

· 论 文 ·

新型法尼基硫代水杨酰胺衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性

毛春芳^{1,2}, 徐辰俊^{1,2}, 王雪敏^{1,2}, 李祥华², 张伟², 王新杨², 凌勇^{1,2*}⁽¹⁾江苏省南通卫生高等职业技术学校药学系, 南通 226001; ⁽²⁾南通大学药学院, 南通 226001)

摘 要 通过将法尼基硫代水杨酸(FTS)的羧基用各种胺进行胺化设计, 合成得到 11 个法尼基硫代水杨酰胺衍生物(9a~9k), 并对它们进行了体外抗肿瘤活性评价。实验表明其中的 8 个化合物对 5 种人肿瘤细胞具有较强的抗增殖活性, 其中, 化合物 9k 的细胞增殖抑制活性最强, 对 5 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 范围达 6.05~8.16 μmol/L, 优于阳性对照 FTS, 与索拉非尼相当。此外, 化合物 9k 可下调细胞内凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的水平并上调促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3, 提示该化合物具有显著诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

关键词 法尼基硫代水杨酰胺; 衍生物; 合成; 抗肿瘤活性; 细胞凋亡

中图分类号 R914.5; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)02-0162-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150204

Design, synthesis and antitumor activity of farnesylthiosalicylamide derivatives

MAO Chunfang^{1,2}, XU Chenjun^{1,2}, WANG Xuemin^{1,2}, LI Xianghua², ZHANG Wei², WANG Xinyang², LING Yong^{1,2*}¹Department of Pharmacy, School of Nantong Health Higher Occupational Technology, Nantong 226001;²Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract A series of farnesylthiosalicylamide derivatives (9a-9k) were designed and synthesized via condensing the carboxyl of farnesylthiosalicylic acid(FTS) with different amines, and the *in vitro* biological activity was evaluated. It was observed that eight of them displayed strong antitumor activity against five human cancer cells *in vitro*. Notably, compound 9k exhibited the most active with the IC₅₀ values of 6.05-8.16 μmol/L range against the tested cancer cells, which were superior to those of FTS and even comparable to that of sorafenib *in vitro*. In addition, compound 9k down-regulated the protein of Bcl-2 and increased the expression levels of Bax and caspase-3 proteins, indicating that compound 9k could induce tumor cell apoptosis.

Key words farnesylthiosalicylamide; derivatives; synthesis; antitumor activity; cell apoptosis

This study was supported by the Natural Science Foundation of China (No. 81302628), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2011389), and the Applied Research Projects of Nantong City (No. BK2012085)

自半个世纪前 Ras 蛋白被发现以来, Ras 已被深入研究并成为最为熟知的癌基因蛋白类, 它们在细胞增殖, 分化和凋亡等生物进程中扮演十分重要角色^[1-2]。Ras 蛋白在肿瘤细胞中广泛的致癌性

突变使它成为抗肿瘤药物研究的热门靶点^[3], 在肿瘤细胞中, ras 基因突变引起 Ras 蛋白的持续活化而发生异常 Ras 信号级联最终致使生物功能紊乱^[4-5]。法尼基硫代水杨酸(FTS)可以竞争性阻

收稿日期 2014-11-05 *通信作者 Tel:0513-85051892 E-mail:lyyy111@sina.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81302628); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2011389); 南通市应用研究资助项目(No. BK2012085)

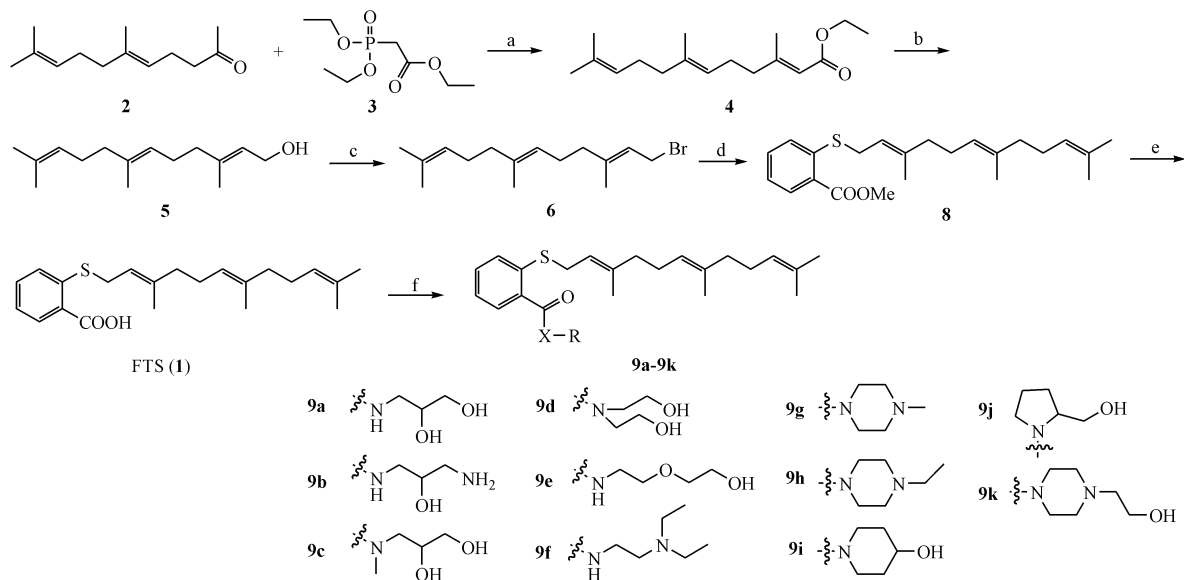
断活性的 Ras 蛋白与细胞膜半乳凝素 (galectin) 疏水性口袋结合, 发挥 Ras 抑制作用, 其具有疏水性的法尼基硫代物活性片段和亲水性的羧基片段^[6]。文献报道 FTS 对多种肿瘤具有化学治疗作用, 如胰腺癌、肝癌、肺癌和乳腺癌等^[7-9], 然而其活性较低, 使用剂量大, 治疗效果有限^[10]。因此, 以 FTS 为先导化合物, 寻找更高效安全的靶向 Ras 及下游信号通路的抗肿瘤药物具有重要意义。

众所周知, 小分子含氮杂环、多胺或醇胺是药物设计中常用的化学片段, 这些片段有助于获取分子多样性, 提高化合物水溶性, 增强化合物生物利用度及体内代谢稳定性^[11]。本课题组先前报道通过将 FTS 的羧基成酰胺或成酯, 可以大大改善 FTS 的生物学功能, 如二胺类法尼基硫代水杨酰胺衍生物, 较 FTS 显著提高其抗肿瘤活性、改善其水溶性和诱导肿瘤细胞凋亡^[12]; 通过酯键连接阿魏酸酯片段, 以促凋亡的形式更有效地抑制肿瘤细胞生长^[13]。因此, 鉴于酰胺的稳定性及特殊的生物学功能, 将 FTS 的羧基与不同的含氮杂环、多胺或醇胺等亲水性基团偶联, 设计合成了 11 个法尼基硫

代水杨酰胺衍生物 **9a ~ 9k**, 期望所设计化合物获得具有抗肿瘤活性更佳的、较好的酯水分布系数及促进肿瘤细胞凋亡的新型法尼基硫代水杨酰胺衍生物。

1 合成路线

根据本课题组先前报道的方法^[12], 合成先导物法尼基硫代水杨酸 (FTS, **1**), 其合成过程见路线 1。以香叶基丙酮 **2** 为原料, 通过与 NaH 作用后的磷酸基乙酸三乙酯 (TEPA, **3**) 反应得到法尼酸乙酯 **4**。化合物 **4** 经四氢锂铝 (LiAlH₄) 还原得到法尼醇 **5**, 然后经 PBr₃ 溴代得到法尼基溴 **6**, 化合物 **6** 不经纯化直接用于下一步。硫代水杨酸甲酯 **7** 和中间体 **6** 在 K₂CO₃ 作用下反应得到法尼基硫代水杨酸甲酯 **8**, 其在 NaOH 碱性条件下水解得到先导物 **1**。然后, 先导物 **1** 在草酰氯作用下得到法尼基硫代水杨酸酰氯中间体, 不经纯化与不同胺反应得到目标化合物 **9a ~ 9k**。目标化合物经柱色谱纯化, 并通过 IR、¹H NMR、MS 和元素分析进行结构确证。



Scheme 1 Reaction conditions and reagents: a) TEPA, NaH, dry THF, 0 °C-r. t., 10 h, 78%; b) LiAlH₄, dry THF, 0 °C-r. t., 2 h, 91%; c) PBr₃, pyridine, *n*-hexane, ether, 0 °C-r. t., 3 h, 76%; d) **7**, K₂CO₃, CH₃CN, 60 °C, 4-6 h, 84%; e) 2 N NaOH, MeOH, 60 °C, 4 h, 92%; f) (COCl)₂, TEA, 0 °C-r. t., 42% -78%

2 实验部分

2.1 材料

岛津 FTIR-8400S 型红外光谱仪 (KBr 压片

法); Brucker AV-300 型核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); HP 1100LC/MSD 质谱仪 (美国 Agilent 公司); Elementar Vario EL III 型元素分析仪 (德国 Elementar 公司); GF₂₅₄ 色谱硅胶 (青岛海洋化工厂);

试剂均为市售化学纯或分析纯产品。

2.2 化学实验

反式法尼酸乙酯(4) 向 60% NaH (3.0 g, 80 mmol) 的 THF 溶液(200 mL)中于 0 °C 下缓慢滴加磷酰基乙酸三乙酯(10.8 g, 48 mmol) 的 THF (50 mL) 溶液, 滴加完毕 0.5 h 后恢复至室温搅拌 2 h。将反应液冷却到 0 °C, 向其中滴加香叶基丙酮(5.8 g, 30 mmol), 然后室温搅拌 8 h, 缓慢加水(200 mL), 用乙酸乙酯(100 mL×3) 萃取。合并有机层, 水和饱和食盐水洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后减压浓缩。粗品经快速柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 50:1), 得无色透明液体 6.18 g, 收率 78%。

法尼醇(5) 将法尼酸乙酯(10.6 g, 40 mmol) 溶于无水四氢呋喃(THF, 100 mL) 中, 于 -5 °C 下缓慢分批滴入 LiAlH₄ (3.04 g, 80 mmol), 0.5 h 后恢复至室温继续搅拌 1 h。向反应液中缓慢加入过量的乙酸乙酯(100 mL) 淬灭, 加入到 100 mL 水中, 直到有白色颗粒状形成, 抽滤, 滤液用乙酸乙酯(100 mL×3) 萃取。合并有机层, 用饱和食盐水洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后减压浓缩。粗品经快速柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 4:1), 得无色透明液体 8.08 g, 收率 91%。

法尼基溴(6) 将化合物 5(4.44 g, 20 mmol) 溶于乙醚(50 mL) 中, 加入吡啶 2 滴, 然后在氮气保护下, 于 0 °C 下滴加 PBr₃ (2.71 g, 10 mmol) 的正己烷(10 mL) 溶液, 搅拌 0.5 h 后恢复至室温继续反应 2 h。然后将反应液倒入冰水中, 用乙醚(20 mL×3) 萃取, 合并有机层, 用饱和食盐水洗涤两次, 无水 Na₂SO₄ 干燥。过滤, 减压浓缩有机溶剂得无色透明液体 4.32 g, 收率 76%。

法尼基硫代水杨酸甲酯(8) 向反应瓶中加入硫代水杨酸甲酯 7(1.68 g, 10 mmol), 5(4.54 g, 16 mmol), 碳酸钾(3.45 g, 25 mmol), 乙腈(60 mL) 于 60 °C 下回流反应 4 h, TLC 监测反应完全。过滤, 浓缩, 粗品经快速柱色谱(石油醚-乙酸乙酯, 30:1), 得浅黄色油状物 3.12 g, 收率 84%。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 7.96(1H, m, Ar-H), 7.74(1H, m, Ar-H), 7.30(1H, m, Ar-H), 7.14(1H, m, Ar-H), 5.34(1H, m, SCH₂CH), 5.09(2H, m, 2×CH₂CH=CCH₃), 3.92(3H, s, OCH₃), 3.58(2H, d, J=7.8 Hz, SCH₂), 1.89~2.02(8H, m, 2×CCH₂CH₂CH), 1.50~1.68(12H, m, 4×CH=CCH₃)。

CCH₃)。

法尼基硫代水杨酸(1) 向化合物 8(1.86 g, 5 mmol) 的甲醇(25 mL) 溶液中加入 2 mol/L NaOH (5 mL), 回流反应 4 h, 降至室温后蒸除溶剂。浓缩物用 1 mol/L 的稀盐酸(25 mL) 溶解, 用乙酸乙酯(30 mL×3) 萃取。合并有机层, 饱和食盐水洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥后减压浓缩得淡黄色蜡状固体 1.65 g, 产率 92%。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.15(1H, m, Ar-H), 7.47(1H, m, Ar-H), 7.42(1H, m, Ar-H), 7.26(1H, m, Ar-H), 5.31(1H, m, SCH₂CH), 5.09(2H, m, 2×CH₂CH=CCH₃), 3.57(2H, d, J=4.5 Hz, SCH₂), 1.89~2.02(8H, m, 2×CCH₂CH₂CH), 1.50~1.68(12H, m, 4×CH=CCH₃); ESI-MS *m/z*: 357[M-H]⁺; Anal. Calcd for C₂₂H₃₀O₂S: C, 73.70; H, 8.43. Found: C, 73.77; H, 8.84。

9a~9k 的总合成路线

将 FTS (0.36 g, 1 mmol) 溶于干燥 CH₂Cl₂ (10 mL) 中, 然后滴加草酰氯(0.34 mL, 4 mmol), 于室温下搅拌 6 h。减压浓缩蒸除溶剂及过量的草酰氯, 得淡棕色 FTS 酰氯中间体并溶于干燥 CH₂Cl₂ 10 mL 中, 缓慢滴加到不同的多胺或醇胺(1~10 mmol) 和三乙胺(0.21 mL, 1.5 mmol) 的干燥 CH₂Cl₂ (50 mL) 溶液中, 于 0 °C 下搅拌 0.5 h 后恢复至室温继续搅拌 2 h。蒸干溶剂, 浓缩物经硅胶柱色谱纯化得目标化合物 9a~9k。

N-(2,3-二羟丙基)-2-法尼基硫代苯甲酰胺(9a) 浅黄色油状物, 收率 48.3%。IR(KBr, ν): 3424, 2928, 1735, 1560, 1226 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.12(1H, br, NH), 7.39~7.46(3H, m, Ar-H), 7.24(1H, m, Ar-H), 5.31(1H, m, SCH₂CH), 5.09(2H, m, 2×CH₂CH=CCH₃), 3.54~3.83(7H, m, SCH₂, OCH(CH₂)₂), 1.95~2.02(8H, m, 2×CCH₂CH₂CH), 1.49~1.68(12H, m, 4×CH₃); ESI-MS *m/z*: 432[M+H]⁺; Anal. Calcd for C₂₅H₃₇NO₃S: C, 69.57; H, 8.64; N, 3.25. Found: C, 69.42; H, 8.81; N, 3.16。

N-(3-氨基-2-羟丙基)-2-法尼基硫代苯甲酰胺(9b) 浅黄色油状物, 收率 42.7%。IR(KBr, ν): 3462, 2929, 1699, 1585, 1244 cm⁻¹; ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.15(1H, br, NH), 7.39~7.45(3H, m, Ar-H), 7.22(1H, m, Ar-H), 5.32(1H, m,

SCH₂CH), 5.11 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.51 ~ 3.78 (7H, m, SCH₂, OCH(CH₂)₂), 1.91 ~ 1.99 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.51 ~ 1.71 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 431 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₅H₃₈N₂O₂S: C, 69.72; H, 8.89; N, 6.50. Found: C, 69.57; H, 9.03; N, 6.59.

N-(2,3-二羟丙基)-*N*-甲基-2-法尼基硫代苯甲酰胺 (**9c**) 浅黄色油状物, 收率 51.2%。IR (KBr, ν): 3 410, 2 927, 1 706, 1 548, 1 230 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.40 ~ 7.48 (3H, m, Ar-H), 7.23 (1H, m, Ar-H), 5.31 (1H, m, SCH₂CH), 5.07 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.52 ~ 3.89 (7H, m, SCH₂, OCH(CH₂)₂), 2.06 (3H, s, NCH₃), 1.94 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.50 ~ 1.69 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 446 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₆H₃₉NO₃S: C, 70.07; H, 8.82; N, 3.14. Found: C, 69.96; H, 8.97; N, 3.04.

N,N-双(2-羟乙基)-2-法尼基硫代苯甲酰胺 (**9d**) 浅黄色油状物, 产率 54.1%。IR (KBr, ν): 3 409, 2 928, 1 739, 1 544, 1 262 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.38 ~ 7.49 (3H, m, Ar-H), 7.25 (1H, m, Ar-H), 5.27 (1H, m, SCH₂CH), 5.08 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.55 ~ 3.79 (10H, m, SCH₂, 2 × CH₂CH₂O), 1.94 ~ 2.02 (8H, m, 2 × CHC H₂C H₂CH), 1.51 ~ 1.69 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 446 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₆H₃₉NO₃S: C, 70.07; H, 8.82; N, 3.14. Found: C, 69.91; H, 8.97; N, 3.02.

N-(2-(2-羟乙氧基)乙基)-2-法尼基硫代苯甲酰胺 (**9e**) 浅黄色油状物, 收率 65.9%。IR (KBr, ν): 3 440, 1 719, 1 585, 1 256 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.18 (1H, br, NH), 7.41 ~ 7.46 (3H, m, Ar-H), 7.26 (1H, m, Ar-H), 5.30 (1H, m, SCH₂CH), 5.08 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.49 ~ 3.82 (10H, m, SCH₂, (CH₂CH₂)₂O), 1.91 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CHCH₂CH₂CH), 1.53 ~ 1.68 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 446 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₆H₃₉NO₃S: C, 70.07; H, 8.82; N, 3.14. Found: C, 70.23; H, 8.58; N, 3.25.

N-(2-(二乙氨基)乙基)-2-法尼基硫代苯甲酰胺 (**9f**) 浅黄色油状物, 收率 78.3%。IR (KBr,

ν): 3 420, 2 928, 1 690, 1 593, 1 220 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 8.05 (1H, m, Ar-H), 7.83 (1H, m, Ar-H), 7.30 ~ 7.38 (2H, m, Ar-H), 5.23 (1H, m, SCH₂CH), 5.08 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.56 (2H, d, J = 6.0 Hz, SCH₂), 2.99 ~ 3.05 (8H, m, 4 × NCH₂), 1.96 ~ 2.02 (8H, m, 2 × CHCH₂CH₂CH), 1.53 ~ 1.68 (12H, m, 4 × CH₃), 0.98 (6H, m, 2 × CH₂CH₃); ESI-MS m/z : 457 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₈H₄₄N₂OS: C, 73.63; H, 9.71; N, 6.13. Found: C, 73.52; H, 9.94; N, 6.01.

4-甲基哌嗪-1-基-法尼基硫代苯基甲酮 (**9g**)

浅黄色油状物, 收率 65.8%。IR (KBr, ν): 3 428, 1 715, 1 581, 1 265 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.40 ~ 7.47 (3H, m, Ar-H), 7.24 (1H, m, Ar-H), 5.31 (1H, m, SCH₂CH), 5.08 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.56 (2H, d, J = 6 Hz, SCH₂), 3.04 ~ 3.25 (8H, m, 4 × NCH₂), 2.21 (3H, s, NCH₃), 1.94 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.50 ~ 1.71 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 441 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₇H₄₀N₂OS: C, 73.59; H, 9.15; N, 6.36. Found: C, 73.42; H, 8.91; N, 6.48.

4-乙基哌嗪-1-基-法尼基硫代苯基甲酮 (**9h**)

浅黄色油状物, 收率 71.6%。IR (KBr, ν): 3 418, 1 724, 1 588, 1 239 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.38 ~ 7.51 (3H, m, Ar-H), 7.24 (1H, m, Ar-H), 5.32 (1H, m, SCH₂CH), 5.07 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.55 (2H, d, J = 6 Hz, SCH₂), 2.65 ~ 3.01 (10H, m, 5 × NCH₂), 1.89 ~ 1.99 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.46 ~ 1.69 (15H, m, 5 × CH₃); ESI-MS m/z : 455 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₈H₄₂N₂OS: C, 73.96; H, 9.31; N, 6.16. Found: C, 73.81; H, 9.42; N, 6.21.

4-羟基哌啶-1-基-法尼基硫代苯基甲酮 (**9i**)

浅黄色油状物, 收率 58.3%。IR (KBr, ν): 3 442, 1 708, 1 560, 1 250 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.39 ~ 7.54 (3H, m, Ar-H), 7.19 (1H, m, Ar-H), 5.27 (1H, m, SCH₂CH), 5.11 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.46 ~ 3.79 (7H, m, SCH₂, 2 × NH₂, OCH), 1.96 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.38 ~ 1.74 (12H, m, 4 × CH₃, 2 ×

CH₂); ESI-MS m/z : 442 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₇H₃₉NO₂S: C, 73.42; H, 8.90; N, 3.17. Found: C, 73.29; H, 8.98; N, 3.05。

2-(羟甲基)吡咯烷-1-基-法尼基硫代苯基甲酮 (**9j**) 浅黄色油状物, 收率 55.4%。IR (KBr, ν): 3 432, 1 705, 1 580, 1 208 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.41 ~ 7.51 (3H, m, Ar-H), 7.26 (1H, m, Ar-H), 5.28 (1H, m, SCH₂CH₂), 5.06 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.38 ~ 3.74 (2H, m, SCH₂, OCH₂CH, NH₂), 1.97 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.42 ~ 1.70 (12H, m, 4 × CH₃, 2 × CH₂); ESI-MS m/z : 442 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₇H₃₉NO₂S: C, 73.42; H, 8.90; N, 3.17. Found: C, 73.26; H, 9.03; N, 3.11。

4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基-法尼基硫代苯基甲酮 (**9k**) 浅黄色油状物, 收率 61.2%。IR (KBr, ν): 3 402, 1 720, 1 566, 1 244 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 7.43 ~ 7.56 (3H, m, Ar-H), 7.27 (1H, m, Ar-H), 5.30 (1H, m, SCH₂CH₂), 5.11 (2H, m, 2 × CH₂CH = CCH₃), 3.47 ~ 3.86 (2H, m, SCH₂, OCH₂, 2 × NCH₂), 2.36 ~ 2.45 (6H, m, 3 × NCH₂), 1.96 ~ 2.01 (8H, m, 2 × CCH₂CH₂CH), 1.47 ~ 1.69 (12H, m, 4 × CH₃); ESI-MS m/z : 471 [M + H]⁺; Anal. Calcd for C₂₈H₄₂N₂O₂S: C, 71.45; H, 8.99; N, 5.95. Found: C, 71.38; H, 9.12; N, 5.82。

2.2 药理学实验

2.2.1 MTT 法 参照先前报道方法^[13], 用 LOGIT 法 (GraphPadPrism Version 4.03 软件) 测得受试化合物对人源肿瘤细胞株 (包括 MCF-7, SMMC-7721, SGC-7901, EJ, HCT116) 的 IC₅₀。

2.2.2 Western 免疫印迹实验 采用 Western 印迹法检测目标化合物 **9k** 对肿瘤细胞 SMMC-7721 中凋亡相关蛋白的水平。取处于指数生长期状态良好的细胞制成每毫升含 1.5 × 10⁵ 个细胞的悬液, 接种于 96 孔板上, 置恒温 CO₂ 培养箱中培养 24 h。换液, 加入 3, 6, 12 μmol/L 的受试化合物 **9k**, 阴性对照加等量 PBS, 继续培养 8 h。胰酶消化, PBS 清洗两遍。样品重悬于 PBS 中, 弃上清液, 细胞置于 2 mL EP 管中加入蛋白质裂解液, 每管 200 μL, 反复吹打后于冰浴反应 30 min, 离心取上清液 2 mL EP 管中, 采用 SDS-PAGE (胶浓度为 12%) 分离并且转移到硝化纤维膜上。将膜放于

现配的 5% 的脱脂奶粉封闭液中, 目标蛋白用 anti-Bcl-2, anti-Bax anti-caspase-3 和 anti-β-actin 标记, 结合抗体用 HRP 结合的二抗检测及增强的化学发光试剂的可视化, 它们相对 β-actin 的表达水平用密度扫描法测定。

3 结果与讨论

首先, 为了初步筛选出活性较好的化合物, 使用 MTT 法对目标化合物 **9a** ~ **9k** 进行体外人肿瘤细胞系增殖抑制活性研究, 所选人肿瘤细胞系为人乳腺癌细胞系 (MCF-7)、人肝癌细胞系 (SMMC-7721)、人胃癌细胞系 (SGC-7901), 使用 FTS 和索拉非尼 (sorafenib, 临床应用的 Raf 抑制剂) 作为阳性对照。受试人肿瘤细胞系与 50 μmol/L 浓度的化合物共同孵育。化合物对受试细胞的抑制率如图所示 (图 1), 与 FTS 相比, 大部分化合物表现出较强的肿瘤生长抑制活性, 如化合物 **9d** ~ **9k** 对细胞的增殖抑制率超过 60%, 优于 FTS 近 60% 的抑制率。其中, 化合物 **9e**, **9g**, **9i** 和 **9k** 表现出显著的抗增殖活性, 其活性与索拉非尼相当甚至优于索拉非尼, 鉴于此, 选择化合物 **9d** ~ **9k** 作进一步更广泛的肿瘤细胞生长抑制活性研究, 并确定化合物的半数抑制浓度 (IC₅₀)。然后, 将 MCF-7、SMMC-7721、SGC-7901、EJ 和 HCT116, 与化合物 **9d** ~ **9k** 共同孵育, 用 MTT 法评价不同浓度作用下化合物对肿瘤细胞的抗增殖作用, 并计算 IC₅₀, 结果如表 1 所示。所选化合物的抗肿瘤活性均较 FTS 有明显的提高, 达到低微摩尔级, 并且其 IC₅₀ 水平表现出相当或微低于索拉非尼 (IC₅₀ = 8.85 ~ 20.3 μmol/L)。其中, 化合物 **9k** 显示出最强的活性, 其 IC₅₀ 范围为 6.05 ~ 8.16 μmol/L, 低于 FTS (IC₅₀ = 45.3 ~ 65.2 μmol/L)。

进而, 测定了 SMMC-7721 细胞与化合物 **9k** 在不同浓度下共同孵育后细胞内 Bax, Bcl-2 和 caspase-3 蛋白的水平, β-actin 表达水平为阳性对照。Bcl-2 和 Bax 分别是已知的抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白, 而 caspase-3 是一种凋亡执行因子。如图 2 所示, 给药后, 细胞内促凋亡因子 Bax 水平随着给药浓度的升高而显著升高, 而抗凋亡因子 Bcl-2 水平明显降低, 并且 caspase-3 的表达水平也有所提高。这些现象表明, 所合成的化合物的抗肿瘤作用与其诱导细胞凋亡的作用相关。

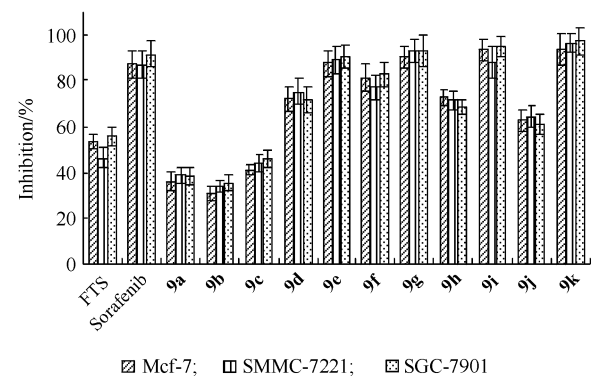


Figure 1 Inhibition of cell proliferation of target compounds in MCF-7, SMMC-7721, and SGC-7901 cell lines after incubation for 48 h at a concentration of 50 $\mu\text{mol/L}$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Cytotoxic activity of compounds **9a-9k** against five human cancer cell lines

Compd.	In vitro inhibition of human cancer cells proliferation ($\text{IC}_{50}^a, \mu\text{mol/L}$)				
	MCF-7	SMMC-7721	SGC-7901	EJ	HCT116
FTS ^b	47.5	65.2	45.3	46.5	52.1
Sorafenib	8.85	18.1	13.7	20.3	10.5
9d	>25	>25	>25	23.2	>25
9e	14.8	12.5	11.9	15.7	13.1
9f	>25	>25	22.7	23.0	>25
9g	9.83	8.08	7.73	6.85	7.16
9h	19.7	21.1	>25	20.5	23.1
9i	11.2	12.5	8.61	7.83	10.0
9j	>25	22.9	>25	>25	23.4
9k	7.12	6.05	6.93	7.67	8.16

^aThe inhibitory effects of individual compounds on the proliferation of cancer cell lines were determined by MTT; ^bFarnesylthiosalicylamide

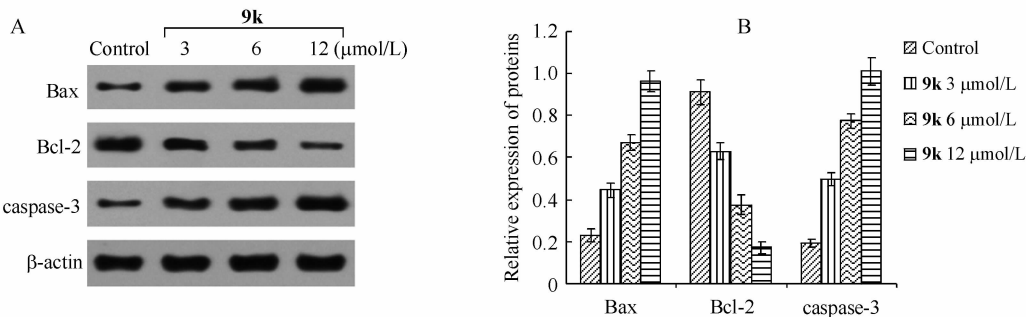


Figure 2 Effect of compound **9k** on the expression of apoptosis-related proteins in SMMC-7721 cells. (A) The expression of Bax, Bcl-2, caspase-3 and β -actin was examined by Western blot analysis. SMMC-7721 cells were incubated with, or without, compound **9k** at the indicated concentrations for 48 h and the levels of protein expression were detected using specific antibodies, and β -actin was used as the control. Data shown are representative images of each protein for three separate experiments. (B) Quantitative analysis; the relative levels of each protein compared to control β -actin were determined by densitometric scanning ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分析化合物 **9a ~ 9k** 的构效关系发现,引入含氮杂环、多胺或醇胺片段后的化合物体外抗肿瘤活性较 FTS 具有明显提高。整体来说,连接含氮杂环化合物活性较长链状多胺或醇胺化合物抗肿瘤活性高。此外,对于含羟基杂环(哌嗪基、哌啶基和吡咯烷基)化合物,其活性顺序由大到小依次为哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基;对于含哌嗪基化合物,含取代羟基化合物 **9k** 抗肿瘤活性优于含取代烷基化合物(如 **9g, 9h**)。

4 总 结

本研究设计合成了一系列法尼基硫代水杨酰胺衍生物 **9a ~ 9k**,体外实验表明大部分目标化合物较 FTS 具有更强的肿瘤细胞生长抑制活性,部分活性与索拉非尼活性相当或者更优,其中化合物 **9k**($\text{IC}_{50} = 6.05 \sim 8.16 \mu\text{mol/L}$)表现出最佳的抗

肿瘤活性。另外,实验表明,化合物 **9k** 可以降低细胞内凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的水平,提高促凋亡蛋白 Bax 和凋亡执行因子 caspase-3 的水平,提示该化合物可能具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

参 考 文 献

[1] Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, *et al.* Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, **10** (12): 842 – 857.

[2] Goitre L, Trapani E, Trabalzini L, *et al.* The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, **1120** (12): 1 – 18.

[3] Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review [J]. *Cancer Res*, 1989, **49** (17): 4682 – 4689.

[4] Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, **93** (14): 1062 – 1074.

[5] Takashima A, Faller DV. Targeting the RAS oncogene [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, **17** (5): 507 – 531.

- [6] Marciano D, Ben-Baruch G, Marom M, *et al.* Farnesyl derivatives of rigid carboxylic acids inhibitors of ras-dependent cell growth [J]. *J Med Chem*, 1995, **38**(8):1267–1272.
- [7] Riely GJ, Johnson ML, Medinaetal C, *et al.* A phase II trial of salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, **6**(8):1435–1437.
- [8] Charette N, De Saeger C, Horsmans Y, *et al.* Salirasib sensitizes hepatocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 and survivin-dependent mechanisms [J]. *Cell Death Disease*, 2013, **4**(1):e471.
- [9] Mologni L, Brussolo S, Ceccon M, *et al.* Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(12):e51449.
- [10] Haklai R, Elad-Sfadia G, Egozi Y, *et al.* Orally administered FTS (salirasib) inhibits human pancreatic tumor growth in nude mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, **61**(1):89–96.
- [11] St Jean DJ Jr, Fotsch C. Mitigating heterocycle metabolism in drug discovery[J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(13):6002.
- [12] Ling Y, Wang ZQ, Zhu HY, *et al.* Synthesis and biological evaluation of farnesylthiosalicylamides as potential anti-tumor agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, **22**(1):374–380.
- [13] Wang ZQ, Wang XM, Zhang W, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel farnesylthiosalicylic acid/hydroxycinnamic acid hybrids as potential anti-tumor agents[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2014, **45**(3):392–399.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》开通论文“快速通道”

为满足新药创制中重大发现、基金资助论文结题以及研究生毕业论文快速发表等需要,本刊编辑部特设“快速通道”,对符合要求的论文采用快速审稿流程,在收稿2周内将论文审稿结果(发表或修改后发表、按普通稿件处理、退稿)告知作者。审稿后,一经采用,本刊将尽快开具稿件“录用证明”,并按来稿先后顺序予以尽快刊登。

“快速通道”论文投稿要求:

1. 新药研发具有重大发现的论文、基金资助论文、研究生毕业论文等需要加快处理的论文,可以进入“快速通道”处理;
2. 应提供说明论文需要通过“快速通道”发表的理由,并在本刊投稿系统的“备注”处加以说明和注解;
3. 稿件应符合本刊《投稿须知》的要求,并附至少1位具高级职称的同行专家推荐意见;
4. 作者可推荐1~2名审稿专家(需注明其详细的联系方式,包括E-mail)供编辑部参考。

本刊编辑部对“快速通道”论文的声明:

1. 本刊拒绝一稿两投、两发(包括网上已经全文发表)的稿件。本刊将对所有来稿进行学术不端文献检测系统查新,杜绝学术不端。
2. 审稿通过可被本刊录用的稿件,但由于刊期原因未能及时见刊的,本刊将为作者开具稿件录用证明,以便研究生能顺利申请答辩。
3. “快速通道”论文免收审稿费,经专家审稿评价为优秀的研究性论文、选题前沿的热点综述性论文免收发表费。

(本刊编辑部)