showed that some compounds displayed potential inhibitory activity. Notably, (2*E*)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-(3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)propionyl)ethylazo)propan-2-en-1-one (**17**) showed potent growth inhibition on AGS with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of (1.94±0.94) μmol/L. Besides, the results of cell colony formation, wound healing, flow cytometry and western blot showed that compound **17** significantly inhibited the growth and migration of AGS cells, arrested the cell cycle in G0/G1 phase, and induced a dose-dependent up-regulation of the pro-apoptotic proteins such as cleaved poly ADP-ribose polymerase (Cleaved-PARP) and Bcl2-associated X protein (Bax), and a down-regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2, thus inducing cell apoptosis. Preliminary mechanistic studies suggested that compound **17** may exert its anti-gastric cancer effects *in vitro* by inhibiting dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A)-protein kinase B (PKB, AKT) signaling pathway. In conclusion, this study indicates that amide compounds containing 3,4-dichlorophenyl may be a class of small molecule compounds with promising prospects for medicinal research, and compound **17** is expected to be an antitumor candi-

* Corresponding authors. E-mail: wjzwzmu@163.com; wenfeihe@126.com

Received May 18, 2023; revised August 16, 2023; published online September 15, 2023.

Project supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Nos. LGF20B020001, LGF21H160034) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81903074).

浙江省自然科学基金(Nos. LGF20B020001, LGF21H160034)和国家自然科学基金(No. 81903074)资助项目.

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

date.

Keywords curcumin analog; 3,4-dichlorophenyl; amide bond; synthesis; antitumor activity

癌症是全球第二大死亡原因, 每年可导致数百万人死亡^[1]. 目前, 癌症治疗的主要方法是手术、放疗和化疗. 化疗在癌症治疗中发挥着重要作用, 但多药耐药和严重的不良反应已成为肿瘤化疗失败的主要原因^[2]. 因此, 迫切需要开发新型抗癌药物.

卤素已被发现存在于许多有机化合物和生物系统中, 在药物化学中使用广泛^[3]. 据报道, 氯原子在药物发现中比溴原子和碘原子具有更高的作用和价值, 许多药物和有前途的先导化合物结构中都包括氯原子^[4]. 其中, 临床批准的233种药物中有163种含有氯原子^[5]. 因此, 在化合物分子中的一个或多个特定位点引入氯原子可能对生物活性产生较大影响^[5], 氯原子能与相关的路易斯碱之间形成卤素键, 从而促进化合物生物活性的改变^[4-5]. 研究发现, 含有3,4-二氯苯基结构的化合物可表现出多种生物活性, 例如抗炎^[6-7]、抗菌^[8]和降低血糖^[9]等. 此外, 文献报道的多种具有抗肿瘤活性的小分子化合物都含有3,4-二氯苯基结构, 并且其活性大多达到了nmol/L级别(图1, **1a**)^[10-13]. 其中, Budke等^[10]研究发现,

当化合物**1a**的3,4-二氯苯基位置变为非卤素取代时, 抗肿瘤活性明显下降, 同时, Baker等^[11]对化合物**1b**、**1c**苯环上的氯原子取代位置进行了筛选, 从而发现化合物氯原子位于3,4位双取代时抗肿瘤活性最强, 而在化合物**1d**中的4-氯苯基哌嗪-1-基的3位引入第二个氯原子, 也使其抗肿瘤活性得到了显著提高^[12]. 综上所述, 3,4-二氯苯基结构的存在能够有效提高小分子化合物的抗肿瘤活性.

姜黄素是一种药食同源的天然产物, 对多种肿瘤细胞有抑制活性. 姜黄素骨架中的 β -二酮结构在溶液中易发生互变异构, 结构不稳定的缺陷导致了其在体内的生物利用度较低, 限制了其在临床上的应用. 酰胺键普遍存在于肽、蛋白质、药物分子和聚合物中, 是药物中作为氢键供体或受体的重要官能团^[14-15]. 酰胺键与肽键结构相似, 在一定条件下可以降解, 引入酰胺可能增强分子的生物相容性^[16]. 化合物**1f**在结构上与姜黄素骨架具有一定的相似性, 且也具有一定的抗肿瘤活性^[17], 因此根据药物拼合原理在姜黄素骨架中引入酰胺基团

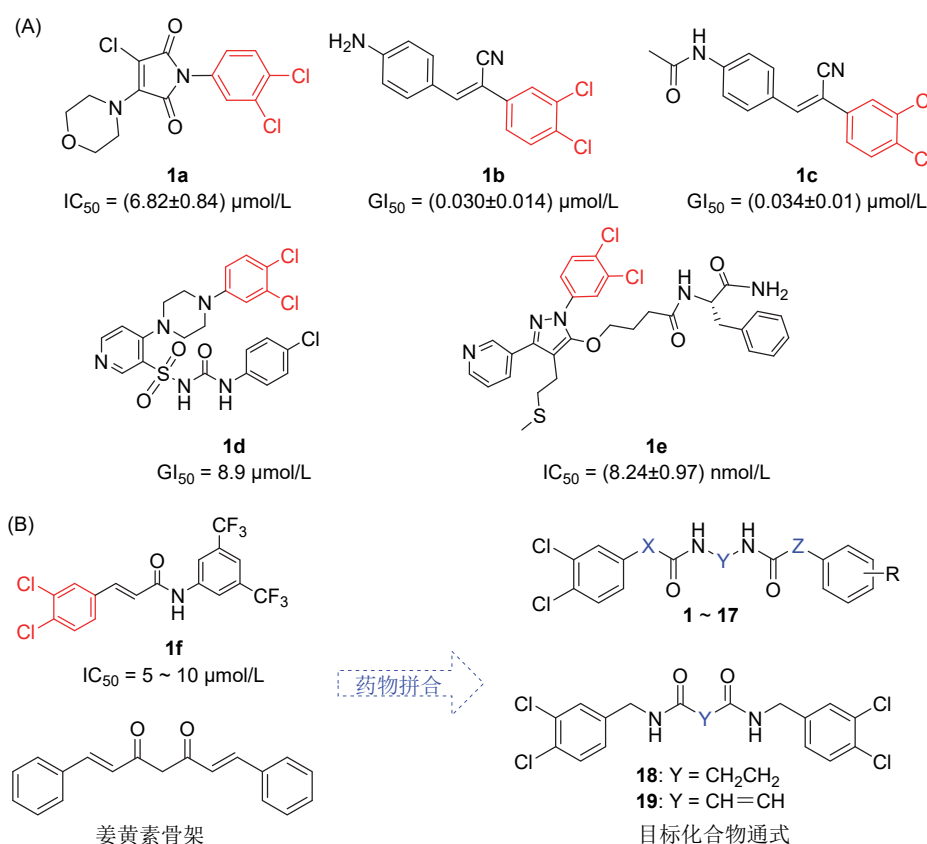


图1 (A)含有3,4-二氯苯基片段的抗肿瘤化合物和(B)含3,4-二氯的酰胺类化合物的设计

Figure 1 (A) Compounds containing 3,4-dichlorobenzene base fragment with antitumor activity and (B) design of amide compounds containing 3,4-dichloride

和 3,4-二氯苯基, 变换两个苯环之间的连接链及一侧苯环上的取代基, 设计合成了一系列含有 3,4-二氯苯基的对称及不对称化合物, 以期寻找活性较好的新型抗肿瘤化合物。

1 结果与讨论

1.1 目标化合物的合成

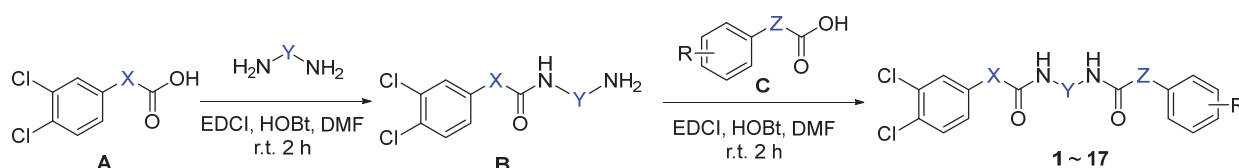
化合物 **1**~**17** 的合成如 Scheme 1 所示, 以含有 3,4-二氯苯基的芳香酸 **A** 为原料, 通过缩合剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基二亚胺盐酸盐(EDCI)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)与相应的胺类化合物进行酸胺缩合反应, 得到中间体胺类化合物 **B**。催化剂 EDCI 是一种在酰胺键形成过程中活化羧酸的反应试剂, 而 HOBt 则是一类以催化量加入, 有助于减少副反应发生, 并提高反应速率的辅助催化剂^[18]。通过这两种缩合剂, 可以快速地合成所需的目标产物。化合物 **B** 进一步与含有不同取代基的芳香酸 **C** 进行酸胺缩合反应, 最终得到含 3,4-二氯的酰胺类化合物 **1**~**17**。化合物 **18** 和 **19** 的合成如 Scheme 2 所示, 二酸类化合物 **D** 与草酰氯反应得到中间体二酰氯 **E**, 中间体 **E** 继续与 3,4-二氯苄胺发生亲核取代反应得到化合物 **18** 和 **19**。所有化合物均通过二甲基亚砜(DMSO)和无水乙醇双溶剂重结晶进行了纯化, 其中部分化合物产率较高, 而另一部分化合物产率较低, 造成这种情况的原因主要是化合物在结晶过程中发生了损失, 导致最终产率低于 10%, 后续将进一步探索提高化合物产率的纯化方法。所有化合物都经过 ¹H NMR、¹³C NMR 和 HRMS 进行了结构表征。

1.2 化合物体外生长抑制活性的评价及构效关系讨论

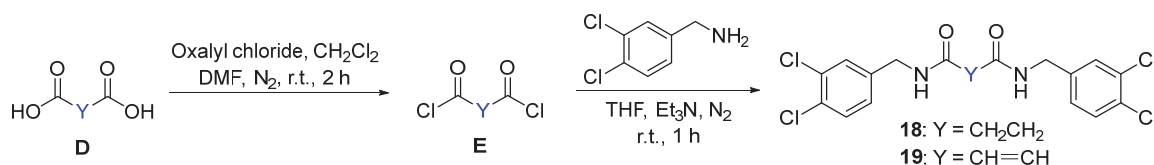
采用噻唑蓝(MTT)法评估了 19 个含 3,4-二氯苯基的酰胺类化合物对两种胃癌细胞 AGS 和 BGC-823 的体外

抗肿瘤活性(表 1)。由表 1 可知, 化合物对 AGS 细胞的生长抑制活性普遍优于 BGC-823, 有 17 个化合物都对 AGS 细胞表现出了一定的生长抑制活性, 其中化合物 **17** 对 AGS 的生长抑制率最强。进一步测定了化合物 **17** 对 AGS 细胞生长抑制活性的半数抑制浓度[IC₅₀ = (1.94 ± 0.94) μmol/L], 其活性明显优于化合物 **1f** [IC₅₀ = (6.17 ± 0.23) μmol/L]、阳性对照药姜黄素 [IC₅₀ = (7.34 ± 0.82) μmol/L] 和 5-氟尿嘧啶 [IC₅₀ = (10.00 ± 0.89) μmol/L], 因此选择化合物 **17** 进行了下一步研究。

由表 1 数据可以得出化合物结构与活性的关系, 分子骨架为双肉桂酰胺的化合物 **1**~**12** 普遍对 AGS 细胞有较好的抑制活性, 改变苯环上的取代基或将苯环替换为其他芳杂环对活性影响不大。两端苯环固定 3,4-二氯取代, 改变两个苯环之间的连接链(化合物 **13**~**16**、**18**、**19**)对化合物的活性影响较大。化合物 **13** 几乎没有肿瘤抑制活性, 化合物 **16** 对 AGS 细胞的增殖抑制率达到 76%。化合物 **14** 和 **13** 相比结构多了两个双键, 其抗肿瘤活性有了显著提升, 推测可能是由于双键与羰基相连形成迈克尔受体, 从而提升了化合物活性。同样, 化合物 **19** 中的双键可能与两端的羰基形成氢键, 使得其活性较化合物 **18** 好。化合物 **16** 与化合物 **17** 结构中仅有取代基不同, 化合物 **17** 中的三氟甲基取代使得化合物的抗肿瘤活性增加。三氟甲基是药物化学中重要的官能团^[19], 研究表明, 三氟甲基具有高电负性, 可以直接改变小分子的电子分布, 从而影响化合物与周围蛋白残基的相互作用^[20]。因此将三氟甲基引入到分子的适当位置, 有改善其成药性、提高与靶蛋白的结合亲和力的效果^[21]。化合物 **17** 在本系列化合物中显示出较好的抗肿瘤活性, 可能是由于苯环对位的三氟甲基改善了其理化性质, 从而使得化合物抗肿瘤活性增加。



图式 1 化合物 **1**~**17** 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route of compounds **1**~**17**



图式 2 化合物 **18** 和 **19** 的合成路线
Scheme 2 Synthetic route of compounds **18** and **19**

表 1 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时化合物 1~19 对 AGS 和 BGC-823 胃癌细胞的体外生长抑制率(%)^aTable 1 *In vitro* growth inhibitory activity (%) of compounds 1~19 on gastric cancer cells AGS and BGC-823 at concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$

Compd.	X	Z	Y	R	Growth inhibition/%	
					AGS	BGC-823
1	CH=CH	CH=CH	—	2-OCH ₃	49.43 $\pm$ 2.43	NA
2	CH=CH	CH=CH	—	2-Br	42.28 $\pm$ 0.12	NA
3	CH=CH	CH=CH	—	2-Cl	32.52 $\pm$ 1.39	NA
4	CH=CH	CH=CH	—	2-CF ₃	46.59 $\pm$ 2.28	17.83 $\pm$ 0.40
5	CH=CH	CH=CH	—	2-NO ₂	33.56 $\pm$ 0.19	NA
6	CH=CH	CH=CH	—	2,3-(OCH ₃) ₂	38.96 $\pm$ 1.58	8.98 $\pm$ 0.52
7	CH=CH	CH=CH	—	2,4-(OCH ₃) ₂	29.87 $\pm$ 1.86	6.90 $\pm$ 0.77
8	CH=CH	CH=CH	—	2,4-Me ₂	34.41 $\pm$ 0.69	NA
9	CH=CH	CH=CH	—	3,4-Me ₂	44.41 $\pm$ 2.56	NA
10	CH=CH	CH=CH	—	4-N(Me) ₂	48.77 $\pm$ 2.12	NA
11	CH=CH	CH=CH	—		48.78 $\pm$ 2.36	NA
12	CH=CH	CH=CH	—		43.46 $\pm$ 1.23	NA
13	CH ₂	CH ₂		3,4-Cl ₂	NA	6.14 $\pm$ 1.77
14	CH=CH	CH=CH		3,4-Cl ₂	41.10 $\pm$ 1.09	2.78 $\pm$ 1.76
15	—	—	(CH ₂) ₄	3,4-Cl ₂	44.65 $\pm$ 1.63	26.32 $\pm$ 1.89
16	CH=CH	(CH ₂) ₂	—	3,4-Cl ₂	76.75 $\pm$ 2.10	3.87 $\pm$ 1.94
17	CH=CH	(CH ₂) ₂	—	4-CF ₃	83.95 $\pm$ 0.35	45.66 $\pm$ 0.81
18					4.95 $\pm$ 0.64	6.67 $\pm$ 2.51
19					37.45 $\pm$ 1.48	20.05 $\pm$ 1.91
1f					64.77 $\pm$ 0.01	36.16 $\pm$ 0.04
Curcumin ^b					70.43 $\pm$ 8.89	38.52 $\pm$ 6.64

^a MTT methods: cells were incubated with indicated compounds for 72 h. ^b Used as a positive control.

1.3 化合物 17 抑制细胞的集落形成与迁移

为了进一步评价化合物 17 的体外抗胃癌活性, 检测了化合物 17 对 AGS 细胞生长和细胞迁移的影响. 使用不同浓度的化合物 17 及姜黄素孵育 AGS 细胞, 结果如图 2 所示. 与溶剂组相比, 化合物 17 可以剂量依赖性

地抑制肿瘤细胞的生长与迁移, 并且其抑制活性明显优于阳性对照药姜黄素.

1.4 化合物 17 诱导细胞周期阻滞

通过流式细胞仪检测化合物 17 对 AGS 细胞周期的影响, 结果显示化合物 17 在 2 和 4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下使细

胞 G0/G1 期的比例分别提高了约 12% 和 19%, 而姜黄素在 4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对细胞周期没有明显的影响(图 3). 因此, 化合物 17 可以通过诱导细胞周期阻滞于 G0/G1 期起到抑制细胞生长的作用.

1.5 化合物 17 诱导肿瘤细胞凋亡

为了研究化合物 17 是否通过诱导肿瘤细胞凋亡而产生抗肿瘤活性, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法对 17 诱导的 AGS 细胞凋亡情况进行了检测. AGS 细胞与化合物 17 (1, 2 和 4 $\mu\text{mol/L}$) 共同孵育 26 h 后经流式细胞仪检测, 结果如图 4 所示, AGS 细胞的凋亡率分别为 12.71%、27.47% 和 31.90%, 而空白组和对照姜黄素组的细胞凋亡率分别为 4.3% 和 7.86%. 因此, 化合物 17 可呈剂量依赖性地诱导 AGS 细胞凋亡, 且促凋亡能力明显

优于姜黄素. 同时, Western blot 结果显示, 用不同浓度的化合物 17 处理后, AGS 细胞中凋亡相关蛋白多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶降解产物(Cleaved-PARP)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达上调, 而抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)表达显著下调.

1.6 化合物 17 抑制 DYRK1A 的磷酸化

双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1A (DYRK1A)在多种癌症中高度表达, 是治疗癌症的潜在靶点^[22]. DYRK1A 抑制剂去氢骆驼蓬碱(harmine)被报道能通过调节 AKT(蛋白激酶 B)途径抑制 p-AKT 的表达, 并增强了瑞格非尼(regorafenib)的抗癌活性^[23]. 我们采用 Western blot 实验检测了化合物 17 对 AGS 细胞中 DYRK1A 及其下游靶蛋白 AKT 表达的影响(图 5). 结果

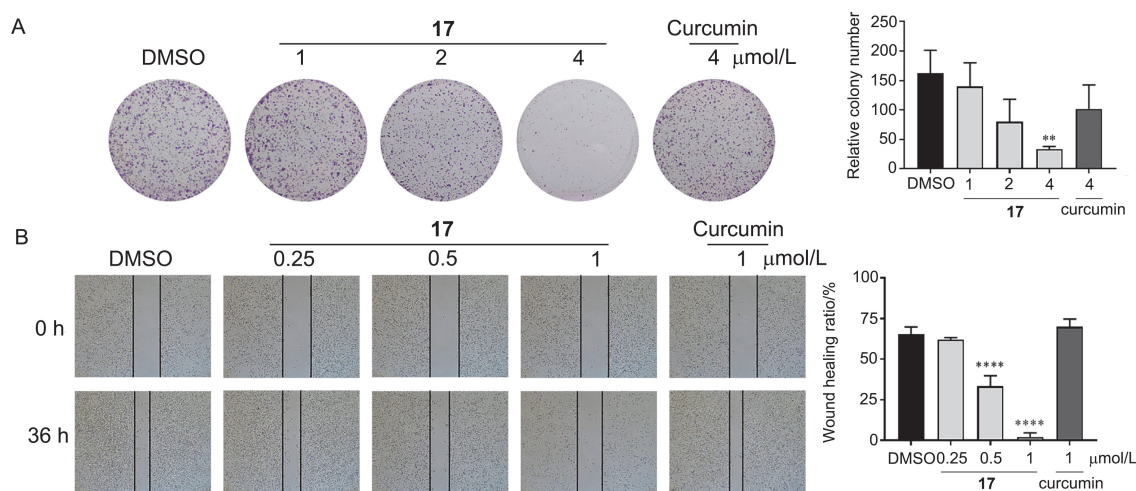


图 2 化合物 17 对 AGS 生长及迁移的影响

Figure 2 Effects of compound 17 on the growth and migration of AGS cells

(A) Representative images of AGS cell colonies treated with various concentrations of compound 17; (B) effect of compound 17 on migration of AGS gastric cancer cells. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs DMSO.

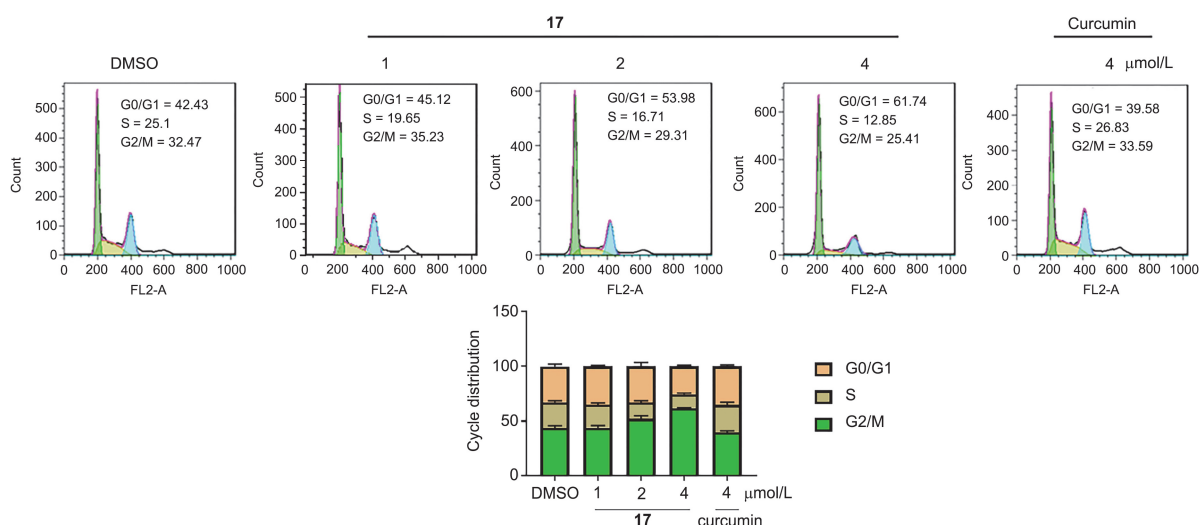


图 3 化合物 17 对 AGS 细胞周期的影响

Figure 3 Effects of compound 17 on the cell cycle of AGS cells

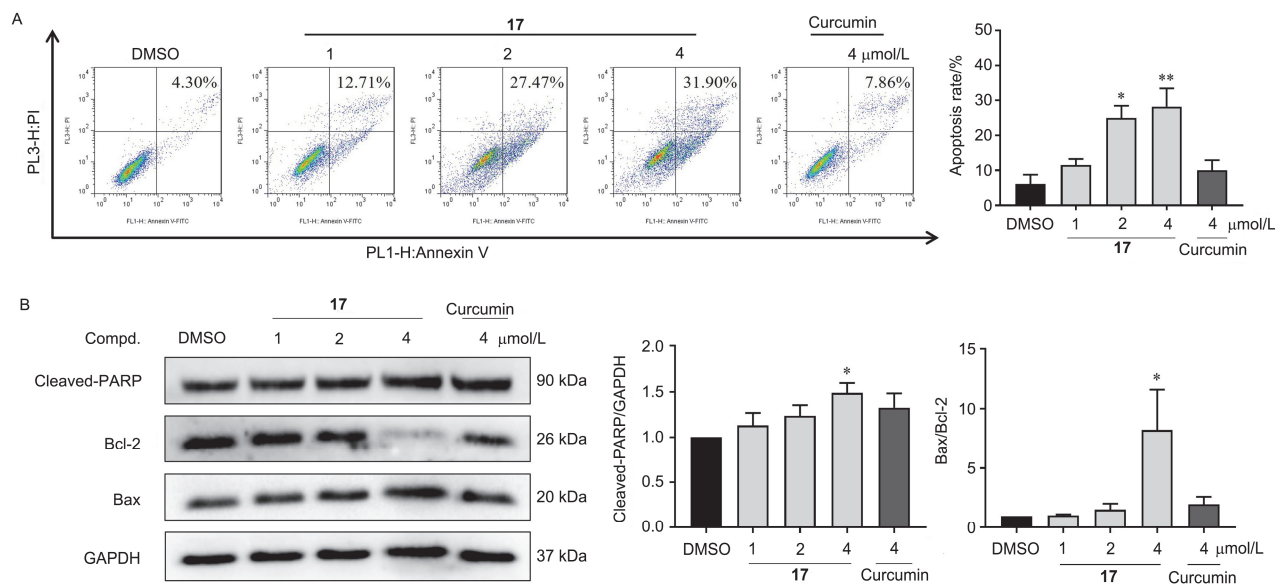


图4 化合物 17 对 AGS 胃癌细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of compound 17 on apoptosis of AGS gastric cancer cells

(A) Apoptosis rate was detected by flow cytometry; (B) the expressions of apoptosis-related proteins cleaved-PARP, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs DMSO.

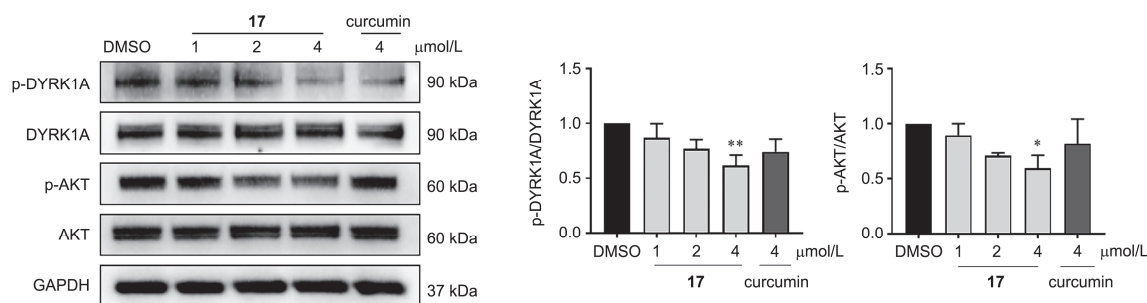


图5 化合物 17 对胃癌细胞 DYRK1A-AKT 信号通路的影响

Figure 5 Effects of compound 17 on DYRK1A-AKT signaling pathway in gastric cancer cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs DMSO.

显示, 用不同浓度的化合物 17 处理后, AGS 细胞中 p-DYRK1A 与 p-AKT 的表达减少, 并呈剂量依赖性, 与阴性对照组及姜黄素组相比具有统计学差异。

2 结论

基于药物拼合原理, 在姜黄素骨架的基础上引入了酰胺基团和 3,4-二氯取代, 设计并合成了 19 个含有 3,4-二氯苯基的新型酰胺类化合物, 并通过核磁和高分辨质谱对所合成的化合物结构进行了表征。用 MTT 法测试了这些化合物的体外抗肿瘤活性。活性评价表明, 大部分化合物都对胃癌细胞表现出了良好的抑制作用, 其中化合物 17 对 AGS 细胞系的 IC_{50} 值为 $(1.94 \pm 0.94) \mu\text{mol/L}$, 优于阳性对照药姜黄素和五氟尿嘧啶。进一步实验表明, 化合物 17 能够通过抑制 AGS 细胞的生长和迁移, 导致细胞周期 G0/G1 期阻滞。化合物 17 还可以下

调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 上调凋亡蛋白 Cleaved-PARP 及 Bax 的表达, 从而诱导肿瘤细胞凋亡。综上所述, 含有 3,4-二氯苯基的酰胺类化合物可能是一类具有药用研究前景的小分子化合物。化合物 17 有望成为一种抗肿瘤候选化合物, 但其抗肿瘤药效、机制还有待进一步深入研究。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪为中科牛津 Quantum-I Plus 400MHz 型; 高分辨质谱仪为 AB(美国)SCIEX TripleTOF 6600 System 型; 青岛海洋 GF254 硅胶板, 于紫外灯下观察; 柱层析硅胶 200~300 目。本工作中所有的试剂全部购自于商业试剂公司, 均为分析纯, 除特别说明外, 未经处理直接使用。

3.2 实验方法

3.2.1 化合物 A 及其他取代肉桂酸的合成

当 A 的结构中 X 为 CH=CH 时, A 是 3,4-二氯肉桂酸, 其合成由原料 3,4-二氯苯甲醛通过经典的 Knoevenagel 缩合反应得到. 具体合成条件为: 在干燥的茄形瓶中加入 3,4-二氯苯甲醛(5 mmol)、丙二酸(12.5 mmol)、哌嗪(1.5 mmol)和吡啶(4 mL), 反应体系在油浴中 90 °C 反应 3 h. 反应完成后, 将体系冷却至室温, 加入 50 mL 左右的纯化水, 用质量分数为 10% 的稀盐酸将该体系的 pH 值调节至 3~4, 有大量白色固体析出, 抽滤, 40 °C 下烘干, 得到化合物粗品粉末, 所得粉末可直接用于下一步反应. 本工作中其他取代肉桂酸均通过此方法合成.

3.2.2 化合物 B 的合成

在干燥的茄形瓶中依次加入化合物 A (5 mmol)、EDCI (6 mmol) 和 HOBt (6 mmol), 加入无水 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) (20 mL) 作为反应溶剂, 在室温下反应约 2 h, 薄层色谱(TLC)监测原料 A 反应完全即可. 然后向该反应体系中一次性加入相应的胺类化合物(4 equiv.), 室温下继续反应约 1 h. 反应完成后, 向反应体系中加入约 80 mL 纯化水, 用二氯甲烷萃取. 收集二氯甲烷层, 减压蒸馏除去溶剂, 得无色或浅黄色油状化合物 B. 化合物 B 未经进一步纯化直接用于下一步反应.

3.2.3 目标化合物 1~17 的合成

将化合物 C (5 mmol)、EDCI (6 mmol)、HOBt (6 mmol) 和溶剂无水 DMF (20 mL) 在室温下反应约 2 h, TLC 监测原料 C 反应完全即可. 然后向反应体系中加入化合物 B (1.2 equiv.), 室温下反应约 1 h. 反应完成后, 向体系中加入约 100 mL 纯化水, 若产物直接从体系中析出, 直接抽滤出固体, 烘干即可得到粗产物; 若产物不能从溶液中析出, 用二氯甲烷萃取水相, 收集有机层, 减压蒸馏除去溶剂即得粗产物. 粗产物通过 DMSO 和无水乙醇双溶剂重结晶纯化, 得到目标化合物 1~17.

(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2*E*)-3-(2-甲氧基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**1**): 浅黄色粉末, 产率 69.5%. m.p. 262.0~263.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.50 (s, 2H), 7.89 (d, *J*=1.9 Hz, 1H), 7.75 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J*=8.4, 1.9 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.56~7.53 (m, 1H), 7.41~7.36 (m, 1H), 7.08 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.00 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 6.84 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 163.7, 162.7, 157.8, 137.7, 135.6, 135.4, 132.1, 131.8, 131.4, 131.2, 129.8, 128.3, 127.5, 123.0, 121.8, 120.9, 119.7, 111.9, 55.7; HRMS calcd for

C₁₉H₁₇Cl₂N₂O₃ [M+H]⁺ 391.0616, found 391.0587.

(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2*E*)-3-(2-溴苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**2**): 白色粉末, 产率 43.2%. m.p. 274.0~274.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.64 (d, *J*=3.5 Hz, 1H), 10.56 (d, *J*=3.5 Hz, 1H), 7.88 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.77 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 7.72~7.66 (m, 3H), 7.59 (dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.45 (t, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.32 (td, *J*=7.8, 1.5 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.76 (d, *J*=15.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.8, 162.7, 138.3, 137.9, 135.6, 134.2, 133.4, 132.2, 131.9, 131.7, 131.3, 129.8, 128.6, 127.9, 127.6, 124.5, 122.6, 121.6; HRMS calcd for C₁₈H₁₄BrCl₂N₂O₂ [M+H]⁺ 438.9616, found 438.9600.

(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2*E*)-3-(2-氯苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**3**): 浅黄色粉末, 产率 60.1%. m.p. 276.4~277.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.65~10.53 (m, 2H), 7.87 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J*=15.6 Hz, 1H), 7.73~7.71 (m, 1H), 7.66 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.55~7.48 (m, 2H), 7.43~7.37 (m, 2H), 6.82 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J*=16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.8, 162.7, 137.9, 135.6, 133.6, 132.5, 132.2, 131.9, 131.5, 131.3, 130.2, 129.8, 128.0, 127.9, 127.6, 122.5, 121.6; HRMS calcd for C₁₈H₁₃Cl₄N₂O₂ [M+H]⁺ 395.0121, found 395.0095.

(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2*E*)-1-氧亚基-3-[2-(三氟甲基)苯基]丙-2-烯基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**4**): 灰白色粉末, 产率 19.2%. m.p. 247.6~248.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.70 (s, 1H), 10.58 (s, 1H), 7.89 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.85 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.82~7.72 (m, 3H), 7.68 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.63~7.58 (m, 2H), 7.53 (d, *J*=15.9 Hz, 1H), 6.83 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 6.83 (d, *J*=15.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 162.7, 162.3, 137.8, 135.6, 135.0, 133.3, 133.2, 132.1, 131.8, 131.2, 130.0, 129.8, 128.0, 127.5, 127.0, 126.2, 125.6, 124.01, 121.6; HRMS calcd for C₁₉H₁₄Cl₂F₃N₂O₂ [M+H]⁺ 429.0384, found 429.0355.

(2*E*)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2*E*)-3-(2-硝基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**5**): 白色粉末, 产率 31.2%. m.p. 282.4~283.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.75~10.50 (m, 2H), 8.04 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 7.83~7.75 (m, 3H), 7.67 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.65~7.61 (m, 1H), 7.59 (dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=16.0 Hz,

1H), 6.73 (d, $J=15.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.7, 162.3, 148.4, 137.8, 135.6, 135.6, 134.1, 132.1, 131.9, 131.2, 130.6, 129.9, 129.8, 128.9, 127.6, 124.8, 124.0, 121.6; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{-N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 406.0361, found 406.0332.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-(2,3-二甲氧基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**6**): 白色粉末, 产率 63.3%. m.p. 235.7~237.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.55 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 10.50 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=7.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.13~7.06 (m, 2H), 6.83 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.4, 162.7, 152.9, 147.7, 137.7, 135.6, 134.8, 132.1, 131.9, 131.2, 129.8, 128.2, 127.5, 124.6, 121.7, 120.6, 118.9, 114.3, 60.8, 55.9; HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 421.0722, found 421.0704.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-(2,4-二甲氧基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**7**): 黄色粉末, 产率 20.9%. m.p. 223.7~225.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.40 (s, 2H), 7.89 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.71~7.65 (m, 2H), 7.61 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.63~6.56 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.0, 162.6, 162.1, 159.3, 137.5, 135.6, 135.3, 132.0, 131.8, 131.2, 129.7, 129.7, 127.4, 121.8, 117.0, 115.9, 106.1, 98.5, 55.7, 55.5; HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 421.0722, found 421.0691.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-(2,4-二甲基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**8**): 白色粉末, 产率 67.2%. m.p. 271.5~272.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.52~10.44 (m, 2H), 7.89 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.74~7.66 (m, 2H), 7.60 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.07~7.04 (m, 2H), 6.83 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.27 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.2, 162.5, 139.2, 137.5, 137.4, 136.8, 135.6, 131.9, 131.7, 131.4, 131.1, 130.6, 129.6, 127.4, 127.1, 126.1, 121.7, 119.4, 20.8, 19.3; HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 389.0824, found 389.0795.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-(3,4-二甲基苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**9**): 白色粉末, 产率 73.1%. m.p. 263.2~263.3 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400

MHz, DMSO- d_6) δ : 10.48 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.90 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J=8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.32 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 2.25 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.3, 162.6, 140.4, 138.6, 137.6, 136.9, 135.6, 132.2, 132.0, 131.8, 131.2, 130.1, 129.7, 128.8, 127.4, 125.3, 121.7, 118.1, 19.4; HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 389.0824, found 389.0798.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-[4-(二甲基氨基)苯基]-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**10**): 黄色粉末, 产率 45.0%. m.p. 284.8~286.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.41 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 10.27 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J=8.4, 1.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.46~7.39 (m, 3H), 6.83 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.73 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 2.97 (s, 6H); HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 404.0933, found 404.0903.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-3-(呋喃-2-基)-1-氧亚基丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**11**): 白色粉末, 产率 12.7%. m.p. 231.1~232.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.50 (s, 2H), 7.88 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.62~7.58 (m, 1H), 7.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J=3.3, 1.8$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J=16.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.2, 162.8, 150.8, 145.3, 137.7, 135.6, 132.1, 131.9, 131.2, 129.8, 127.6, 127.5, 121.7, 116.4, 114.8, 112.7; HRMS calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 351.0303, found 351.0274.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[(2E)-1-氧亚基-3-(吡啶-2-基)丙-2-烯基]乙氮基}丙-2-烯-1-酮(**12**): 灰黑色粉末, 产率 39.5%. m.p. 240.1~242.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.65 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 10.48 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 8.63 (d, $J=3.9$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.85 (td, $J=7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.64~7.60 (m, 2H), 7.57 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.39~7.36 (m, 1H), 7.19 (d, $J=15.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=15.6$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.0, 162.7, 152.7, 149.9, 139.6, 137.6, 137.3, 135.6, 132.0, 131.8, 131.13, 129.7, 127.4, 124.5, 124.3, 122.9, 121.7; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 362.0463, found 362.0434.

2-(3,4-二氯苯基)-1-{4-[2-(3,4-二氯苯基)乙酰基]哌嗪-1-基}乙-1-酮(**13**): 白色粉末, 产率 42.3%. m.p. 262.6~264.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.56 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J=1.8$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 3.79 (s, 4H), 3.55~3.55 (m, 8H); HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 459.0201, found 459.0175.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{4-[(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-氧亚基丙-2-烯基]哌嗪-1-基}丙-2-烯-1-酮(**14**): 黄色粉末, 产率 10.1%. m.p. 271.1~272.8 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.13 (s, 2H), 7.74 (dd, $J=8.4$, 1.8 Hz, 2H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.47 (q, $J=15.4$ Hz, 4H), 3.79 (s, 4H), 3.63 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.4, 139.3, 136.1, 131.8, 131.8, 130.9, 129.5, 128.5, 128.5, 45.4; HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 483.0201, found 483.0172.

3,4-二氯-N-(4-[(3,4-二氯苯基)羰基]氨基)丁基)苯甲酰胺(**15**): 白色粉末, 产率 79.3%. m.p. 219.7~220.8 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.68 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 7.83 (dd, $J=8.4$, 2.0 Hz, 2H), 7.76 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 3.30 (d, $J=5.5$ Hz, 4H), 1.58 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.1, 135.0, 134.0, 131.3, 130.8, 129.2, 127.6, 39.2, 26.5; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 433.0044, found 433.0015.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-{2-[3-(3,4-二氯苯基)丙酰基]乙氨基}丙-2-烯-1-酮(**16**): 白色粉末, 产率 22.2%. m.p. 208.5~209.7 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.18 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 10.13 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=8.5$, 1.9 Hz, 1H), 7.56~7.46 (m, 3H), 7.25 (dd, $J=8.4$, 1.9 Hz, 1H), 6.75 (d, $J=15.9$ Hz, 1H), 2.87 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.51~2.49 (m, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.7, 163.2, 142.3, 137.7, 135.6, 132.1, 131.9, 131.2, 130.9, 130.5, 130.4, 129.7, 129.0, 128.7, 127.5, 121.8, 34.2, 29.7; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 430.9888, found 430.9858.

(2E)-3-(3,4-二氯苯基)-1-(2-{3-[4-(三氟甲基)苯基]丙酰基}乙氨基)丙-2-烯-1-酮(**17**): 白色粉末, 产率 4.1%. m.p. 199.8~201.8 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.18 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 10.15 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=1.9$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.60 (dd, $J=8.4$, 1.9 Hz, 1H), 7.53~7.48 (m, 3H), 6.75 (d, $J=15.9$ Hz, 1H), 2.97 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.55 (t, $J=7.5$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6)

δ : 169.9, 163.2, 146.0, 137.7, 135.6, 132.1, 131.9, 131.2, 129.8, 129.3, 127.5, 125.3, 125.2, 121.8, 34.2, 30.5; HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 431.0541, found 431.0512.

3.2.4 化合物 E 的合成

将 1 mmol 化合物 **D** 置于二口瓶中, 一端瓶口用橡胶塞密封, 另一瓶口通过三通阀连接氮气球. 将瓶中空气置换为氮气后, 用注射器将 5 mL 的无水二氯甲烷从有橡胶塞的瓶口加入, 在搅拌下用注射器缓慢向体系中加入 4 mL 草酰氯, 加 3 滴无水 DMF 催化反应. 室温下反应约 2 h, TLC 监测原料 **D** 反应完全即可. 减压除去反应体系中的溶剂及多余的草酰氯, 瓶中剩下的固体即为化合物 **E**, 重新装上氮气保护装置用于下一步反应.

3.2.5 目标化合物 18 和 19 的合成

将氮气保护下的化合物 **E** 用无水四氢呋喃(5 mL)溶解, 向体系中加入 3,4-二氯苄胺(2.5 equiv.)以及 5 滴三乙胺, 室温下反应约 1 h. 反应完成后, 向反应体系中加入约 40 mL 纯化水, 若产物直接从体系中析出, 直接抽滤出固体, 烘干即可得到粗产品. 若产物不能从溶液中析出, 用二氯甲烷萃取, 收集有机层, 减压蒸馏除去溶剂即得粗产品. 粗产物通过 DMSO 和无水乙醇双溶剂重结晶纯化.

N-[(3,4-二氯苯基)甲基]-4-[(3,4-二氯苯基)甲基]氨基]-4-氧亚基丁酰胺(**18**): 白色粉末, 产率 6.2%. m.p. 182.3~184.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.41 (t, $J=5.9$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=1.8$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J=8.4$, 1.8 Hz, 2H), 4.24 (d, $J=6.0$ Hz, 4H), 2.42 (s, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.8, 141.1, 131.0, 130.4, 129.2, 129.1, 127.5, 41.1, 30.6; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 433.0044, found 433.0016.

(2E)-N-[(3,4-二氯苯基)甲基]-4-[(3,4-二氯苯基)甲基]氨基]-4-氧亚基丁-2-烯酰胺(**19**): 白色粉末, 产率 3.8%. m.p. 276.3~276.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.99 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J=1.8$ Hz, 2H), 7.27 (dd, $J=8.4$, 1.8 Hz, 2H), 6.92 (s, 2H), 4.38 (d, $J=6.0$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.1, 140.4, 132.9, 131.1, 130.7, 129.6, 129.4, 127.8, 41.5; HRMS calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 430.9888, found 430.9850.

3.3 生物活性实验

3.3.1 MTT 法

胃癌细胞株 AGS 以每孔 3000 个细胞的密度接种于 96 孔培养皿中. 以浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 的药物处理细胞 72 h

后, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT(北京索莱宝生物科技有限公司)溶液, 在培养箱中继续培养 4 h. 弃去孔中液体后, 每孔加入 150 μL DMSO, 于振荡器上震荡 1~2 min 使结晶完全溶解, 用酶标仪(Molecular Devices, 美国)在 490 nm 波长下测量吸光度.

3.3.2 细胞集落形成实验

胃癌细胞株 AGS 以每孔 3000 个细胞的密度接种于 6 孔板, 待 24 h 细胞贴壁后加入化合物 **17** 孵育, 并设置姜黄素为阳性对照, DMSO 为阴性对照. 当 DMSO 组细胞集落长至 70% 时, 弃去培养基, 磷酸缓冲溶液(PBS)清洗后, 以含多聚甲醛(0.04 g/mL)的 PBS 溶液固定 15 min 后, 使用结晶紫染色, 拍照记录.

3.3.3 划痕实验

将处于对数生长期的 AGS 细胞以每孔 3×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 待细胞长至约 80%, 用中枪头进行划痕, PBS 清洗后加入低血清培养基, 使用倒置显微镜拍照, 拍照结束后加药, 于加药 0、12、24、36 h 进行拍照.

3.3.4 细胞周期实验

将 AGS 细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中. 加入 2 μL 不同浓度药物处理细胞 22 h 后, 用含乙二胺四乙酸(EDTA, 2.5 g/L)的胰酶消化后回收至 4mL 离心管, 在体积分数为 75% 的冰乙醇中固定 24 h. 用 500 μL 含有 RNase 的碘化丙啶(PI) (BD, USA)洗涤并用 200 目纱布过滤. 最后在 FACS Calibur 流式细胞仪(BD, USA)中进行细胞周期分析.

3.3.5 细胞凋亡实验

将 AGS 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 24 h 细胞贴壁后, 加入对应浓度的药, 待药物孵育 26 h 后用无 EDTA 胰酶消化, 使用凋亡检测试剂盒(BD, USA), 以 FITC-annexinV(早期凋亡)和 PI(晚期凋亡)双染色法检测细胞凋亡, 并通过流式细胞术(FACS Calibur, BD, USA)分析样本. 采用 FlowJo 软件进行细胞凋亡的定量分析. 细胞凋亡率=晚期凋亡率+早期凋亡率.

3.3.6 Western blot 实验方法

将人胃癌细胞株 AGS 细胞分别以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中过夜. 药物孵育一定时间后, 裂解收集细胞, 考马斯亮蓝法制备蛋白样品. 蛋白质样品用含丙烯酰胺(0.1 g/mL)的聚丙烯酰胺的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(微孔)上. 然后在室温下用含脱脂牛奶(0.05 g/mL)的 TBST (Tris 盐缓冲液+吐温)溶液封闭 1.5 h. 在用 TBST 洗涤后, 利用一抗(Ceaved-PARP、Bax、

Bcl-2、p-DYRK1A、DYRK1A、p-AKT、AKT 和 GAPDH)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育 PVDF 膜. 随后, 将膜与相应的二抗孵育 1 h, 用增强化学发光试剂盒(ECL; Bio-Rad)观察蛋白条带. 使用 Image J 软件处理数据.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **1~19** 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HRMS 的谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *Ca-Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209.
- [2] Tsai, C. H.; Lin, Y. H.; Li, Y. S.; Ho, T. L.; Hoai Thuong, L. H.; Liu, Y. H. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9257.
- [3] Margiotta, E.; van der Lubbe, S. C. C.; de Azevedo Santos, L.; Paragi, G.; Moro, S.; Bickelhaupt, F. M.; Fonseca Guerra, C. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 1317.
- [4] Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363.
- [5] Fang, W. Y.; Ravindar, L.; Rakesh, K. P.; Manukumar, H. M.; Shantharam, C. S.; Alharbi, N. S.; Qin, H. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *173*, 117.
- [6] Koksai, M.; Yarim, M.; Erdal, A.; Bozkurt, A. *Drug Res. (Stuttgart, Ger.)* **2014**, *64*, 66.
- [7] Koksai, M.; Bilge, S. S.; Bozkurt, A.; Sahin, Z. S.; Isik, S.; Erol, D. *Arzneimittelforschung* **2008**, *58*, 510.
- [8] Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *J. Enzyme Inhib.* **2001**, *16*, 425.
- [9] Onda, K.; Shiraki, R.; Yonetoku, Y.; Momose, K.; Katayama, N.; Orita, M.; Yamaguchi, T.; Ohta, M.; Tsukamoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8627.
- [10] Budke, B.; Kalin, J. H.; Pawlowski, M.; Zelivianskaia, A. S.; Wu, M.; Kozikowski, A. P.; Connell, P. P. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 254.
- [11] Baker, J. R.; Gilbert, J.; Paula, S.; Zhu, X.; Sakoff, J. A.; McCluskey, A. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1447.
- [12] Szafranski, K.; Sławiński, J. *Molecules* **2015**, *20*, 12029.
- [13] Peterson, Y. K.; Kelly, P.; Weinbaum, C. A.; Casey, P. J. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 12445.
- [14] Kumari, S.; Carmona, A. V.; Tiwari, A. K.; Trippier, P. C. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12290.
- [15] Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, *480*, 471.
- [16] Tang, J.-J. *M.S. Thesis*, Hunan University, Changsha, **2017** (in Chinese). (唐晶晶, 硕士论文, 湖南大学, 长沙, **2017**.)
- [17] Strharsky, T.; Pindjakova, D.; Kos, J.; Vrablova, L.; Michnova, H.; Hosek, J.; Strakova, N.; Lelakova, V.; Leva, L.; Kavanova, L.; Oravec, M.; Cizek, A.; Jampilek, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3159.
- [18] Yu, P.; Hu, J.; Zhou, T. Y.; Wang, P.; Xu, Y. H. *J. Chem. Res.* **2011**, *35*, 703.
- [19] Esterhuysen, C.; Heßelmann, A.; Clark, T. *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 772.
- [20] Abula, A.; Xu, Z.; Zhu, Z.; Peng, C.; Chen, Z.; Zhu, W.; Aisa, H. A. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 6242.
- [21] He, X.-H.; Li, H.-P.; Zhao, Q.; Peng, C.; Huang, W. *Chin. Arch. Tradit. Chin. Med.* **2022**, *40*, 175 (in Chinese). (何享鸿, 李和平, 赵倩, 彭成, 黄维, 中华中医药学刊, **2022**, *40*, 175.)
- [22] Rammohan, M.; Harris, E.; Bhansali, R. S.; Zhao, E.; Li, L. S.; Crispino, J. D. *Oncogene* **2022**, *41*, 2003.
- [23] Chen, Z. Y.; Li, J.; Zhu, S. D.; Li, Z. D.; Yu, J. L.; Wu, J.; Zhang, C.; Zeng, L. H. *Exp. Ther. Med.* **2022**, *23*, 209.

(Zhao, C.)