

新型熊果酸衍生物与查耳酮缀合物的合成及其抗肿瘤活性初步评价

裴 婷^{1*}, 王玉英²

(¹华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院药学部, 武汉 430014;

²孝感市孝南区妇幼保健计划生育服务中心, 孝感 432000)

摘要 以天然产物熊果酸为先导化合物, 将查耳酮通过酯化反应拼接到熊果酸衍生物得到10个熊果酸衍生物-查耳酮缀合物, 其结构均通过¹H NMR, ¹³C NMR和HRMS加以确认。初步的生物活性结果表明, 这些缀合物对CNE2、KB、MCF-7、A549和HepG2细胞均有抑制活性。特别是对MCF-7细胞的抑制活性强于熊果酸和临幊上应用的药物他莫昔芬, 其中化合物**11e** ($IC_{50} = 4.7 \mu\text{mol/L}$) 的抗乳腺癌活性最强, 是他莫昔芬 ($IC_{50} = 15.2 \mu\text{mol/L}$) 的近3倍; 同时, 这些缀合物对正常的MCF-10A和VERO细胞没有毒性, 安全性较他莫昔芬高。

关键词 熊果酸衍生物; 查耳酮缀合物; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号 R914.2 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)01-0031-11

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170105

引用本文 裴婷, 王玉英. 新型熊果酸衍生物与查耳酮缀合物的合成及其抗肿瘤活性初步评价 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1):31-41.

Cite this article as: PEI Ting, WANG Yuying. Synthesis and preliminary anti-tumor activity of novel ursolic acid derivative-chalcone conjugates [J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(1):31-41.

Synthesis and preliminary anti-tumor activity of novel ursolic acid derivative-chalcone conjugates

PEI Ting^{1*}, WANG Yuying²

¹Department of Medicine, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, 430014; ²Maternal and Child Health Care Family Planning Service Center of Xiaonan, Xiaogan, 432000, China

Abstract Ten novel conjugates with ursolic acid core and different chalcone ligands were synthesized via esterification using the natural ursolic acid as starting material. The structures of these conjugates were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. The preliminary biological results showed that these compounds displayed significant antiproliferative effect on CNE2, KB, MCF-7, A549 and HepG2 cells. These compounds were more effective than ursolic acid and tamoxifen against MCF-7 cells. Specifically, compound **11e** ($IC_{50} = 4.7 \mu\text{mol/L}$) showed the greatest potency against MCF-7, which was about 3-times more potent than tamoxifen ($IC_{50} = 15.2 \mu\text{mol/L}$). Additionally, all conjugates were nontoxic to health MCF-10A and VERO cells, and had higher security than tamoxifen.

Key words ursolic acid derivative-chalcone conjugates; synthesis; anti-tumor activity

熊果酸(ursolic acid, UA, 图1)化学名3 β -羟基-熊果-12-烯-28-酸(3 β -hydroxyurs-12-en-28-oic acid), 是一种以游离或糖苷的形式广泛分布在山楂等^[1]植物中的五环三萜类化合物, 具有抗肿瘤^[2-3]、抗

炎^[4-5]、降血糖^[6-7]等多种药理学活性, 特别是抗肿瘤活性受到学者的重视^[8-9]。熊果酸不仅能够抑制多种肿瘤细胞的形成、增殖, 而且还可以诱导肿瘤的分化及凋亡, 有望成为一类高效低毒的天然

新型抗肿瘤药物。然而,由于熊果酸自身作用较弱,加上生物利用度低,限制了其在临床上的应用。因此,对熊果酸进行结构修饰以期得到抗肿瘤活性更高的衍生物有着重要的意义。

近年来,查耳酮(chalcone,图1)作为一类重要的天然产物也表现出了广阔的发展前景,对其生物活性方面的研究也极为活跃。由于其结构具有较好的柔性,能与多种受体结合,呈现出多种药理活性;同时,作为植物体内黄酮合成的前体,查耳酮本身也具有多种生物活性如抗肿瘤^[10]、抗真菌^[11–12]、抗溃疡^[13]、抗氧化^[14]等。特别是其抗肿瘤活性被广泛的研究,而且对正常细胞基本没有毒性。因此,改善或者提高查耳酮的抗肿瘤活性以期得到高活性的新查耳酮衍生物现已成为抗肿瘤药物研究的一个热点^[15–16]。

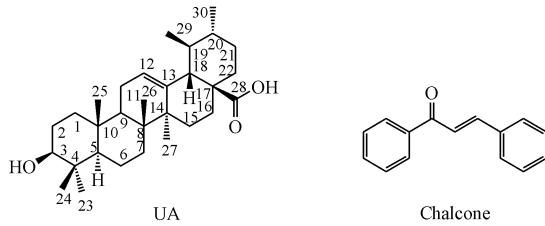


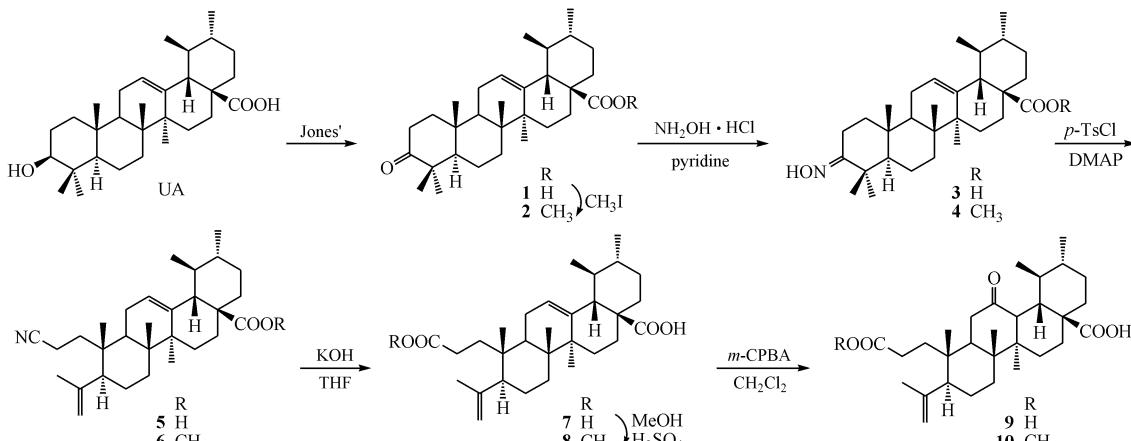
Figure 1 Structures of ursolic acid(UA) and chalcone

基于熊果酸和查耳酮展现出较强的抗肿瘤活性,根据活性亚结构拼接和活性叠加原理,合成熊果酸与查耳酮缀合物,以期望得到抗肿瘤活性更强、毒性更低的新化合物。参考熊果酸结构改造的经验发现,将熊果酸的A环开环后能够提高抗肿瘤活性^[17]。因此,首先对熊果酸的A环进行修饰,合成了一系列的开环化合物(合成路线1)。随后,

筛选了这些熊果酸衍生物对鼻咽鳞癌 CNE2 细胞、口腔表皮样癌 KB 细胞、乳腺癌 MCF-7、肺腺癌 A549 细胞和肝癌 HepG2 细胞的抗肿瘤活性发现,熊果酸衍生物 5 和 10 展现出了良好的抗肿瘤活性。因此,将熊果酸衍生物 5 和 10 作为先导化合物,通过经典的酯化反应将查耳酮拼接到熊果酸衍生物 5 和 10,得到了两个系列的熊果酸衍生物-查耳酮缀合物(合成路线 2~3)。

1 合成路线

目标化合物 11a~11e 和 12a~12e 的合成过程见路线 1~3。以熊果酸为起始原料,与琼斯试剂(Jones')反应,制得 3-羧基熊果酸 1,再用碘甲烷将化合物 1 的 C28 位羧基酯化(化合物 2)、盐酸氢肟把化合物 1 和 2 的 C3 位羧基转化成肟酸(化合物 3 和 4),接着与对甲苯磺酰氯和 4-二氨基甲基吡啶反应,得到了含氰基的开环化合物(5 或 6),进一步用 KOH 把氰基水解成羧基(化合物 7)。然后,化合物 7 在 H₂SO₄ 的催化下与甲醇反应得到了化合物 8,接着用间氯过氧苯甲酸(*m*-CPBA)将化合物 7 和 8 的 C11 位双键氧化成羧基,得到了重要的熊果酸中间体 9 和 10。另一方面,以对羟基苯乙酮和芳醛为原料,通过经典的 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成了羟基查耳酮 Cha 1~7(路线 2)。最后,熊果酸衍生物在 4-二氨基甲基吡啶(DMAP)和二环己基碳二亚胺(DCC)的作用下与查耳酮缩合得到了目标化合物 11a~11e 和 12a~12e。



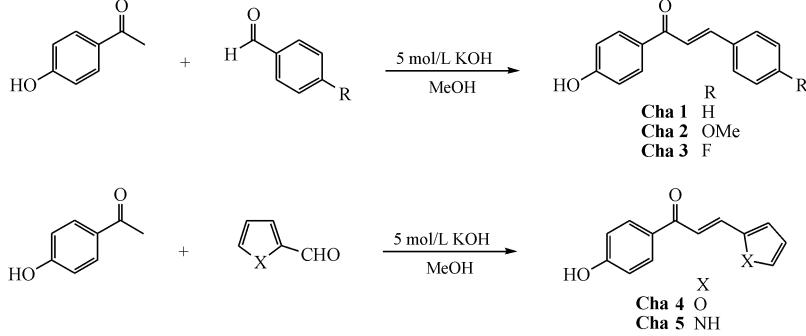
Scheme 1 Synthetic route of ursolic acid derivatives 1-10

2 实验部分

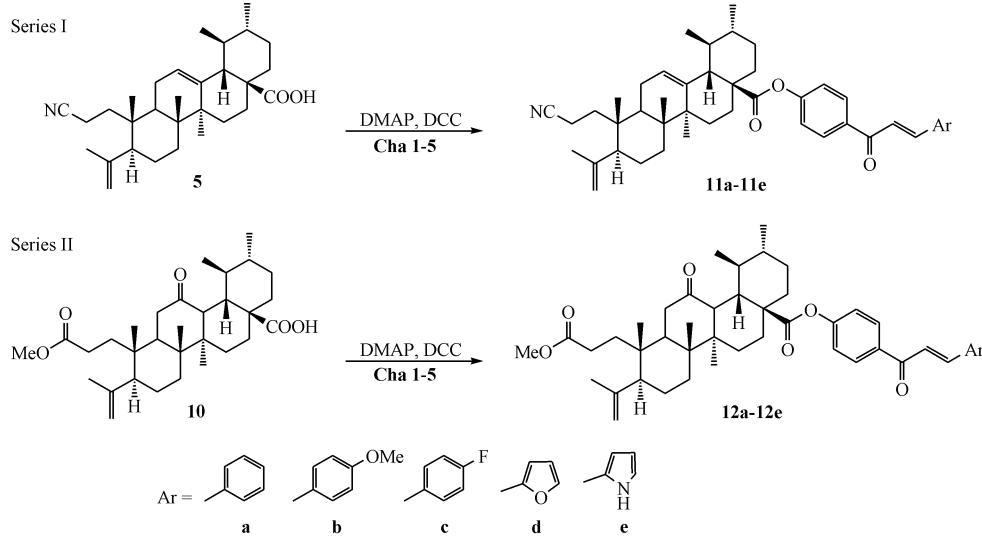
2.1 仪器及试剂

BrukerAM-400 Hz型核磁共振仪(TMS内标);ELx800通用酶标仪(美国Bio-Tek公司)。熊果酸(含量>99%,西安高远生化有限责任公司);合成使用的其他试剂均为市售分析纯(质量

分数≥99%);GF₂₅₄硅胶薄层板,200~300目柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂);水为蒸馏水;DMEM培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;鼻咽鳞癌CNE2细胞、口腔表皮样癌KB细胞、乳腺癌MCF-7、肺腺癌A549细胞和肝癌HepG2细胞株购自武汉大学细胞典藏中心,本实验室冻存使用。



Scheme 2 Synthetic route of chalcone derivatives Cha 1-5



Scheme 3 Synthetic route of quinoxaline ursolic acid-chalcone conjugates 11-12

2.2 合成部分

3-羧基熊果酸(1)的合成 将熊果酸(10.001 g,21.9 mmol)溶解在四氢呋喃(40 mL)溶解中,0℃下向反应液中缓慢滴加新配制的琼斯试剂(10 mL),于0℃下继续反应1 h,减压除去溶剂,残留物用二氯甲烷(100 mL)溶解,饱和NaCl溶液(30 mL)洗涤,有机层用无水Na₂SO₄干燥,减压除去溶剂,经柱色谱纯化(石油醚-乙酸乙酯,1:1)得到白色固体化合物1 9.751 g,产率97.9%,mp:173~175℃(文献值^[18]:172℃);¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ:5.40(1H,s,H-12),2.99(1H,dd,J=4.0

Hz,J'=13.6 Hz,H-18),1.26(3H,s,CH₃) 1.16(3H,s,CH₃),1.10(3H,s,CH₃),1.05(3H,s,CH₃),0.94(3H,s,CH₃),0.92(3H,s,CH₃),0.86(3H,s,CH₃)。

3-羧基熊果酸甲酯(2)的合成 将3-羧基熊果酸1(3.591 g,7.9 mmol)、KOH(0.442 g,7.9 mmol)和CH₃I(1.150 g,8.1 mmol)依次加入到四氢呋喃(35 mL)中,然后将反应体系加热至回流,反应3 h,将反应液冷却至室温,过滤,减压除去溶剂,经柱色谱纯化(石油醚-乙酸乙酯,1:1)得白色油状物2 3.517 g,产率95.0%。¹H NMR(400 MHz,

CDCl_3) δ : 5.41 (1H, s, H-12), 3.74 (3H, s, -OMe), 2.98 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.24 (3H, s, CH₃), 1.19 (3H, s, CH₃), 1.15 (6H, s, 2CH₃), 1.03 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃)。

3-羟肟酸熊果酸(3)的合成 将3-羧基熊果酸**1**(2.364 g, 5.2 mmol)和盐酸羟胺(0.792 g, 11.4 mmol)溶解到吡啶(25 mL)中,然后加热至回流,反应6 h,将反应液冷却至室温后倾入冰水150 mL中,用浓盐酸调节pH至3,析出的黄色固体过滤,然后用丙酮将滤饼洗至白色,干燥后即得到3-肟酸熊果酸类化合物。产率72.4%,mp: 186~189 °C(文献值^[18]: 188 °C); ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.15 (1H, s, -COOH), 10.21 (1H, s, N-OH), 5.42 (1H, s, H-12), 2.99 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.27 (3H, s, CH₃), 1.20 (3H, s, CH₃), 1.17 (3H, s, CH₃), 1.01 (3H, s, CH₃), 0.96 (3H, s, CH₃), 0.96 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃)。

3-羟肟酸熊果酸甲酯(4)的合成 参照化合物**3**的制备方法,由3-羧基熊果酸甲酯**2**代替3-羧基熊果酸**1**制备得白色固体**4**。产率75.2%,mp: 162~164 °C; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.26 (1H, s, -COOH), 10.34 (1H, s, N-OH), 5.41 (1H, s, H-12), 3.72 (3H, s, -OMe), 2.96 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.25 (3H, s, CH₃), 1.18 (3H, s, CH₃), 1.02 (3H, s, CH₃), 0.97 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃), 0.86 (3H, s, CH₃)。

3-氯基-4-烯-开环熊果酸(5)的合成 将3-羟肟酸熊果酸**3**(2.165 g, 4.6 mmol)、对甲苯磺酰氯(*p*-TsCl, 0.877 g, 4.6 mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP, 62 mg, 0.5 mmol)依次加入到吡啶(20 mL)中,然后将反应液加热至回流,反应20 h,将反应液冷却至室温后倾入冰水100 mL中,析出的白色固体过滤、干燥后用柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇,32:1),即得到白色固体**5**。产率46.3%,mp: 131~133 °C(文献值^[18]: 130 °C); ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.41 (1H, s, H-12), 4.91 (1H, s, H-24), 4.66 (1H, s, H-24), 2.97 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.73 (3H, s, CH₃), 1.25 (3H, s, CH₃), 1.05 (3H, s, CH₃), 1.02

(3H, s, CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 0.90 (3H, s, CH₃)。

3-氯基-4-烯-开环熊果酸甲酯(6)的合成 参照化合物**5**的制备方法,由3-羟肟酸熊果酸甲酯**4**代替3-羟肟酸熊果酸**3**制备得白色固体**6**。产率51.7%,mp: 120~123 °C; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.39 (1H, s, H-12), 4.90 (1H, s, H-24), 4.63 (1H, s, H-24), 3.67 (3H, s, -OMe), 2.98 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.72 (3H, s, CH₃), 1.21 (3H, s, CH₃), 1.12 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.97 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃)。

3-羧基-4-烯-开环熊果酸(7)的合成 将3-氯基-4-烯-开环熊果酸**5**或3-氯基-4-烯-开环熊果酸甲酯**6**(3.3 mmol)和30%氢氧化钾水溶液(20 mL)依次加入到四氢呋喃(5 mL)中,然后加热至回流,反应24 h,将反应液冷却至室温,用乙酸乙酯萃取(25 mL×3),有机层用无水硫酸钠干燥,减压除去溶剂,经柱色谱(二氯甲烷-甲醇,18:1)得到白色固体。以化合物**5**为原料,产率88.6%;以化合物**6**为原料,产率62.4%,mp: 126~128 °C; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.39 (1H, s, H-12), 4.90 (1H, s, H-24), 4.63 (1H, s, H-24), 2.99 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.75 (3H, s, CH₃), 1.24 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.92 (3H, s, CH₃)。

3-甲酯基-4-烯-开环熊果酸(8)的合成 将3-羧基-4-烯-开环熊果酸**7**(1.459 g, 3.1 mmol)溶解到甲醇(25 mL)中,然后向反应液中滴加3滴浓硫酸,于25 °C下反应72 h,减压除去溶剂,经柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇,30:1)得到白色固体1.158 g。产率77.1%,mp: 122~124 °C; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 5.43 (1H, s, H-12), 4.89 (1H, s, H-24), 4.66 (1H, s, H-24), 3.69 (3H, s, -OMe), 2.99 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.72 (3H, s, CH₃), 1.24 (3H, s, CH₃), 1.07 (3H, s, CH₃), 0.97 (3H, s, CH₃), 0.92 (3H, s, CH₃), 0.88 (3H, s, CH₃)。

12-羧基-3-羧基-4-烯-开环熊果酸(9)的合成 氩气保护下,将3-羧基-4-烯-开环熊果酸**7**(1.223 g, 2.6 mmol)、间氯过氧苯甲酸(*m*-CPBA, 1.346 g, 7.8 mmol)和NaHCO₃(1.117 g, 13.3

mmol)依次加入到 CH_2Cl_2 (30 mL) 中,于 25 ℃ 下反应 16 h,饱和 NaCl 溶液(30 mL)洗涤,有机层用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,经柱色谱纯化(二氯甲烷-甲醇,30:1)得到白色固体。产率 69.4%, mp: 116 ~ 119 ℃; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.87 (1H, s, H-24), 4.67 (1H, s, H-24), 2.89 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.73 (3H, s, CH_3), 1.24 (3H, s, CH_3), 0.99 (3H, s, CH_3), 0.96 (3H, s, CH_3), 0.89 (3H, s, CH_3), 0.84 (3H, s, CH_3)。

12-羧基-3-羧基-4-烯-开环熊果酸甲酯(10) 的合成 参照化合物 **9** 的制备方法,由 3-甲酯基-4-烯-开环熊果酸 **8** 代替 3-羧基-4-烯-开环熊果酸 **7** 制备得白色固体 **10**。产率 68.8%, mp: 112 ~ 114 ℃; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.89 (1H, s, H-24), 4.66 (1H, s, H-24), 3.67 (3H, s, -OMe), 2.90 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.4 Hz, H-18), 1.71 (3H, s, CH_3), 1.18 (3H, s, CH_3), 1.03 (3H, s, CH_3), 0.99 (3H, s, CH_3), 0.95 (3H, s, CH_3), 0.92 (3H, s, CH_3)。

查耳酮(Cha 1 ~ 5) 的合成 氩气保护下,将酮(10.1 mmol)和相应的醛(10.1 mmol)溶解到甲醇(20 mL)中,于 0 ℃ 下加入 KOH (2.828 g, 50.5 mmol),搅拌 10 min 后将反应温度升至 25 ℃,反应 12 h,用 2 mol/L 的稀盐酸调节反应液的 pH 3,析出的黄色固体过滤干燥后即得到查耳酮 **Cha 1 ~ 5**。

1-(4-羟基苯基)-3-苯基-2-丙烯酮(**Cha 1**)

黄色固体,产率 32.4%, mp: 91 ~ 94 ℃; ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 8.01 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.76 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.57 (1H, m), 7.52 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.42 (3H, m), 6.99 (2H, d, J = 8.4 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ : 188.78, 164.52, 141.69, 134.65, 131.25, 130.16, 130.07, 128.96, 128.42, 121.81, 114.37。

1-(4-羟基苯基)-3-(4-甲氧基苯基)-2-丙烯酮(**Cha 2**)

黄色固体,产率 24.6%, mp: 102 ~ 104 ℃; ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H, -OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ :

188.71, 163.82, 144.05, 134.88, 131.12, 129.86, 129.39, 128.42, 128.42, 121.81, 113.88, 55.47。

1-(4-羟基苯基)-3-(4-氟苯基)-2-丙烯酮(Cha 3**)** 黄色固体,产率 21.3%, mp: 86 ~ 89 ℃; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.07 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.88 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.83 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.69 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.46 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.00 (2H, d, J = 8.4 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ : 187.85, 164.04, 141.95, 136.13, 135.21, 131.96, 131.51, 130.90, 130.28, 129.88, 123.75, 116.48, 116.13。

1-(4-羟基苯基)-3-呋喃基-2-丙烯酮(Cha 4**)** 黄色固体,产率 27.8%, mp: 99 ~ 102 ℃; ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.86 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.74 (1H, d, J = 1.6 Hz), 7.71 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.53 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.41 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.32 (1H, d, J = 4.0 Hz), 6.74 (1H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ : 188.84, 163.72, 161.86, 143.77, 132.27, 131.73, 131.31, 128.24, 119.68, 116.39, 116.45。

1-(4-羟基苯基)-3-吡咯基-2-丙烯酮(Cha 5**)** 黄色固体,产率 30.6%, mp: 104 ~ 106 ℃; ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 11.18 (1H, s, -NH-), 9.01 (1H, s, -OH), 7.73 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.67 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.51 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.30 (1H, m), 7.22 (1H, m), 6.92 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.31 (1H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, Acetone- d_6) δ : 179.32, 160.48, 142.38, 134.45, 131.26, 127.82, 126.39, 120.43, 117.08, 116.75, 111.12。

熊果酸-查耳酮缀合物(**11 ~ 12**)的合成

氩气保护下,将熊果酸衍生物 **5** 或 **10** (0.45 mmol) 和查耳酮 **Cha 1 ~ 5** (0.5 mmol) 溶解到无水二氯甲烷(10 mL)中,于 0 ℃ 下加入向反应液中加入 DMAP (0.1 mmol) 和 DCC (0.1 mmol), 搅拌 10 min 后将反应温度升至 25 ℃, 反应 24 h, 然后向反应液加入 30 mL 的水, 用二氯甲烷(20 mL × 3)萃取, 有机层用无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 经硅胶柱纯化(石油醚-乙酸乙酯, 2:1 ~ 1:1)得到目标缀合物 **11 ~ 12**。

缀合物 11a 白色固体,产率 72.2%, mp: 121 ~ 124 ℃; IR (KBr, ν): 2 266, 1 752, 1 677 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.06 (1H, d, J = 8.4

Hz), 7.82(1H, d, J = 16.0 Hz), 7.64(2H, t, J = 7.2 Hz), 7.52(1H, d, J = 16.4 Hz), 7.42(3H, t, J = 7.6 Hz), 7.17(2H, d, J = 8.0 Hz), 5.38(1H, s, H-12), 4.90(1H, s, H-24), 4.66(1H, s, H-24), 2.99(1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.74(3H, s, CH₃), 1.21(3H, s, CH₃), 0.98(3H, s, CH₃), 0.95(3H, s, CH₃), 0.93(3H, s, CH₃), 0.90(3H, s, CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 189.73, 176.13, 155.12, 147.16, 145.43, 143.81, 135.92, 135.20, 131.05, 129.40, 128.89, 128.71, 122.74, 122.23, 120.60, 114.64, 51.06, 47.70, 46.03, 42.73, 41.94, 39.88, 39.69, 38.24, 34.77, 34.23, 33.45, 32.68, 31.82, 31.15, 30.11, 28.16, 26.08, 24.52, 24.12, 23.99, 23.40, 19.50, 17.92, 11.96; ESI-MS Calcd. for C₄₅H₅₆NO₃[M + H]⁺, 658.4260; Found 658.4265。

缓合物 11b 白色固体,产率78.5%,mp:118~120 °C; IR(KBr, ν): 2 271, 1 742, 1 686 cm⁻¹; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.04(2H, d, J = 8.4 Hz), 7.80(1H, d, J = 16.4 Hz), 7.61(2H, d, J = 8.0 Hz), 7.40(1H, d, J = 15.6 Hz), 7.16(2H, d, J = 7.6 Hz), 6.95(2H, d, J = 8.8 Hz), 5.38(1H, s, H-12), 4.90(1H, s, H-24), 4.66(1H, s, H-24), 3.85(3H, s, -OMe), 2.99(1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.74(3H, s, CH₃), 1.25(3H, s, CH₃), 0.98(3H, s, CH₃), 0.95(3H, s, CH₃), 0.93(3H, s, CH₃), 0.90(3H, s, CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 189.34, 175.71, 161.71, 154.48, 146.72, 144.86, 143.38, 135.79, 130.23, 129.92, 127.49, 122.28, 121.69, 120.15, 119.46, 114.40, 114.18, 55.39, 50.64, 47.24, 45.59, 42.28, 41.49, 39.43, 39.24, 37.80, 34.34, 33.79, 33.00, 32.23, 31.38, 30.70, 27.71, 25.63, 24.07, 23.67, 23.53, 22.95, 19.05, 17.47, 11.52; ESI-MS Calcd. for C₄₆H₅₈NO₄[M + H]⁺, 688.4366; Found 688.4369。

缓合物 11c 白色固体,产率79.4%,mp:123~125 °C; IR(KBr, ν): 2 236, 1 761, 1 645 cm⁻¹; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.02(2H, d, J = 8.4 Hz), 7.81(1H, d, J = 16.4 Hz), 7.66(2H, d, J = 8.4 Hz), 7.58(1H, d, J = 7.6 Hz), 7.50(1H, d, J = 15.6 Hz), 7.47(1H, d, J = 8.0 Hz), 7.09(2H, d, J = 8.4 Hz), 5.37(1H, s, H-12), 4.90(1H, s, H-

24), 4.66(1H, s, H-24), 2.99(1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.74(3H, s, CH₃), 1.20(3H, s, CH₃), 0.98(3H, s, CH₃), 0.95(3H, s, CH₃), 0.93(3H, s, CH₃), 0.90(3H, s, CH₃); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 190.32, 175.86, 152.79, 146.71, 143.78, 143.39, 138.10, 132.82, 132.29, 129.53, 128.62, 128.47, 122.24, 122.17, 121.91, 120.17, 114.20, 50.69, 47.18, 45.94, 42.27, 41.48, 39.42, 39.23, 37.77, 34.32, 33.79, 33.03, 32.25, 31.38, 30.71, 27.70, 25.64, 24.07, 23.67, 23.61, 23.55, 22.97, 19.07, 17.48, 11.52; ESI-MS m/z 676.4166[M + H]⁺(Calcd. for C₄₅H₅₅FNO₃, 676.4169)。

缓合物 11d 白色固体,产率74.5%,mp:117~119 °C; IR(KBr, ν): 2 236, 1 752, 1 684 cm⁻¹; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.06(2H, d, J = 8.4 Hz), 7.61(1H, d, J = 16.0 Hz), 7.53(1H, s), 7.40(1H, d, J = 16.0 Hz), 7.14(2H, d, J = 8.0 Hz), 6.72(1H, t, J = 3.6 Hz), 6.52(1H, d, J = 1.6 Hz), 5.38(1H, s, H-12), 4.90(1H, s, H-24), 4.66(1H, s, H-24), 2.98(1H, dd, J ₁ = 3.6 Hz, J ₂ = 14.0 Hz, H-18), 1.73(3H, s, Me), 1.24(3H, s, Me), 1.20(3H, s, Me), 0.98(3H, s, Me), 0.94(3H, s, Me), 0.89(3H, s, Me); ¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 188.60, 175.68, 154.65, 151.54, 146.72, 144.99, 143.36, 135.41, 130.84, 129.96, 122.28, 121.75, 118.92, 116.47, 112.71, 50.60, 47.23, 45.57, 42.27, 41.48, 39.42, 39.22, 37.77, 34.31, 33.77, 33.01, 32.21, 31.36, 30.70, 29.66, 27.70, 25.63, 24.05, 23.66, 23.53, 22.95, 19.06, 17.46, 15.51, 11.51; ESI-MS m/z 648.4053[M + H]⁺(Calcd. for C₄₃H₅₄NO₄, 648.4058)。

缓合物 11e 白色固体,产率81.7%,mp:123~126 °C; IR(KBr, ν): 2 245, 1 779, 1 647 cm⁻¹; ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.01(2H, d, J = 8.8 Hz), 7.95(1H, d, J = 15.6 Hz), 7.41(2H, d, J = 5.2 Hz), 7.36(1H, d, J = 3.6 Hz), 7.31(1H, d, J = 16.4 Hz), 7.16(2H, d, J = 8.8 Hz), 7.08(1H, t, J = 4.0 Hz), 5.38(1H, s, H-12), 4.90(1H, s, H-24), 4.65(1H, s, H-24), 2.98(1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.73(3H, s, CH₃), 1.20(3H, s, CH₃), 0.98(3H, s, CH₃), 0.94(3H, s, CH₃),

0.93 (3H, s, CH₃) , 0.90 (3H, s, CH₃) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 188.61, 175.65, 154.64, 146.71, 143.36, 140.25, 137.35, 135.39, 132.18, 129.91, 128.91, 128.37, 122.28, 121.77, 120.46, 120.15, 114.18, 50.61, 47.24, 45.58, 42.27, 41.49, 39.42, 39.23, 37.79, 34.33, 33.78, 33.01, 33.22, 30.70, 29.66, 27.71, 25.63, 24.06, 23.67, 23.54, 22.95, 19.05, 17.47, 15.51; ESI-MS m/z 647.4213 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₃H₅₅N₂O₃, 647.4218)。

缀合物 12a 白色固体,产率 83.3%,mp:127 ~ 130 °C; IR (KBr, ν): 1761, 1657 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.81 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.67 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.48 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.27 (2H, t, J = 8.0 Hz), 7.24 (1H, t, J = 7.6 Hz), 7.15 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.92 (1H, s, H-24), 4.74 (1H, s, H-24), 3.69 (3H, s, -OMe), 2.84 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.72 (3H, s, CH₃), 1.20 (3H, s, CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.91 (3H, s, CH₃), 0.87 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 209.22, 194.36, 179.84, 176.86, 162.87, 156.78, 147.77, 147.63, 136.80, 133.51, 132.61, 132.45, 129.07, 126.33, 126.15, 125.98, 57.38, 52.37, 51.27, 49.46, 48.51, 46.10, 45.69, 45.42, 44.15, 43.38, 37.59, 36.94, 36.45, 35.34, 34.63, 31.73, 29.69, 27.51, 27.32, 26.93, 25.60, 22.57, 21.60; ESI-MS m/z 647.4213 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₃H₅₅N₂O₃, 647.4217)。

缀合物 12b 白色固体,产率 75.6%,mp:116 ~ 119 °C; IR (KBr, ν): 1779, 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.00 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.74 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.54 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.36 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.87 (2H, d, J = 8.0 Hz), 4.87 (1H, s, H-24), 4.69 (1H, s, H-24), 3.77 (3H, s, -OMe), 3.63 (3H, s, -OMe), 2.78 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.72 (3H, s, CH₃), 0.97 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.93 (3H, s, CH₃), 0.86 (3H, s, CH₃), 0.84 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 210.79, 188.79, 178.02, 171.13, 161.46, 153.73, 146.23, 144.55, 135.65, 130.04,

129.71, 127.21, 121.44, 119.06, 114.17, 113.93, 55.12, 51.60, 51.53, 49.84, 46.98, 42.22, 40.76, 40.51, 38.68, 38.48, 35.99, 34.14, 33.16, 32.90, 32.63, 31.71, 30.37, 30.01, 28.09, 27.33, 24.12, 22.99, 22.95, 22.46, 20.18, 18.82, 15.63; ESI-MS m/z 737.983 0 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₇H₆₁O₇, 737.9834)。

缀合物 12c 白色固体,产率:70.6%,mp:126 ~ 128 °C; IR (KBr, ν): 1746, 1675 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.07 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.84 (1H, d, J = 16.0 Hz), 7.65 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.53 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.42 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.23 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.92 (1H, s, H-24), 4.74 (1H, s, H-24), 3.69 (3H, s, -OMe), 2.81 (1H, dd, J = 4.0 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.73 (3H, s, CH₃), 1.04 (3H, s, CH₃), 1.01 (3H, s, CH₃), 0.99 (3H, s, CH₃), 0.91 (6H, s, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 217.61, 188.39, 175.68, 173.60, 155.15, 148.56, 143.16, 141.63, 140.92, 134.79, 130.15, 128.91, 125.44, 124.20, 122.79, 122.02, 55.27, 47.40, 47.34, 46.79, 45.65, 41.93, 41.52, 39.46, 39.12, 36.72, 34.10, 33.77, 33.00, 32.30, 32.27, 30.70, 29.65, 27.77, 26.41, 25.69, 23.54, 23.03, 21.45, 19.54, 17.31, 15.03; ESI-MS m/z 725.4217 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₆H₅₈FO₆, 725.4223)。

缀合物 12d 白色固体,产率 76.3%,mp:116 ~ 119 °C; IR (KBr, ν): 1763, 1652 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.02 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.57 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.50 (1H, s), 7.42 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.19 (2H, d, J = 7.6 Hz), 6.70 (1H, d, J = 2.4 Hz), 6.68 (1H, d, J = 3.2 Hz), 4.89 (1H, s, H-24), 4.71 (1H, s, H-24), 3.66 (3H, s, -OMe), 2.80 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 14.0 Hz, H-18), 1.74 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.98 (3H, s, CH₃), 0.95 (3H, s, CH₃), 0.87 (6H, s, 2CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 211.02, 188.38, 178.20, 171.26, 153.99, 151.43, 146.40, 144.91, 135.45, 130.71, 129.87, 121.61, 118.79, 116.34, 114.04, 112.60, 51.74, 51.69, 50.02, 47.13, 42.36, 40.90, 40.65, 38.81, 38.61, 36.12, 34.27, 33.26, 33.01, 32.75, 31.82, 30.50, 30.16, 28.22, 27.45,

24.25, 23.10, 23.05, 22.57, 20.31, 18.95, 15.77; ESI-MS m/z 697.410 4 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₄H₅₇O₇, 697.410 8)。

缓合物 12e 白色的固体, 产率 71.9%, mp: 112 ~ 115 °C; IR (KBr, ν): 1781, 1646 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.04 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.95 (1H, d, J = 15.4 Hz), 7.42 (1H, d, J = 4.0 Hz), 7.42 (1H, d, J = 2.4 Hz), 7.31 (1H, d, J = 16.4 Hz), 7.22 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.08 (1H, m), 4.91 (1H, s, H-24), 4.73 (1H, s, H-24), 3.68 (3H, s, -OMe), 2.82 (1H, dd, J = 3.6 Hz, J' = 13.6 Hz, H-18), 1.77 (3H, s, CH₃), 1.02 (3H, s, CH₃), 1.00 (3H, s, CH₃), 0.98 (3H, s, CH₃), 0.90 (6H, s, 2 CH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 211.10, 188.61, 178.32, 171.36, 154.08, 146.52, 140.26, 137.38, 135.55, 132.19, 129.95, 128.92, 128.35, 122.73, 120.43, 114.14, 51.84, 51.81, 50.15, 47.25, 42.47, 41.01, 40.77, 38.92, 38.73, 36.23, 34.38, 33.36, 33.11, 32.86, 31.92, 30.61, 30.28, 28.34, 27.56,

24.25, 24.36, 23.19, 23.15, 22.68, 20.42, 19.05, 15.88; ESI-MS m/z 696.934 4 [M + H]⁺ (Calcd. for C₄₄H₅₈NO₆, 696.934 9)。

3 抗肿瘤活性测试

选取鼻咽鳞癌 CNE2 细胞、口腔表皮样癌 KB 细胞、乳腺癌 MCF-7、肺腺癌 A549 细胞和肝癌 HepG2 细胞为测试细胞株, 以他莫昔芬为阳性对照药, 采用 MTT 法对合成的查耳酮类化合物进行抗肿瘤活性评价。取对数生长期的测试细胞株悬浮于含 10% 胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基中, 铺至 96 孔细胞培养板中。待细胞完全贴壁后, 弃去原培养液, 加入含有测试药物的培养液 100 μL 培养 3 d 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 30 μL, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h, 然后每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 100 μL 溶解。使用酶标仪在 490 nm 波长测定每孔的吸收度, 分析实验结果, 并计算出 IC₅₀, 结果见表 1。

Table 1 Whole cell antiproliferative activity of target compounds ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Entry	Compd.	IC ₅₀ /(μmol/L)				
		CNE2	KB	MCF-7	A549	HepG2
1	1	34.9 ± 1.22	78.2 ± 0.93	60.4 ± 3.16	50.7 ± 1.63	32.1 ± 2.27
2	2	36.4 ± 2.56	62.5 ± 1.45	57.3 ± 3.68	33.4 ± 2.44	67.3 ± 4.28
3	3	28.1 ± 3.12	34.1 ± 5.34	31.8 ± 2.12	28.2 ± 0.68	21.6 ± 1.44
4	4	32.6 ± 1.79	44.1 ± 5.37	23.6 ± 2.57	41.6 ± 2.82	20.4 ± 1.15
5	5	22.4 ± 0.86	17.4 ± 1.46	16.2 ± 1.53	27.7 ± 2.41	29.4 ± 0.97
6	6	26.7 ± 1.15	23.4 ± 2.5	21.5 ± 2.96	47.2 ± 3.23	43.5 ± 2.71
7	7	28.2 ± 2.93	26.9 ± 1.38	27.8 ± 2.46	29.1 ± 2.38	34.7 ± 2.55
8	8	47.4 ± 4.28	30.2 ± 1.36	41.4 ± 0.89	22.5 ± 1.93	45.8 ± 3.22
9	9	32.7 ± 2.46	28.3 ± 2.27	23.6 ± 1.17	61.5 ± 5.26	20.8 ± 1.16
10	10	25.1 ± 1.52	20.4 ± 3.22	18.9 ± 2.36	28.8 ± 4.75	21.5 ± 0.84
11	11a	14.9 ± 1.36	27.8 ± 0.35	12.4 ± 0.74	20.6 ± 1.22	22.3 ± 1.67
12	11b	17.3 ± 4.72	16.4 ± 1.77	13.9 ± 2.93	17.8 ± 1.56	16.8 ± 2.38
13	11c	11.7 ± 2.45	19.1 ± 1.26	7.8 ± 1.12	7.1 ± 0.74	10.7 ± 1.44
14	11d	15.9 ± 2.52	22.5 ± 2.49	5.9 ± 1.57	10.2 ± 2.41	11.3 ± 2.27
15	11e	10.7 ± 2.19	21.9 ± 2.27	4.7 ± 0.85	17.8 ± 2.76	9.4 ± 2.12
16	12a	8.5 ± 0.56	28.8 ± 3.52	12.8 ± 1.64	21.2 ± 2.13	25.9 ± 1.17
17	12b	16.7 ± 0.97	17.4 ± 4.67	11.5 ± 1.23	25.4 ± 3.68	11.1 ± 0.78
18	12c	9.8 ± 1.15	21.7 ± 3.25	9.9 ± 0.87	19.9 ± 2.76	16.1 ± 1.65
19	12d	18.3 ± 2.39	15.7 ± 2.58	6.6 ± 2.92	9.7 ± 1.48	21.4 ± 2.88
20	12e	14.1 ± 1.35	20.3 ± 2.35	5.1 ± 2.35	11.7 ± 2.36	17.3 ± 2.35
21	Cha 1	21.4 ± 3.17	37.1 ± 3.73	51.4 ± 3.23	32.7 ± 2.72	36.7 ± 2.17
22	Cha 2	24.8 ± 1.48	19.3 ± 1.47	15.9 ± 1.67	27.4 ± 1.47	25.6 ± 1.18
23	Cha 3	25.4 ± 2.01	21.7 ± 2.26	32.1 ± 3.24	43.8 ± 2.88	18.2 ± 1.64
24	Cha 4	22.2 ± 1.87	27.1 ± 3.73	37.4 ± 2.92	38.1 ± 2.53	23.7 ± 2.15
25	Cha 5	27.9 ± 1.15	12.4 ± 0.94	21.8 ± 1.66	48.8 ± 3.69	11.6 ± 1.96
26	UA	31.6 ± 0.91	26.7 ± 1.15	34.4 ± 2.60	41.3 ± 2.15	24.3 ± 2.27

4 结果与讨论

4.1 合成

在构建熊果酸 A 环开环衍生物中,最初试图将中间体 **3** 通过 Beckmann 重排反应得到熊果酸 A 环为内酰胺这种扩环产物,再将内酰胺进行水解得到相应的开环产物。但是,在中间体 **3** 与对甲苯黄酰氯和 DMAP 在无水吡啶中回流 18 h 条件下却没有得到 Beckmann 重排产物,而是含氰基的开环化合物 **5**。这可能是由于熊果酸 4 位上 2 个甲基具有较大的空间位阻,而甲基上的氢更容易与对甲苯黄酰氯中的氯离子结合而离去形成了含氰基的非 Beckmann 重排产物,其反应机制可能如图 2 所示^[19]。

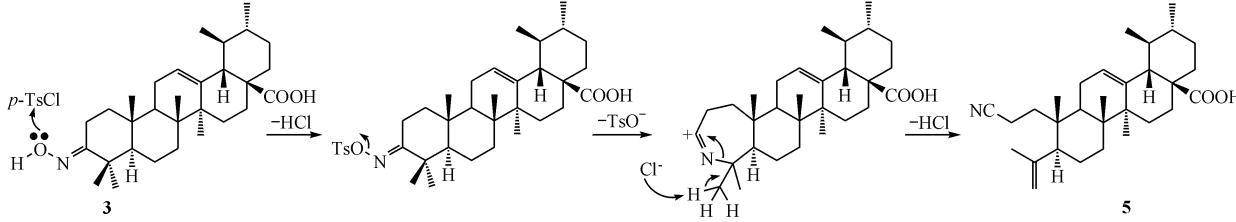


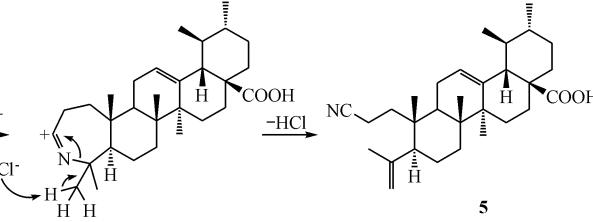
Figure 2 Possible reaction mechanism of 2-cyano-2,3-seco-4-yliden-olean-12-enioic-acid (5)

4.2 抗肿瘤活性

表 1 显示,将熊果酸 C3 位-羟基氧化成羰基(化合物 **1**)后,抗肿瘤活性显著降低;进一步将对 3-羰基熊果酸 **1** 转化成 3-羰基熊果酸甲酯 **2** 后,其抗肿瘤活性并没有提高,甚至降低了对 CNE2 和 HepG2 细胞的抑制活性;但是,将化合物 **2~3** 的羰基转化成肟酸后(化合物 **3~4**)提高了对 CNE2、MCF-7 和 HepG2 这 3 种细胞的抑制活性。继续将肟酸化合物 **3~4** 发生重排反应得到的开环化合物 **5~6** 后仍然能够保留其抗肿瘤活性,尤其是开环化合物 **5** 对这 5 种细胞均有较强的抑制活性,而将化合物 **5** 的氨基水解成羧基后(化合物 **7**),其抗肿瘤活性却略有降低;然而,将化合物 **7** 的 C3 位羧基用甲醇酯化后(化合物 **8**),抗肿瘤活性显著降低;但将化合物 **7** 和 **8** 的 C12 位双键氧化成羰基后(化合物 **9~10**)却显著的提高了抗肿瘤活性,其中化合物 **10** 对这 5 种肿瘤细胞也展现出了较强的抑制活性。因此,选择抗肿瘤活性较强的中间 **5** 和 **10** 作为先导化合物进一步对其进行修饰。

随后,通过酯化反应将另一活性单元查耳酮拼接到熊果酸衍生物 **5** 和 **10** 的 C28 位得到了化合物 **11a~11e** 和 **12a~12e**。两个系列的缀合物对 5 种肿瘤细胞均有较强的抑制活性,并且大部分缀合物

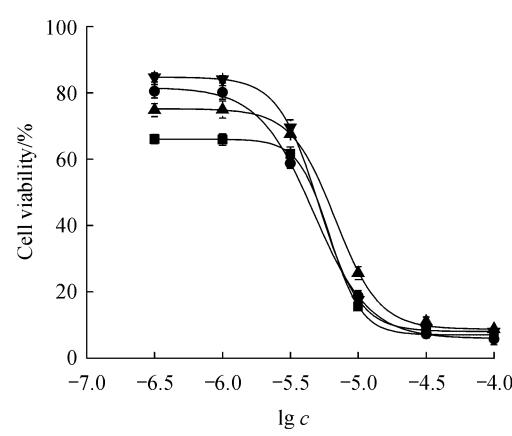
酰氯和 DMAP 在无水吡啶中回流 18 h 条件下却没有得到 Beckmann 重排产物,而是含氰基的开环化合物 **5**。这可能是由于熊果酸 4 位上 2 个甲基具有较大的空间位阻,而甲基上的氢更容易与对甲苯黄酰氯中的氯离子结合而离去形成了含氰基的非 Beckmann 重排产物,其反应机制可能如图 2 所示^[19]。



的抗肿瘤活性强于熊果酸及先导化合物 **5** 和 **10**,这些实验结果说明查耳酮是一个活性单元,将其拼接到母体化合物上能够增强母体化合物的抗肿瘤活性。查耳酮 **Cha 1~5** (entries 21 vs 25) 本身就展现出了抗肿瘤活性。但是与熊果酸衍生物 **5** 和 **10** 相比,大部分查耳酮的抗肿瘤活性仍然较弱,这说明缀合物的抗肿瘤活性主要是来于熊果酸衍生物,而查耳酮单元只是增强缀合物的活性并不是决定的因素。例如,在熊果酸衍生物 **1~10** 中,化合物 **5** 和 **10** 对乳腺癌 MCF-7 细胞有较强的抑制活性和选择性,同时其相应的缀合物 **11~12** (表 1) 也对 MCF-7 展现出了较强的抑制活性和选择性;但是查耳酮衍生物 (**Cha 1~5**) 却没有这种规律,如 **Cha 2** 对 **Cha 7** 的抑制活性强于 **Cha 1** 和 **Cha 3~5**,而对 MCF-7 有最强抑制活性的缀合物 **11** 却含有查耳酮 **Cha 5** 单元。事实上,缀合物中查耳酮单元对活性影响较大,其中含有杂环类查耳酮单元的缀合物 **11d~11e** 和 **12d~12e** 对 MCF-7 的抑制活性强于含苯环类查耳酮单元的缀合物 **11a~11c** 和 **12a~12c** (表 2);同时,这 4 个含杂环类查耳酮的缀合物 (**11d~11e**, **12d~12e**) 的抗乳腺癌活性是临幊上应用药物他莫昔芬 (TAM, IC₅₀ = 15.2 μmol/L) 的 2.3~3.2 倍,其量效曲线如图 3 所示。

Table 2 Comparison of different chalcone units of conjugates **11** and **12** antiproliferative effects on MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Ar	Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$	Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$
	11a	12.4 ± 0.74	12a	12.8 ± 1.64
	11b	13.9 ± 2.93	12b	11.5 ± 1.23
	11c	7.8 ± 1.12	12c	9.9 ± 0.87
	11d	5.9 ± 1.57	12d	6.6 ± 2.92
	11e	4.7 ± 0.85	12e	5.1 ± 2.35

**Figure 3** Illustrative dose-response curves for antiproliferative effects on MCF-7 breast cancer cells of compounds **11d-11e** and **12d-12e** ($\bar{x} \pm s, n=3$)

另外,为了进一步考察这类缀合物毒性,用正常的乳腺癌上皮细胞MCF-10A和非洲绿猴肾细胞VERO做为对照细胞来检测这类缀合物的毒性,并计算出其体外治疗指数(*in vitro* therapeutic index, IVTI),化合物的IVTI越高,安全性越高^[20]。如表3所示,熊果酸衍生物-查耳酮缀合物对正常的乳腺癌上皮细胞MCF-10A和非洲绿猴肾细胞VERO没有毒性($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$),而阳性药物他莫昔芬(TAM)却展现出了一定的毒性;同时,缀合物**11~12**的治疗指数(IVTI > 7)也高于熊果酸他莫昔芬。

Table 3 *In vitro* therapeutic index (IVTI) of ursolic acid derivative-chalcone conjugates **11-12**,UA and tamoxifen ($n=3$)

Compd.	MCF-10A	VERO	IVTI ^a
11a	> 100 ^b	> 100	> 8.06
11b	> 100	> 100	> 7.19
11c	> 100	> 100	> 12.82
11d	> 100	> 100	> 16.94
11e	> 100	> 100	> 21.27
12a	> 100	> 100	> 7.81
12b	> 100	> 100	> 8.69
12c	> 100	> 100	> 10.10
12d	> 100	> 100	> 15.10
12e	> 100	> 100	> 19.60
Cha 4	> 100	> 100	> 2.67
Cha 5	> 100	> 100	> 4.58
UA	> 100	53.2 ± 1.87	> 2.90
Tamoxifen	42.2 ± 2.17	15.1 ± 2.21	2.77

^a IVTI = IC_{50} MCF-10A/ IC_{50} MCF-7; ^b IC_{50} not determinable up to highest concentrations tested

5 结 论

通过将活性单元查耳酮引入到熊果酸衍生物中,得到了10个开环熊果酸-查耳酮缀合物。经过测试这些缀合物的抗瘤活性发现,其对鼻咽鳞癌CNE2细胞、口腔表皮样癌KB细胞、乳腺癌MCF-7、肺腺癌A549细胞和肝癌HepG2细胞均有抑制活性,尤其是对乳腺癌有较强的抑制活性和选择性,并强于熊果酸和他莫昔芬。同时,这类缀合物对正常MCF-10A和VERO细胞没有毒

性;成功地利用酯化反应将两个活性亚单元拼接得到了抗肿瘤活性更强的缀合物,这为今后发展新型、高效、低毒的熊果酸类抗肿瘤药物提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Lin K,Zhang TP,Zhang HY. Separation and purification of ursolic acid (UA) from hawthorn fruits and hypolipidemic effect of UA on mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, **6**(19):1052–1054.
- [2] Bai KK,Chen FL,Guo YH. Synthesis of ursolic acid derivatives and their *in vitro* cytotoxicity against prostatic carcinoma cell line PC-3 [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2012, **21**(22): 2667–2673.
- [3] Meng YQ,Liu D,Bai ZW,*et al*. Synthesis and anti-tumor activity of ursolic acid derivatives [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2011, **46**(5):556–560.
- [4] Nelson AT,Camelio AM,Claussen KR,*et al*. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, **25** (19): 4342–4346.
- [5] Wu PP,Zhang K,Lu YJ,*et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, **80**:502–508.
- [6] Sheng HM,Sun HB. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, **28**(3):543–593.
- [7] Chen J,Liu J,Gong YC,*et al*. Synthesis and biological evaluation of ursolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2006, **37**(5):397–402.
- [8] Meng YQ,Chen Y,Wang,*et al*. Research advance of ursolic acid [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2007, **11** (1): 25–28.
- [9] Li X,Bai X,Wu K,*et al*. Synthesis and antitumor activities of 3'-substituted propanolursolates [J]. *Chin J Org Chem* (有机化学), 2012, **32**(4):703–708.
- [10] Kumar D,Kumar MN,Tantak MP,*et al*. Synthesis and identification of -cyano bis(indolyl) chalcones as novel anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, **24**(22):5170–5174.
- [11] Tomar V,Bhattacharjee G,Kamaluddin KA. Synthesis and antimicrobial evaluation of new chalcones containing piperazine or 2,5-dichlorothiophene moiety [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17** (19):5321–5324.
- [12] Siddiqui ZN,Mushtafa TNM,Ahmad A,*et al*. Thermal solvent-free synthesis of novel pyrazolyl chalcones and pyrazolines as potential antimicrobial agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, **21** (10):2860–2865.
- [13] Sashidhara KV,Avula SR,Mishra V,*et al*. Identification of quinoline-chalcone hybrids as potential antiulcer agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, **89**:638–653.
- [14] Detsi A,Majdalani M,Kontogiorgis CA,*et al*. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, **17** (23):8073–8085.
- [15] Mauricio C,Macarena S,Gabriela F,*et al*. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, **15**(10):3356–3367.
- [16] Hu WY,Chen J,Jiang ZY,*et al*. Synthesis and biological activity of chalcone derivatives as potent activators of Nrf2 [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(6):666–672.
- [17] Tu HY,Huang AM,Wi BL,*et al*. Ursolic acid derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis in NTUB1 cells associated with reactive oxygen species [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, **17** (20): 7265–7274.
- [18] Gnoato SCB,Dassonville-Klimpt A,Nascimento SD,*et al*. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, **43**: 1865–1877.
- [19] Hu WY,Zhao CQ,Ju Y. Synthesis and anti-tumor activity of opened A-ring modified 18-glycyrrhetic acid derivatives [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2010, **31**(9):1762–1768.
- [20] Muller PK,Molton MN. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, **11**(10):751–761.