

· 论 文 ·

天然产物去氢骆驼蓬碱糖基偶联物的合成及抗肿瘤活性评价

刘晓涵¹, 谭云鹰¹, 李 强¹, 陈 旭¹, 傅俊杰^{1*}, 尹 健^{1,2**}

(¹江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122;

²江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122)

摘 要 基于本课题组前期工作基础,在天然产物去氢骆驼蓬碱(harmine)的C⁷位氧上引入环己基甲基,并在N⁹位上通过不同长度的烷基链偶联甲基-2-氨基-β-D-葡萄糖苷,设计并合成了8个去氢骆驼蓬碱糖基偶联物(**14a**~**14h**)。体外抗肿瘤活性筛选和构效关系研究发现,偶联物的抗肿瘤活性随连接臂中烷基链长度的延长而增加。化合物**14h**对MDA-MB-231乳腺癌细胞的增殖抑制活性显著优于去氢骆驼蓬碱。与去氢骆驼蓬碱相比,糖基的引入改善了化合物**14h**的水溶性,并通过Warburg效应提高了化合物**14h**的肿瘤细胞选择性。机制研究发现化合物**14h**可诱导MDA-MB-231细胞凋亡和G₀/G₁期细胞阻滞,并能通过干扰细胞上皮-间充质转化进程抑制肿瘤细胞迁移。本研究为基于去氢骆驼蓬碱的抗肿瘤药物的开发提供了新思路。

关键词 去氢骆驼蓬碱;2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖;糖基偶联药物;抗肿瘤活性

中图分类号 R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2023)06-0729-14

doi: 10. 11665/j. issn. 1000-5048. 2023041101

引用本文 刘晓涵,谭云鹰,李强,等.天然产物去氢骆驼蓬碱糖基偶联物的合成及抗肿瘤活性评价[J].中国药科大学学报,2023,54(6):729-742.

Cite this article as: LIU Xiaohan, TAN Yunning, LI Qiang, *et al.* Synthesis and antitumor activity evaluation of glycoconjugates derived from natural product harmine[J]. *J China Pharm Univ*, 2023, 54(6): 729–742.

Synthesis and antitumor activity evaluation of glycoconjugates derived from natural product harmine

LIU Xiaohan¹, TAN Yunning¹, LI Qiang¹, CHEN Xu¹, FU Junjie^{1*}, YIN Jian^{1,2**}

¹Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Ministry of Education), School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122; ²School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract Based on our previous work, the study herein designed and synthesized eight glycoconjugates of natural product harmine (**14a**–**14h**) by introducing a cyclohexylmethyloxyl group at its C⁷ position and coupling a methyl-2-amino-β-D-glucopyranoside to the N⁹ position through different lengths of alkyl chains. *In vitro* antitumor activity screening and structure-activity relationship studies showed that the antitumor activity of the conjugates increased with the lengthening of the alkyl chain in the linker. Compound **14h** exhibited significantly better proliferative inhibitory activity against MDA-MB-231 breast cancer cells than harmine. As compared to harmine, the introduction of the carbohydrate moiety improved the water solubility of compound **14h** and enhanced its tumor cell selectivity through the Warburg effect. Mechanism of action studies revealed that compound **14h** induced apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells, and inhibited tumor cell migration by interfering with epithelial-mesenchymal transition process. This study provides a new approach for the development of antitumor drugs based on harmine.

收稿日期 2023-04-11 **通信作者** *Tel: 0510-85197039 E-mail: jfu@jiangnan.edu.cn

**Tel: 0510-85328706 E-mail: jianyin@jiangnan.edu.cn

基金项目 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室开放课题资助项目(No. KLCCB-KF202003)

Key words harmine; 2-amino-2-deoxy-D-glucose; glycoconjugate drugs; antitumor activity

This study was supported by the Open Project of Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology (Ministry of Education), Jiangnan University (No. KLCCB-KF202003)

恶性肿瘤是全球第二大致命疾病,其发病率和病死率持续上升,严重威胁人类生命安全^[1]。不断寻找并开发有效、安全的抗肿瘤新药十分重要。天然产物因结构多样、生物活性优良,成为抗肿瘤药物的重要来源^[2]。紫杉醇、喜树碱、长春碱等都是活性优异的抗肿瘤天然产物,已广泛应用于临床治疗^[3-4]。

去氢骆驼蓬碱(harmine)是天然的三环 β -咔琳类生物碱,可于骆驼蓬种子中提取获得,具有镇痛、抗菌、抗寄生虫、降血糖、抗肿瘤等多种生物活性^[5-6]。去氢骆驼蓬碱可通过与DNA结合、抑制拓扑异构酶I活性、改变细胞周期、抑制肿瘤血管生成等多种作用机制发挥抗肿瘤作用^[7-8]。上皮-间充质转化(EMT)是上皮细胞转化为拥有侵袭转移能力的间充质细胞的过程,可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭^[9]。研究表明,去氢骆驼蓬碱可以抑制肿瘤细胞的EMT进程^[10-11]。例如,去氢骆驼蓬碱可以以剂量依赖的方式诱导EMT转录因子Twist1的降解,抑制人和小鼠乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[12]。但是,由于去氢骆驼蓬碱神经毒性强,生物利用度低,其临床应用受到了一定限制,需要对其进行进一步优化。Lu等^[13]在去氢骆驼蓬碱的N⁹位偶联组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,得到HDAC和DNA双靶向抑制剂N-羟基-2-(4-((去氢骆驼蓬碱-9-基)甲基)哌啶-1-基)嘧啶-5-甲酰胺(**1**)(图1),其对HCT-116细胞的IC₅₀由20 $\mu\text{mol/L}$ 低到1.41 $\mu\text{mol/L}$ 。Du等^[14]在去氢骆驼蓬碱的N⁹位引出不同长度(4~6个直链碳原子)的溴代烷链,发现所得9-溴代烷基去氢骆驼蓬碱衍生物**2**的抗肿瘤活性随烷基链长度增加而增加。Tang等^[15]合成了去氢骆驼蓬碱N⁹位肉桂酸衍生物4-(去氢骆驼蓬碱-9-基)丁基(E)-3-(4-甲氧基苯基)丙烯酸酯(**3**),其对MDA-MB-231细胞抑制活性是去氢骆驼蓬碱的4.5倍,而对正常细胞的毒性低于去氢骆驼蓬碱。Filali等^[16]在去氢骆驼蓬碱的N⁹位引入异噁唑得到5-((去氢骆驼蓬碱-9-基)甲基)-3-苯基-4,5-二氢异噁唑(**4**),其对MCF-7细胞的毒性比去氢骆驼蓬碱提

高了4倍。此外,研究表明,将去氢骆驼蓬碱C⁷位氧原子上的甲基替换为异戊基、环己基甲基、苄基、苯丙基等也可提高其抗肿瘤活性^[17]。综上,去氢骆驼蓬碱的C⁷和N⁹位是其结构改造的主要位点。

与正常细胞相比,肿瘤细胞主要依靠糖酵解获取能量,对葡萄糖的需求增加,这一现象被称为Warburg效应^[18]。葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)是细胞摄取葡萄糖的主要通道,在肿瘤细胞表面过表达,已成为肿瘤治疗的重要靶点。半乳糖、甘露糖、2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖(2-DG)等也可被GLUT1识别并运输至细胞内,其中2-DG磷酸化生成的产物无法继续参与糖酵解中的异构化反应,不能为肿瘤细胞提供能量,具有独特的优势^[19]。因此,可利用2-DG或其类似物与药物偶联,提高肿瘤细胞对偶联药物的摄取效率,增加药物的肿瘤细胞选择性^[20-21]。例如,通过丁二酸连接2-DG和阿霉素的氨基得到2-DG阿霉素偶联物**5**,利用依他尼酸的羧基与2-DG的氨基成酰胺得到2-DG依他尼酸偶联物**6**(图1),两者均可通过靶向GLUT1显著提高药物对肿瘤细胞的选择性^[22-23]。此外,2-DG偶联策略在临床成像、肿瘤诊断、治疗效果监测等方面也有广泛应用^[19],并且糖基的引入还能有效改善药物的水溶性和成药性^[24-25]。

基于上述背景,本研究在前期研究中选用甲基、异戊基、环己基甲基和苄基作为去氢骆驼蓬碱C⁷位氧上的修饰基团,并通过3个和5个直链碳原子在去氢骆驼蓬碱N⁹位上偶联甲基2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖苷,合成了一系列去氢骆驼蓬碱糖基偶联物。抗肿瘤活性筛选发现,去氢骆驼蓬碱C⁷位氧上为环己基甲基时抗肿瘤活性最佳,且N⁹位连接臂长度也显著影响抗肿瘤活性(未发表数据)。因此,本研究将去氢骆驼蓬碱C⁷位氧上的取代基固定为环己基甲基,通过1~9个直链碳原子在去氢骆驼蓬碱N⁹位上引出羧基并偶联甲基2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖苷,进一步系统考察连接臂长度对抗肿瘤活性的影响,并对优选出的化合物

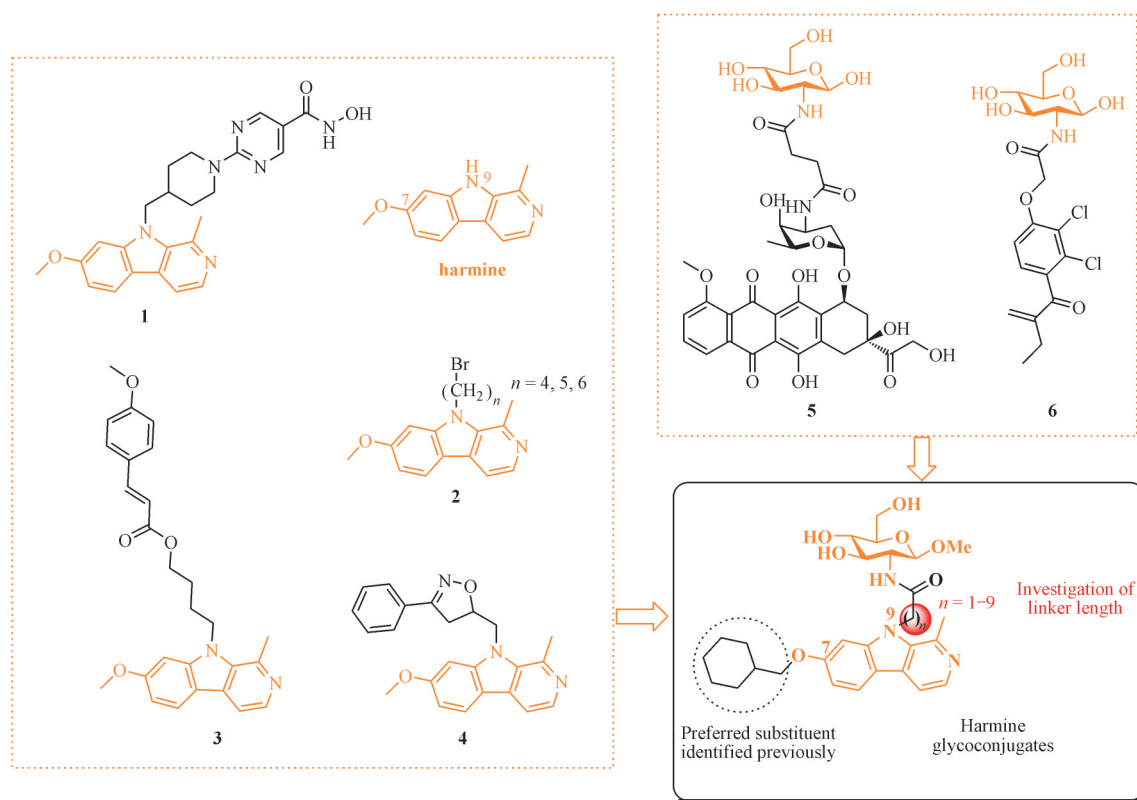


Figure 1 Design of glycoconjugates from harmine and 2-amino-2-deoxy- β -D-glucoside

的作用机制进行初步探究(图1)。

1 合成路线

如路线1所示,以2-氨基-1,2,3,4,6-*O*-五-乙酰基- β -D-葡萄糖为起始原料,在Lewis酸三氟化硼乙醚($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)的催化下与甲醇发生糖苷化反应得到相应的甲基糖苷7,依次用甲醇钠和氢氧化钠脱除氧和氮原子上的乙酰基,得甲基2-氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖苷9。另一方面,以去氢骆驼蓬碱为原料,在氢溴酸和乙酸中回流脱除C7位氧上的甲基得化合物10。在碳酸铯条件下,化合物10的羟基经溴甲基环己烷亲电取代得中间体11。中间体11的NH经钠氢或碳酸钾活化后与长度各异的 ω -溴代羧酸叔丁酯或丙烯酸叔丁酯反应得化合物12a~12h,经三氟乙酸脱除叔丁酯保护基后得相应的酸13a~13h。最后,化合物13a~13h在苯并三氮唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)条件下与氨基葡萄糖9缩合得目标分子14a~14h。目标分子结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR和HRMS确认,纯度均在95%以上。

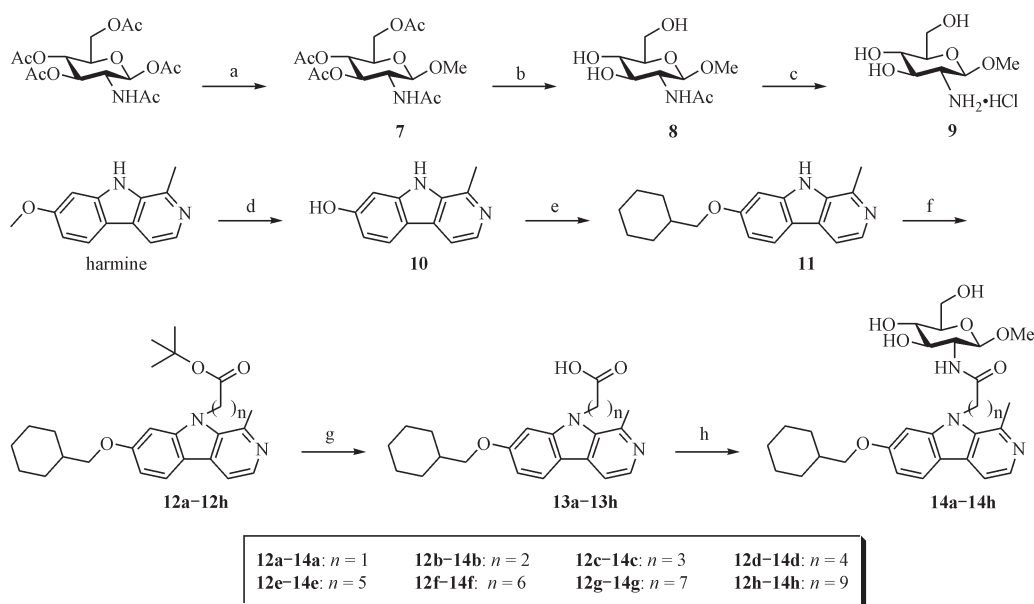
2 实验部分

2.1 试剂、仪器及细胞

本研究所用化学品及试剂均为市售分析纯,使用前无须进一步纯化;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、RIPA细胞裂解液、ECL化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);抗E-cadherin抗体、抗N-cadherin抗体、抗Twist1抗体、抗Bcl-2抗体(英国Abcam公司);抗GADPH抗体及兔、鼠二抗(江苏凯基生物技术有限公司)。

Avance III 400 MHz或Avance III 600 MHz核磁共振仪(德国Bruker公司);Agilent 6220高分辨质谱仪、紫外分光光度计(美国Agilent公司);酶标仪(美国Thermo Fisher公司);流式细胞仪(美国BD公司);化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

本研究所用的人乳腺癌细胞MDA-MB-231、人宫颈癌细胞HeLa、人卵巢癌细胞OVCAR-3、人结肠癌细胞HCT-116、人正常乳腺上皮细胞MCF-10A均由江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室提供。



Scheme 1 Synthetic route of harmine derivatives **14a–14h**

Reagents and conditions: (a) CH_3OH , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 50°C , 48 h; (b) CH_3ONa , CH_3OH , r. t., 2 h; (c) NaOH (1 mol/L), reflux, 12 h; (d) HBr , CH_3COOH , reflux, 12 h; (e) bromomethylcyclohexane, Cs_2CO_3 , DMF, 40°C , 12 h; (f) K_2CO_3 , $\text{CH}_2=\text{CHCO}_2^t\text{Bu}$, DMF, 80°C , 12 h for **12b**, and NaH , $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2^t\text{Bu}$, DMF, r. t., 12 h for others; (g) TFA , CH_2Cl_2 , r. t., 24 h; (h) **9**, HBTU, DIPEA, DMF, r. t., 2 h

2.2 化学合成

2.2.1 中间体 7 的合成^[26] 在氩气保护下,向 2-氨基-1,2,3,4,6-*O*-五-乙酰基- β -D-葡萄糖(2.50 g, 6.43 mmol)和活化好的 4 Å 分子筛中依次加入无水二氯甲烷(30 mL)和无水甲醇(2.6 mL, 64.3 mmol)。在 0°C 下逐滴加入 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (7.9 mL, 64.3 mmol),搅拌 30 min 后升温至 50°C 继续反应 48 h。用饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应。溶液经硅藻土过滤,以二氯甲烷稀释,依次用水和饱和氯化钠溶液洗涤。收集有机相经无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱纯化(乙醇-二氯甲烷, 1:50)得白色固体 **7** (1.34 g, 3.73 mmol), 收率 58.2%。

2.2.2 中间体 8 的合成^[26] 将中间体 **7** (160 mg, 0.44 mmol) 溶于无水甲醇(3 mL)中,加入甲醇钠(9.6 mg, 0.18 mmol),于室温下反应 2 h。用氢离子交换树脂中和并过滤后,浓缩得到白色固体 **8** (101.2 mg, 0.43 mmol)。不经纯化直接用于下一步。

2.2.3 中间体 9 的合成^[26] 将中间体 **8** (101.2 mg, 0.43 mmol) 溶于氢氧化钠水溶液(1 mol/L, 2 mL), 120°C 下回流反应 12 h。反应液恢复至室温后,逐滴加入盐酸(1 mol/L)中和,减压浓缩得白色固体 **9**

(140.3 mg), 收率定量。不经纯化直接用于下一步。

2.2.4 中间体 10 的合成^[17] 将去氢骆驼蓬碱(1.54 g, 7.27 mmol)溶于 48% 氢溴酸水溶液(30 mL)及乙酸中(25 mL), 120°C 下回流反应 12 h。反应液减压浓缩,加入 15 mL 水,并逐滴加入饱和碳酸氢钠溶液至 pH 为 8,生成大量沉淀。过滤,用水洗涤滤饼,干燥得到棕红色固体 **10** (1.41 g, 7.12 mmol), 收率 97.9%。

2.2.5 中间体 11 的合成^[17] 取中间体 **10** (1.00 g, 5.05 mmol) 溶解于 DMF (14 mL) 中,加入碳酸铯(2.46 g, 7.56 mmol),于室温下搅拌 30 min,随后逐滴加入溴甲基环己烷(0.86 mL, 6.06 mmol)。升温至 40°C 反应 12 h。反应液经硅藻土过滤,加乙酸乙酯稀释并用水洗涤。有机相经无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱纯化(甲醇-二氯甲烷, 1:25)得到淡黄色固体 **11** (1.16 g, 3.94 mmol), 收率 78.5%。

2.2.6 中间体 12 的合成 对于中间体 **12a** 及 **12c–12h**: 将中间体 **11** (294 mg, 1 mmol) 溶解于 DMF (6 mL) 中,在 0°C 条件下加入钠氢(36 mg, 1.5 mmol),恢复至室温搅拌 30 min。加入对应的溴代羧酸叔丁酯(1.2 mmol)并于室温下反应 12 h。用乙

酸乙酯稀释反应液,有机相用水洗涤并经无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱纯化(甲醇-二氯甲烷,1:50→1:25)得到目标中间体。

中间体 12b:将中间体 11(294 mg, 1 mmol)溶解于 DMF(6 mL)中,在 0 °C 条件下加入碳酸钾(207 mg, 1.5 mmol),恢复至室温搅拌 30 min。加入丙烯酸叔丁酯(174 μ L, 1.2 mmol)并于 80 °C 下反应 12 h。用乙酸乙酯稀释反应液,有机相用水洗涤并经无水硫酸钠干燥,减压浓缩得到粗品。粗品经硅胶柱纯化(甲醇-二氯甲烷,1:25)得淡黄色固体 **12b**(190.3 mg, 0.45 mmol),收率 45.6%。

中间体 12a 淡黄色固体,收率 52.2%, mp: 182.2 ~ 183.0 °C。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.28(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-3), 7.95(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.73(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-4), 6.89(1H, dd, J = 8.6, 2.1 Hz, Har-6), 6.76(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 5.08(2H, s, NCH₂), 3.86(2H, d, J = 6.3 Hz, OCH₂), 2.95(3H, s, CH₃), 1.97 ~ 1.70(6H, m, cyclohexyl), 1.43(9H, s, CH₃ \times 3), 1.30 ~ 1.17(5H, m, cyclohexyl)。¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 168.01, 161.08, 143.85, 140.46, 138.62, 135.84, 130.15, 122.59, 115.27, 112.54, 109.96, 93.88, 83.03, 74.12, 47.64, 37.95, 30.11(2C), 28.10(3C), 26.65, 25.96(2C), 22.88。MS(ESI) m/z Calcd. for C₂₅H₃₂N₂O₃ [M + H]⁺ 409.241 3, Found 409.053 8。

中间体 12b 淡黄色固体,收率 45.4%, mp: 159.5 ~ 160.2 °C。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.31(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-3), 7.97(1H, d, J = 8.5 Hz, Har-5), 7.74(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 6.97 ~ 6.89(2H, m, Har-6 和 Har-8), 4.85 ~ 4.77(2H, m, NCH₂), 3.92(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH₂), 3.06(3H, s, CH₃), 2.77 ~ 2.69(2H, m, COCH₂), 1.99 ~ 1.68(6H, m, cyclohexyl), 1.43(9H, s, CH₃ \times 3), 1.38 ~ 1.09(5H, m, cyclohexyl)。¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 170.34, 160.96, 142.98, 140.69, 138.71, 135.20, 129.99, 122.48, 115.29, 112.41, 109.81, 94.27, 81.64, 74.17, 40.77, 38.00, 36.42, 30.14(2C), 28.17(2C), 28.11, 26.67, 25.99(2C), 23.48。HRMS(ESI) m/z Calcd. for C₂₆H₃₄N₂O₃ [M + H]⁺ 423.256 9, Found 423.270 7。

中间体 12c 白色固体,收率 79.6%, mp: 127.7 ~ 128.7 °C。¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ :

8.27(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-3), 7.94(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.72(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 7.01(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.88(1H, dd, J = 8.6, 2.1 Hz, Har-6), 4.54 ~ 4.48(2H, m, NCH₂), 3.91(2H, d, J = 6.4 Hz, OCH₂), 3.03(3H, s, CH₃), 2.33(2H, t, J = 6.8 Hz, COCH₂), 2.11 ~ 2.03(2H, m, CH₂), 1.95 ~ 1.69(6H, m, cyclohexyl), 1.47(9H, s, CH₃ \times 3), 1.36 ~ 1.06(5H, m, cyclohexyl)。¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 172.16, 160.98, 143.44, 140.39, 138.10, 135.25, 129.79, 122.39, 114.96, 112.37, 109.78, 94.20, 80.98, 74.08, 44.11, 37.95, 32.32, 30.12(2C), 28.25(3C), 26.68, 25.97(2C), 25.85, 23.32。HRMS(ESI) m/z Calcd. for C₂₇H₃₆N₂O₃ [M + H]⁺ 437.272 6, Found 437.285 9。

中间体 12d 淡黄色固体,收率 91.5%, mp: 112.2 ~ 113.0 °C。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.27(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-3), 7.95(1H, d, J = 8.5 Hz, Har-5), 7.73(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 6.91 ~ 6.83(2H, m, Har-6 和 Har-8), 4.52 ~ 4.43(2H, m, NCH₂), 3.89(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH₂), 3.02(3H, s, CH₃), 2.28(2H, t, J = 7.1 Hz, COCH₂), 1.97 ~ 1.69(10H, m, cyclohexyl 和 CH₂ \times 2), 1.41(9H, s, CH₃ \times 3), 1.26 ~ 1.08(5H, m, cyclohexyl)。¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 172.56, 160.92, 143.32, 140.44, 138.15, 135.34, 129.76, 122.50, 115.11, 112.41, 109.52, 94.21, 80.61, 74.14, 44.76, 38.04, 35.17, 30.13(2C), 29.56, 28.26(2C), 28.18, 26.68, 26.00(2C), 23.37, 22.52。HRMS(ESI) m/z Calcd. for C₂₈H₃₈N₂O₃ [M + H]⁺ 451.288 2, Found 451.301 1。

中间体 12e 淡黄色固体,收率 71.3%, mp: 99.8 ~ 100.5 °C。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ : 8.27(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-3), 7.95(1H, d, J = 8.5 Hz, Har-5), 7.72(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 6.87(1H, dd, J = 8.6, 2.1 Hz, Har-6), 6.83(1H, d, J = 2.0 Hz, Har-8), 4.49 ~ 4.41(2H, m, NCH₂), 3.89(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH₂), 3.01(3H, s, CH₃), 2.22(2H, t, J = 7.3 Hz, COCH₂), 1.98 ~ 1.61(10H, m, cyclohexyl 和 CH₂ \times 2), 1.48 ~ 1.40(11H, m, CH₂ 和 CH₃ \times 3), 1.38 ~ 1.05(5H, m, cyclohexyl)。¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ : 172.91, 160.79, 143.25, 140.52, 138.26, 135.38, 129.63, 122.44, 115.15, 112.37, 109.26, 94.19, 80.35, 74.13, 44.86, 38.02, 35.40, 30.54, 30.15

(2C), 28.23(3C), 26.67, 26.48, 26.00(2C), 24.95, 23.50。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{29}H_{40}N_2O_3$ $[M + H]^+$ 465.3039, Found 465.3179。

中间体 **12f** 白色固体, 收率 74.2%, mp: 76.8 ~ 77.9 °C。 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.27(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-3), 7.95(1H, d, $J = 8.6$ Hz, Har-5), 7.72(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-4), 6.91 ~ 6.82(2H, m, Har-6 和 Har-8), 4.48 ~ 4.40(2H, m, NCH_2), 3.89(2H, d, $J = 6.2$ Hz, OCH_2), 3.01(3H, s, CH_3), 2.20(2H, t, $J = 7.4$ Hz, $COCH_2$), 1.98 ~ 1.69(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.59 ~ 1.53(2H, m, CH_2), 1.48 ~ 1.38(11H, m, CH_2 和 $CH_3 \times 3$), 1.36 ~ 1.08(7H, m, cyclohexyl 和 CH_2)。 ^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.15, 160.77, 143.26, 140.58, 138.30, 135.43, 129.60, 122.41, 115.18, 112.37, 109.26, 94.30, 80.25, 74.15, 44.97, 38.02, 35.49, 30.65, 30.16(2C), 29.01, 28.30, 28.23(2C), 26.82, 26.67, 26.00(2C), 25.06, 23.52。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{30}H_{42}N_2O_3$ $[M + H]^+$ 479.3195, Found 479.3337。

化合物 **12g** 白色固体, 收率 82.5%, mp: 55.5 ~ 56.4 °C。 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.26(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-3), 7.95(1H, d, $J = 8.5$ Hz, Har-5), 7.72(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-4), 6.91 ~ 6.80(2H, m, Har-6 和 Har-8), 4.48 ~ 4.39(2H, m, NCH_2), 3.89(2H, d, $J = 6.2$ Hz, OCH_2), 3.01(3H, s, CH_3), 2.19(2H, t, $J = 7.4$ Hz, $COCH_2$), 1.98 ~ 1.70(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.57 ~ 1.49(2H, m, CH_2), 1.45 ~ 1.39(11H, m, CH_2 和 $CH_3 \times 3$), 1.34 ~ 1.06(9H, m, cyclohexyl 和 $CH_2 \times 2$)。 ^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.29, 160.75, 143.27, 140.59, 138.25, 135.44, 129.59, 122.43, 115.18, 112.36, 109.18, 94.28, 80.16, 74.15, 45.02, 38.02, 35.60, 30.75, 30.16(2C), 29.26, 29.14, 28.28, 28.23(2C), 26.92, 26.67, 25.99(2C), 25.09, 23.49。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{31}H_{44}N_2O_3$ $[M + H]^+$ 493.3352, Found 493.3487。

中间体 **12h** 淡黄色固体, 收率 72.6%, mp: 42.0 ~ 42.8 °C。 1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.27(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-3), 7.95(1H, d, $J = 8.5$ Hz, Har-5), 7.72(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-4), 6.87(1H, dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, Har-6), 6.83(1H, d, $J = 2.0$ Hz, Har-8), 4.43(2H, t, $J = 7.9$ Hz, NCH_2), 3.89(2H, d,

$J = 6.2$ Hz, OCH_2), 3.01(3H, s, CH_3), 2.19(2H, t, $J = 7.5$ Hz, $COCH_2$), 1.95 ~ 1.70(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.56 ~ 1.47(2H, m, CH_2), 1.43 ~ 1.39(11H, m, CH_2 和 $CH_3 \times 3$), 1.34 ~ 1.08(13H, m, cyclohexyl 和 $CH_2 \times 4$)。 ^{13}C NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 173.40, 160.74, 143.29, 140.58, 138.20, 135.43, 129.60, 122.44, 115.16, 112.37, 109.25, 94.31, 80.06, 74.14, 45.04, 38.00, 35.70, 30.76, 30.16(2C), 29.49, 29.35(2C), 29.16, 28.29, 28.22(2C), 27.04, 26.67, 25.99(2C), 25.19, 23.37。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{33}H_{48}N_2O_3$ $[M + H]^+$ 521.3665, Found 521.3802。

2.2.7 中间体 **13** 的合成^[5] 将中间体 **12** (0.45 mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (5 mL) 中, 在 0 °C 下逐滴加入三氟乙酸 (5 mL), 恢复至室温反应 24 h。反应液减压浓缩得中间体 **13**。不经纯化直接用于下一步。

2.2.8 目标化合物 **14** 的合成 将中间体 **13** (0.53 mmol, 1.2 eq.) 溶解于 DMF (5 mL) 中, 逐滴加入 *N,N*-二异丙基乙胺 DIPEA (290 μ L, 1.76 mmol) 和 HBTU (217 mg, 0.57 mmol), 搅拌 15 min 后加入中间体 **9** (100 mg, 0.44 mmol), 室温下继续搅拌 2 h。反应液减压浓缩得到粗品, 粗品经硅胶柱纯化 (甲醇-二氯甲烷, 1:10→1:5) 得目标化合物 **14**。

化合物 **14a** 白色固体, 收率 35.7%, mp: 247.6 ~ 248.6 °C。 1H NMR(400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.22(1H, d, $J = 8.9$ Hz, NH), 8.16(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-3), 8.08(1H, d, $J = 8.6$ Hz, Har-5), 7.90(1H, d, $J = 5.2$ Hz, Har-4), 7.09(1H, d, $J = 2.1$ Hz, Har-8), 6.88(1H, dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, Har-6), 5.25 ~ 5.10(2H, m, NCH_2), 5.04 ~ 5.01(1H, m, 4-OH), 4.98(1H, d, $J = 5.1$ Hz, 3-OH), 4.56(1H, t, $J = 5.9$ Hz, 6-OH), 4.25(1H, d, $J = 8.3$ Hz, 1-H), 3.91(2H, dd, $J = 6.3, 1.9$ Hz, OCH_2), 3.68(1H, dd, $J = 11.7, 5.8$ Hz, 6'-H), 3.53 ~ 3.42(3H, m, 6'-H, 2-H 和 3-H), 3.30(3H, s, OCH_3), 3.10 ~ 3.07(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.90(3H, s, CH_3), 1.91 ~ 1.63(6H, m, cyclohexyl), 1.22 ~ 1.02(5H, m, cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(150 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 167.91, 160.21, 143.90, 141.01, 137.55, 135.53, 128.85, 122.29, 114.20, 112.23, 109.58, 101.85, 94.42, 77.04, 74.00, 73.19, 70.54, 60.97, 55.85, 55.53, 47.64, 37.29, 29.37(2C),

26.06, 25.30(2C), 22.14。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{28}H_{37}N_3O_7[M+H]^+$ 528.2632, Found 528.2937。

化合物 **14b** 白色固体, 收率 39.1%, mp: 224.0 ~ 224.6 °C。 1H NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.17(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-3), 8.08(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.90(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 7.87(1H, d, J = 8.9 Hz, NH), 7.20(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.88(1H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz, Har-6), 5.01(1H, d, J = 4.0 Hz, 4-OH), 4.94(1H, d, J = 5.1 Hz, 3-OH), 4.77(2H, t, J = 8.0 Hz, NCH_2), 4.54(1H, t, J = 5.9 Hz, 6-OH), 4.16(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.95(2H, d, J = 6.3 Hz, OCH_2), 3.68(1H, dd, J = 11.6, 5.5 Hz, 6-H), 3.48 ~ 3.37(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.29 ~ 3.26(1H, m, 3-H), 3.20(3H, s, OCH_3), 3.11 ~ 3.04(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.99(3H, s, CH_3), 2.65 ~ 2.53(2H, m, $COCH_2$), 1.90 ~ 1.64(6H, m, cyclohexyl), 1.35 ~ 1.08(5H, m, cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.53, 160.27, 142.73, 140.49, 137.59, 134.39, 128.87, 122.42, 114.16, 112.31, 109.65, 101.73, 94.50, 77.00, 74.07, 73.16, 70.51, 61.01, 55.59, 55.48, 40.76, 37.22, 36.35, 29.37(2C), 26.06, 25.29(2C), 22.70。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{29}H_{39}N_3O_7[M+H]^+$ 542.2788, Found 542.2920。

化合物 **14c** 白色固体, 收率 47.3%, mp: 195.4 ~ 196.2 °C。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.28 ~ 8.19(3H, m, Har-3, Har-5 和 Har-4), 7.90(1H, d, J = 9.1 Hz, NH), 7.34(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.96(1H, dd, J = 8.7, 2.0 Hz, Har-6), 5.10(1H, s, 4-OH), 5.04(1H, s, 3-OH), 4.64 ~ 4.52(3H, m, 6-OH 和 NCH_2), 4.23(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 4.00(2H, d, J = 6.3 Hz, OCH_2), 3.69(1H, d, J = 11.8 Hz, 6-H), 3.58 ~ 3.45(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.34 ~ 3.28(4H, m, OCH_3 和 3-H), 3.12 ~ 3.06(5H, m, 4-H, 5-H 和 CH_3), 2.25(2H, t, J = 6.9 Hz, $COCH_2$), 2.04 ~ 1.63(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.36 ~ 1.06(5H, m, cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.44, 161.67, 144.73, 138.52, 133.74, 132.41, 131.08, 123.53, 113.40, 113.32, 111.57, 101.84, 94.18, 77.07, 74.20, 73.38, 70.71, 61.07, 55.59, 55.10, 43.67, 37.17, 32.33, 29.35(2C), 26.08, 26.05, 25.30(2C), 19.69。HRMS(ESI) m/z Calcd.

for $C_{30}H_{41}N_3O_7[M+H]^+$ 556.2945, Found 556.3088。

化合物 **14d** 黄色固体, 收率 52.5%, mp: 188.2 ~ 189.4 °C。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.17(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-3), 8.08(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.93(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-4), 7.65(1H, d, J = 9.0 Hz, NH), 7.22(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.86(1H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz, Har-6), 4.99(1H, s, 4-OH), 4.87(1H, s, 3-OH), 4.54(3H, t, J = 7.7 Hz, 6-OH 和 NCH_2), 4.13(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.95(2H, d, J = 6.3 Hz, OCH_2), 3.66(1H, d, J = 11.7 Hz, 6-H), 3.51 ~ 3.41(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.31 ~ 3.24(1H, m, 3-H), 3.10(3H, s, OCH_3), 3.07 ~ 2.99(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.97(3H, s, CH_3), 2.13(2H, t, J = 6.9 Hz, $COCH_2$), 1.92 ~ 1.56(10H, m, cyclohexyl 和 $CH_2 \times 2$), 1.37 ~ 1.03(5H, m, cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.79, 160.46, 143.23, 140.06, 136.51, 134.35, 129.05, 122.55, 113.89, 112.44, 109.88, 102.80, 94.30, 76.46, 74.98, 73.23, 70.71, 61.08, 56.30, 54.54, 43.94, 37.32, 35.41, 30.05, 29.60, 29.40, 26.09(2C), 25.35(2C), 22.53。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{31}H_{43}N_3O_7[M+H]^+$ 570.3101, Found 570.3248。

化合物 **14e** 白色固体, 收率 43.6%, mp: 172.7 ~ 174.0 °C。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.18(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-3), 8.09(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.94(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-4), 7.64(1H, d, J = 9.0 Hz, NH), 7.16(1H, d, J = 2.3 Hz, Har-8), 6.87(1H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz, Har-6), 5.04(1H, s, 4-OH), 4.91(1H, s, 3-OH), 4.52(3H, t, J = 7.9 Hz, 6-OH 和 NCH_2), 4.18(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.94(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH_2), 3.68(1H, d, J = 11.7 Hz, 6-H), 3.49 ~ 3.38(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.33 ~ 3.25(4H, m, OCH_3 和 3-H), 3.13 ~ 3.01(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.97(3H, s, CH_3), 2.06(2H, t, J = 7.2 Hz, $COCH_2$), 1.91 ~ 1.62(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.60 ~ 1.52(2H, m, CH_2), 1.44 ~ 1.03(7H, m, CH_2 和 cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(150 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.87, 160.40, 143.12, 139.95, 136.46, 134.35, 129.00, 122.53, 113.93, 112.37, 109.77, 101.92, 94.23, 76.96, 74.25, 73.17, 70.72, 61.02, 55.53, 55.00, 44.03, 37.24, 35.59, 29.95, 29.32(2C), 26.02, 25.51, 25.29(2C), 24.99, 22.25。HRMS

(ESI) m/z Calcd. for $C_{32}H_{45}N_3O_7[M + H]^+$ 584.325 8, Found 584.340 7。

化合物 **14f** 黄色固体, 收率 41.1%, mp: 130.0 ~ 130.7 °C。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.17(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-3), 8.08(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.91(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-4), 7.61(1H, d, J = 9.0 Hz, NH), 7.17(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.86(1H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz, Har-6), 5.00(1H, s, 4-OH), 4.87(1H, s, 3-OH), 4.52(3H, t, J = 7.7 Hz, 6-OH 和 NCH_2), 4.17(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.93(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH_2), 3.68(1H, d, J = 11.7 Hz, 6-H), 3.50 ~ 3.44(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.29 ~ 3.23(4H, m, OCH_3 和 3-H), 3.11 ~ 3.01(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.95(3H, s, CH_3), 2.04(2H, t, J = 7.2 Hz, $COCH_2$), 1.93 ~ 1.62(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.51 ~ 1.43(2H, m, CH_2), 1.42 ~ 1.03(9H, m, $CH_2 \times 2$ 和 cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.04, 160.36, 143.12, 140.08, 136.71, 134.42, 128.93, 122.61, 113.98, 112.42, 109.75, 102.00, 94.33, 77.00, 74.28, 73.20, 70.72, 61.04, 55.64, 55.01, 44.02, 37.28, 35.74, 30.22, 29.38(2C), 28.19, 26.08, 25.97, 25.36(2C), 25.22, 22.48。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{33}H_{47}N_3O_7[M + H]^+$ 598.341 4, Found 598.356 3。

化合物 **14g** 黄色油状物, 收率 35.8%。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.17(1H, d, J = 5.4 Hz, Har-3), 8.09(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.93(1H, d, J = 5.3 Hz, Har-4), 7.58(1H, d, J = 8.9 Hz, NH), 7.17(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.87(1H, dd, J = 8.7, 2.0 Hz, Har-6), 5.00(1H, s, 4-OH), 4.86(1H, s, 3-OH), 4.53(3H, t, J = 7.6 Hz, 6-OH 和 NCH_2), 4.15(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.93(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH_2), 3.68(1H, d, J = 11.7 Hz, 6-H), 3.46 ~ 3.38(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.29 ~ 3.20(4H, m, OCH_3 和 3-H), 3.06(2H, d, J = 5.1 Hz, 4-H 和 5-H), 2.96(3H, s, CH_3), 2.02(2H, t, J = 7.2 Hz, $COCH_2$), 1.91 ~ 1.64(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.50 ~ 1.41(2H, m, CH_2), 1.35 ~ 1.04(11H, m, $CH_2 \times 3$ 和 cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.05, 160.39, 143.23, 140.01, 136.46, 134.39, 129.05, 122.61, 113.94, 112.47, 109.79, 102.09, 94.34, 76.99, 74.28, 73.19, 70.71, 61.04,

55.62, 55.01, 44.02, 37.27, 35.76, 30.36, 29.38(2C), 28.69, 28.43, 26.15(2C), 25.34(3C), 22.41。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{34}H_{49}N_3O_7[M + H]^+$ 612.357 1, Found 612.372 1。

化合物 **14h** 黄色油状物, 收率 44.3%。 1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.16(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-3), 8.06(1H, d, J = 8.6 Hz, Har-5), 7.88(1H, d, J = 5.2 Hz, Har-4), 7.57(1H, d, J = 9.0 Hz, NH), 7.14(1H, d, J = 2.1 Hz, Har-8), 6.85(1H, dd, J = 8.6, 2.0 Hz, Har-6), 4.98(1H, d, J = 5.8 Hz, 4-OH), 4.86(1H, s, 3-OH), 4.51(3H, t, J = 7.6 Hz, 6-OH 和 NCH_2), 4.18(1H, d, J = 8.4 Hz, 1-H), 3.92(2H, d, J = 6.2 Hz, OCH_2), 3.69(1H, d, J = 11.7 Hz, 6-H), 3.49 ~ 3.43(2H, m, 6'-H 和 2-H), 3.29 ~ 3.25(4H, m, OCH_3 和 3-H), 3.10 ~ 3.03(2H, m, 4-H 和 5-H), 2.93(3H, s, CH_3), 2.06 ~ 1.96(2H, m, $COCH_2$), 1.93 ~ 1.62(8H, m, cyclohexyl 和 CH_2), 1.49 ~ 1.40(2H, m, CH_2), 1.38 ~ 1.02(15H, m, $CH_2 \times 5$ 和 cyclohexyl)。 ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.11, 160.17, 142.97, 140.29, 137.30, 134.50, 128.70, 122.47, 114.06, 112.30, 109.62, 102.07, 94.33, 77.01, 74.33, 73.16, 70.72, 61.08, 55.66, 55.05, 43.96, 37.26, 35.86, 30.28, 29.40(2C), 28.98, 28.82, 28.81, 28.50, 26.11(2C), 25.34(3C), 22.80。HRMS(ESI) m/z Calcd. for $C_{36}H_{53}N_3O_7[M + H]^+$ 640.388 4, Found 640.403 4。

2.3 MTT测试

以去氢骆驼蓬碱为阳性对照, 采用MTT比色法测试目标化合物对MDA-MB-231、HeLa、OVCAR-3、HCT-116、MCF-10A细胞的增殖抑制活性。将细胞以每孔5 000个细胞的密度接种于96孔板中, 在37 °C, 5% CO_2 的加湿培养箱中培养12 h。受试化合物用DMSO溶解配制母液, 使用前用新鲜培养基稀释至所需浓度, DMSO的最终含量为0.1%。去除培养基, 每孔加入含不同浓度药物的新鲜培养基100 μ L, 继续孵育48 h。随后, 向每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μ L, 37 °C条件下避光培养4 h。小心去除上清液, 并向每孔加入DMSO 100 μ L, 振荡10 min。最后, 用酶标仪测试其在570 nm处的吸收度, 计算相应的细胞存活率及 IC_{50} 。

2.4 水溶性测试

采用紫外光谱法测试化合物**14h**的水溶性。

配制 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ 的化合物 **14h** 和去氢骆驼蓬碱的标准甲醇溶液, 绘制标准曲线。配制化合物 **14h** 及去氢骆驼蓬碱过饱和的水溶液及 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 室温下摇晃过夜后离心取上清液, 用甲醇稀释后根据标准曲线测得其中化合物 **14h** 或去氢骆驼蓬碱的浓度, 计算溶解度。

2.5 细胞凋亡实验

MDA-MB-231 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h。随后, 加入浓度为 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 及 20 $\mu\text{mol/L}$ 的去氢骆驼蓬碱处理 24 h。收集细胞并用 PBS 清洗细胞 3 次, 离心、去除上清液。加入 Annexin V-FITC 5 μL 及 PI 染色液 10 μL , 缓慢混匀。最后, 在室温下避光孵育 20 min, 用 BD 流式细胞仪检测。

2.6 细胞周期分布实验

MDA-MB-231 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h。随后, 加入浓度为 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的去氢骆驼蓬碱处理 24 h。收集细胞并用预冷的 PBS 清洗, 离心弃去上清液, 向细胞沉淀中加入 70% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。PBS 清洗细胞 3 次后, 加入事先配制好的 PI 染色液, 轻轻混匀。最后, 细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光温浴 30 min, 并通过流式细胞仪检测细胞 DNA 含量。

2.7 Western blot 实验检测 EMT 相关蛋白的表达

用不同浓度的化合物 **14h** 和去氢骆驼蓬碱孵育 MDA-MB-231 细胞 24 h。通过 RIPA 裂解缓冲液 (含 1 mmol/L PMSF) 处理细胞获取细胞总蛋白。随后, 利用 SDS-PAGE 将蛋白进行分离并转移至 PVDF 膜上。将膜用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h, 并使用相应的一抗 (抗 E-cadherin 抗体、抗 N-cadherin 抗体、抗 Twist1 抗体、抗 Bcl-2 抗体、抗 GADPH 抗体) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。在室温下用辣根过氧化物酶标记的二抗处理 PVDF 膜 2 h。最后, 向膜上滴加 ECL 发光液, 利用成像系统进行发光成像。

2.8 划痕实验

MDA-MB-231 细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h, 形成融合的单层细胞。用 10 μL 无菌枪头的尖端轻轻划伤细胞, 并用 PBS 小心清洗。随后, 用含 2% FBS 的新鲜培养基

配制 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的去氢骆驼蓬碱并加入到细胞中, 共同培养 12 h。在 0 h 和 12 h 通过显微镜拍照记录创面的生长情况。

3 结果与讨论

3.1 体外抗肿瘤活性筛选

通过 MTT 比色法测定合成的 8 个目标化合物 **14a** ~ **14h** 对 4 种人肿瘤细胞 (乳腺癌细胞 MDA-MB-231、宫颈癌细胞 HeLa、卵巢癌细胞 OVCAR-3、结肠癌细胞 HCT-116) 的增殖抑制活性, 计算 IC_{50} 。如表 1 所示, 化合物 **14a** ~ **14h** 中连接臂长度 (n) 对其抗肿瘤活性有显著影响。整体而言, IC_{50} 随 n 增大呈下降趋势。连接臂长度最短的化合物 **14a** ($n = 1$) 对 4 种细胞均无明显抑制作用 ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$), 化合物 **14b** 和 **14c** ($n = 2, 3$) 的抗肿瘤活性有所提高但仍劣于去氢骆驼蓬碱。随着连接臂长度继续增加, 化合物 **14d** ~ **14g** ($n = 4 \sim 7$) 的 IC_{50} 进一步降低, 特别是对 MDA-MB-231 和 HeLa 细胞的 IC_{50} 分别达到 14.02 ~ 35.30 $\mu\text{mol/L}$ 和 17.40 ~ 23.50 $\mu\text{mol/L}$, 绝大部分优于去氢骆驼蓬碱。所有偶联物中, 连接臂长度最大的化合物 **14h** ($n = 9$) 对肿瘤细胞的增殖抑制活性最强, 其对 OVCAR-3 和 HCT-116 的活性与去氢骆驼蓬碱相当, 而对 MDA-MB-231 和 HeLa 的抑制活性 ($\text{IC}_{50} = 12.79 \mu\text{mol/L}$ 和 14.36 $\mu\text{mol/L}$) 显著优于去氢骆驼蓬碱 ($\text{IC}_{50} = 28.30 \mu\text{mol/L}$ 和 34.38 $\mu\text{mol/L}$)。不同肿瘤细胞对化合物 **14h** 的敏感性不同可能与肿瘤细胞表面 GLUT1 的表达量有关。综合上述结果, 选择化合

Table 1 IC_{50} of compounds **14a**–**14h** against cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Compd.	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$			
	MDA-MB-231	HeLa	OVCAR-3	HCT-116
14a	>100	>100	>100	>100
14b	>100	77.89 \pm 4.55	53.28 \pm 3.02	29.61 \pm 2.51
14c	>100	57.82 \pm 3.04	59.63 \pm 1.99	28.38 \pm 0.97
14d	35.30 \pm 0.98	20.94 \pm 2.27	48.54 \pm 1.51	32.04 \pm 2.16
14e	21.93 \pm 0.47	17.40 \pm 4.64	41.24 \pm 3.79	30.54 \pm 3.10
14f	20.47 \pm 0.98	23.50 \pm 0.45	31.10 \pm 3.04	11.52 \pm 1.09
14g	14.02 \pm 2.01	22.87 \pm 0.13	25.27 \pm 3.87	14.08 \pm 0.82
14h	12.79 \pm 0.98	14.36 \pm 0.28	22.04 \pm 0.36	10.29 \pm 1.13
Harmine	28.30 \pm 0.47	34.38 \pm 1.71	21.02 \pm 0.26	13.86 \pm 1.80

物 **14h**, 进一步在乳腺癌细胞中考察其抗肿瘤活性和作用机制。

MTT 试验发现, 化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用呈时间 (24, 48, 72 h) 和浓度 (10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) 依赖性 (图 2-A)。为考察化合物 **14h** 中各部分结构对其抗肿瘤活性的贡献, 在 3 种浓度下 (10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$) 测定了片段

化合物 **12h** 和 **8** 对 MDA-MB-231 细胞的抑制活性, 并与化合物 **14h** 和去氢骆驼蓬碱比较 (图 2-B)。结果显示, 化合物 **12h** 和 **8** 均无显著细胞毒性, 而化合物 **14h** 的增殖抑制活性显著优于去氢骆驼蓬碱。这提示, 化合物 **14h** 的抗肿瘤活性是其结构中去氢骆驼蓬碱、连接臂、糖基片段协同作用的结果。

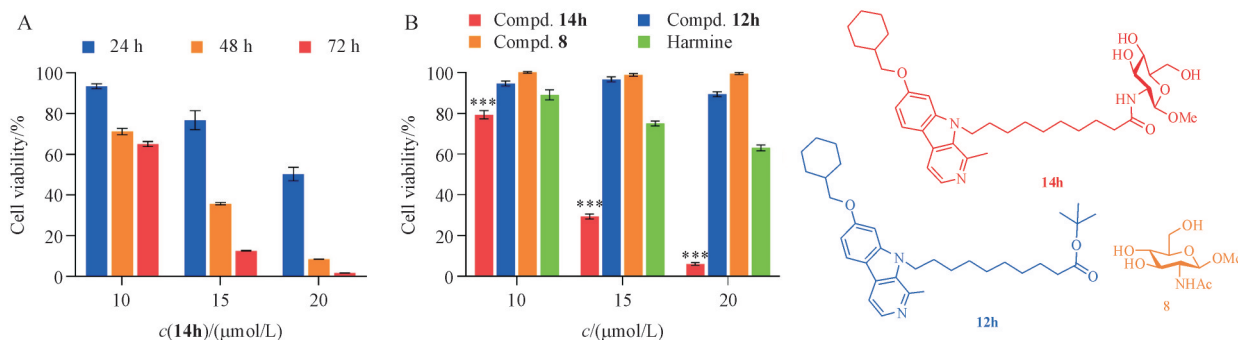


Figure 2 Cytotoxicity of compound **14h** in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: Time- and dose-dependent cytotoxicity of compound **14h** in MDA-MB-231 cells; B: Comparison of the anticancer activity of compound **14h**, **12h**, **8**, and harmine

*** $P < 0.001$ vs compd. **12h** group; *** $P < 0.001$ vs compd. **8** group; *** $P < 0.001$ vs harmine group

3.2 化合物 **14h** 中糖基的作用考察

3.2.1 水溶性测试 糖基的引入往往可以增加偶联药物的水溶性, 因此对化合物 **14h** 在纯水和 PBS (pH 7.4) 中的溶解度进行了测定。结果显示, 化合物 **14h** 在水和 PBS 中溶解度分别为 42.56 $\mu\text{g/mL}$ 和 32.31 $\mu\text{g/mL}$, 分别是去氢骆驼蓬碱的 4.5 倍和 3.8 倍 (图 3-A)。

3.2.2 抑制剂对化合物 **14h 抗肿瘤活性的影响** 为探究化合物 **14h** 的抗肿瘤活性是否依赖于糖基转运蛋白 GLUT, 用 GLUT 抑制剂根皮苷 (phlorizin) 预处理 MDA-MB-231 细胞, 考察其对化合物 **14h** 和去氢骆驼蓬碱细胞毒性的影响。结果显示, 加入根皮苷 (1 mmol/L) 后, 去氢骆驼蓬碱的 IC_{50} 提高了 0.4 倍, 而化合物 **14h** 的 IC_{50} 提高了 1.4 倍 (图 3-B)。显然, 与去氢骆驼蓬碱相比, 糖基偶联物 **14h** 的抗肿瘤活性更依赖于 GLUT, 提示 GLUT 在肿瘤细胞对化合物 **14h** 的摄取中发挥重要作用。

3.2.3 化合物 **14h 的肿瘤细胞选择性** 为考察糖基的引入是否提高了化合物 **14h** 的肿瘤细胞选择性, 分别在肿瘤细胞 MDA-MB-231 和正常细胞 MCF-10A 中测定化合物 **14h** 的增殖抑制活性。结果显示, 化合物 **14h** 对正常细胞 MCF-10A 的毒性

显著低于对 MDA-MB-231 的毒性 (图 3-C)。经 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 处理后, MCF-10A 细胞的存活率分别是 MDA-MB-231 细胞的 2.2 倍和 6.1 倍。相反, 在相同的试验中, 去氢骆驼蓬碱未显示出对肿瘤细胞和正常细胞的区分能力 (图 3-D)。

综上, 糖基的引入改善了药物的水溶性, 并利用 Warburg 效应显著提高了化合物 **14h** 对肿瘤细胞的选择性。

3.3 化合物 **14h** 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡能力考察

诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤药物的经典作用机制。通过 Annexin V-FITC/PI 双染色法和流式细胞术评价化合物 **14h** 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的能力。结果显示, 与空白组的凋亡率 (12.1%) 相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 处理过的细胞的凋亡率分别增长至 20.0% 和 29.9%。用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 处理后, 细胞凋亡率达到 37.4%, 显著高于相同浓度去氢骆驼蓬碱的凋亡诱导率 (23.9%) (图 4)。这表明, 化合物 **14h** 可浓度依赖性地诱导肿瘤细胞凋亡, 活性优于去氢骆驼蓬碱。

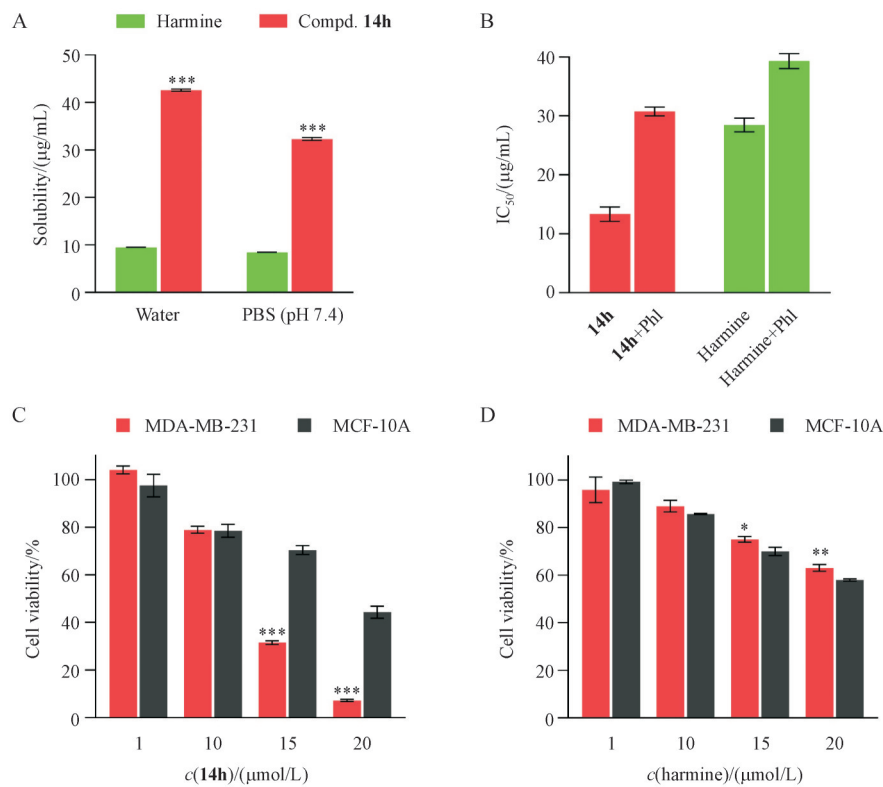


Figure 3 Roles of the carbohydrate moiety in compound **14h** ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
A: Solubility of compound **14h** and harmine in water and PBS (pH 7.4), *** $P < 0.001$ vs harmine; B: IC₅₀ values of compound **14h** and harmine in the presence or absence of phlorizin (Phl); C and D: Selectivity of compound **14h** and harmine between MDA-MB-231 and MCF-10A cells
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs MCF-10A group

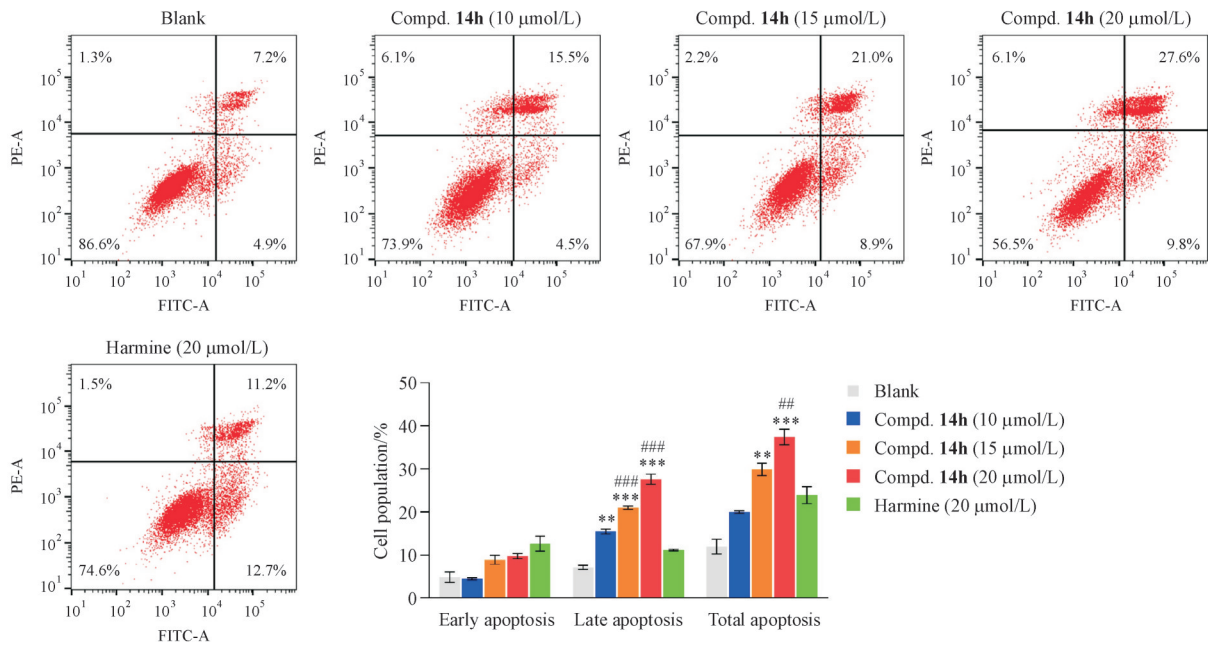


Figure 4 Apoptosis-inducing effects of compound **14h** in MDA-MB-231 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs blank group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs harmine group

3.4 化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响

抗肿瘤药物通常可以通过诱导细胞周期阻滞来发挥作用。通过 PI 染色法和流式细胞术测试化合物 **14h** 和去氢骆驼蓬碱对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响。结果显示,与空白组相比,20 $\mu\text{mol/L}$ 的去氢骆驼蓬碱处理细胞后,S 期的细胞比例由 46.0% 上升至 59.8% (图 5),说明去氢骆驼蓬碱可将细胞周期阻滞在 S 期。与去氢骆驼蓬碱不同,10 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **14h** 处理细胞后, G_0/G_1 期的细胞比例明显增加,分别上升至 38.3%、52.3% 和 67.1%。因此,化合物 **14h** 可浓度依赖性地将 MDA-MB-231 细胞阻滞在 G_0/G_1 期。

3.5 化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞 EMT 的影响

上皮-间充质转化(EMT)是肿瘤细胞侵袭和转移的重要原因。EMT 发生时,上皮细胞表型标志物 E-cadherin 表达下调,而介导细胞黏附功能的 N-cadherin、核转录因子 Twist1 以及 Twist1 发挥

协同效应的 Bcl-2 表达上调。为考察化合物 **14h** 对肿瘤细胞 EMT 的影响,采用 Western blot 测定相关蛋白的表达。结果显示,化合物 **14h** 浓度依赖性地增加了 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 的表达,同时降低了 N-cadherin、Twist1 和 Bcl-2 的表达(图 6-A)。相同浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)下,化合物 **14h** 对 EMT 相关蛋白表达的影响大于去氢骆驼蓬碱。

3.6 化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响

肿瘤细胞的迁移能力与肿瘤侵袭和转移密切相关。通过划痕试验进一步评估了化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响。在创面形成 12 h 后,空白组随着细胞迁移创面面积减少 25.9%。化合物 **14h** 浓度依赖性地减缓 MDA-MB-231 细胞的创面愈合速度(图 6-B)。经 20 $\mu\text{mol/L}$ 化合物 **14h** 处理后,单层细胞的创面面积在 12 h 内无明显变化(0.32%),而相同浓度下去氢骆驼蓬碱组的创面面积减少 17.7%。以上结果提示,化合物 **14h** 对 MDA-MB-231 细胞迁移的抑制能力优于去氢骆驼蓬碱。

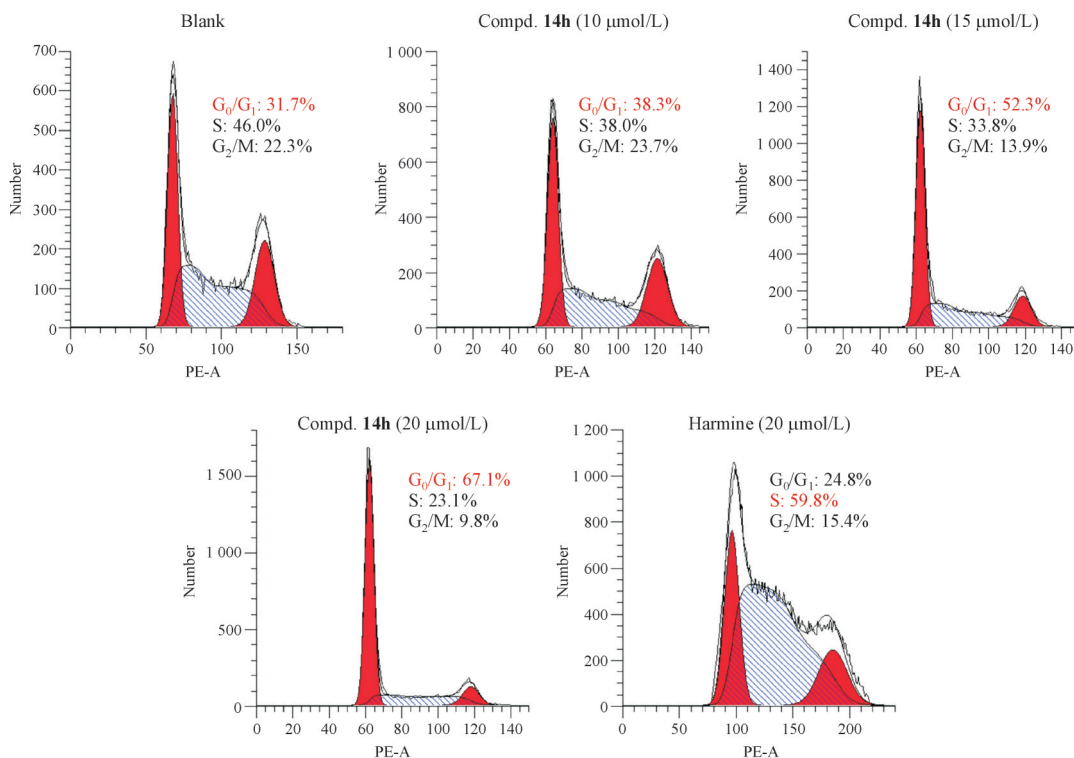


Figure 5 Effects of compound **14h** on the cell cycle distribution of MDA-MB-231 cell lines

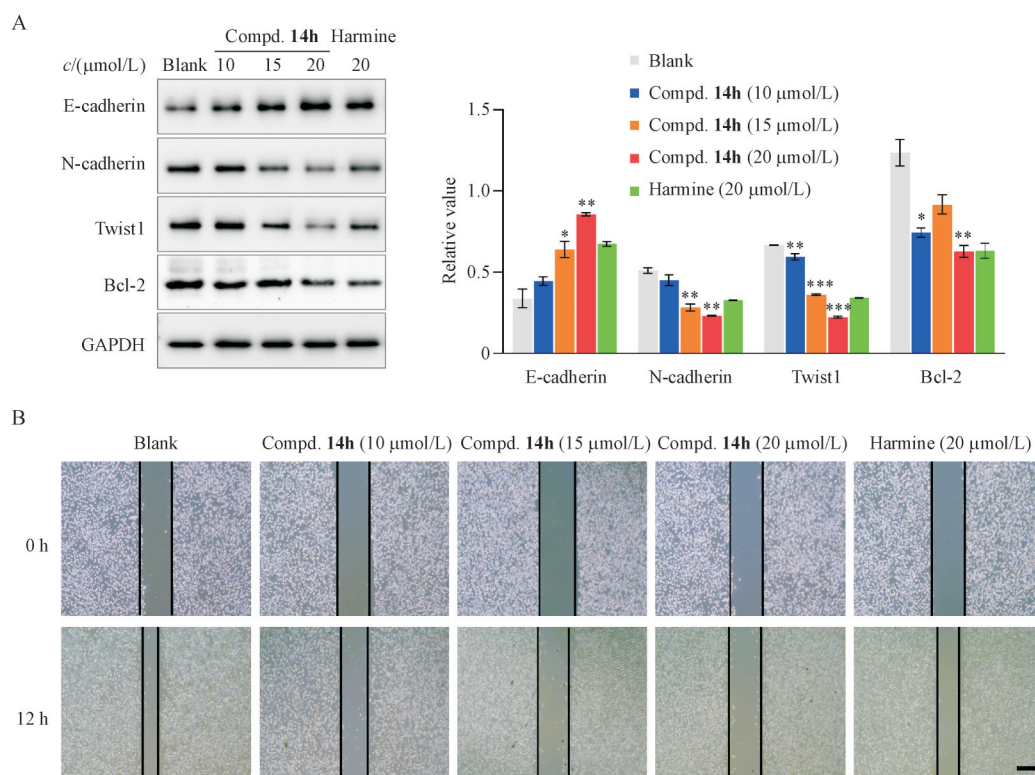


Figure 6 Effects of compound **14h** on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and migration of MDA-MB-231 cells

A: Western blot analysis of the expression of E-cadherin, N-cadherin, Twist1, and Bcl-2 in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs blank group; B: Inhibitory effects of compound **14h** on migration of MDA-MB-231 cells by wound healing test, scale bar: 300 μm

4 结 论

本研究设计并合成了天然产物去氢骆驼蓬碱的N⁹位糖基偶联物并重点考察连接臂长度对偶联物抗肿瘤活性的影响。MTT筛选发现,偶联物的抗肿瘤活性随连接臂中烷基链长度的增加而提高。化合物**14h**的抗肿瘤活性最佳,对MDA-MB-231细胞的增殖抑制活性显著优于去氢骆驼蓬碱。进一步研究发现,与去氢骆驼蓬碱相比,糖基的引入改善了化合物**14h**的水溶性,并提高了化合物**14h**对肿瘤细胞的选择性,提示糖基偶联物**14h**可利用Warburg效应更好地靶向肿瘤细胞。机制研究发现,化合物**14h**可诱导MDA-MB-231细胞凋亡,阻滞细胞周期于G₀/G₁期,并通过抑制EMT信号通路抑制肿瘤细胞的迁移。后续将围绕化合物**14h**开展进一步的结构优化以期获得成药性更佳的去氢骆驼蓬碱衍生物用于肿瘤治疗。

References

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. CA

Cancer J Clin, 2020, **70**(1): 7-30.

- [2] Yang GX, Xiong J, Hu JF. 2017's advanced natural products chemistry researches in China(1)[J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2018, **49**(5): 511-520.
- [3] Alam MM, Malebari AM, Syed N, et al. Design, synthesis and molecular docking studies of thymol based 1, 2, 3-triazole hybrids as thymidylate synthase inhibitors and apoptosis inducers against breast cancer cells[J]. Bioorg Med Chem, 2021, **38**: 116136.
- [4] Wang HB, He Y, Jian ML, et al. Breaking the bottleneck in anti-cancer drug development: efficient utilization of synthetic biology[J]. Molecules, 2022, **27**(21): 7480.
- [5] Kumar K, Wang P, Wilson J, et al. Synthesis and biological validation of a harmine-based, central nervous system (CNS)-avoidant, selective, human β -cell regenerative dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase A (DYRK1A) inhibitor [J]. J Med Chem, 2020, **63**(6): 2986-3003.
- [6] Zhu YG, Lv YX, Guo CY, et al. Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway[J]. Life Sci, 2021, **270**: 119112.
- [7] Zhang L, Li DC, Yu SL. Pharmacological effects of harmine and its derivatives: a review[J]. Arch Pharm Res, 2020, **43**(12): 1259-1275.

- [8] Lakshmi Manasa K, Thatikonda S, Sigalapalli DK, *et al.* Design and synthesis of β -carboline linked aryl sulfonyl piperazine derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability[J]. *Bioorg Chem*, 2020, **101**: 103983.
- [9] Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis[J]. *Cells*, 2021, **10**(7): 1587.
- [10] Zhao TM, Yang Y, Yang J, *et al.* Harmine-inspired design and synthesis of benzo[d]imidazo[2, 1-b]thiazole derivatives bearing 1, 3, 4-oxadiazole moiety as potential tumor suppressors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, **46**: 116367.
- [11] He JR, Chen SS, Yu T, *et al.* Harmine suppresses breast cancer cell migration and invasion by regulating TAZ-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Am J Cancer Res*, 2022, **12**(6): 2612-2626.
- [12] Nafie E, Lolarga J, Lam B, *et al.* Harmine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inducing the degradation of Twist1[J]. *PLoS One*, 2021, **16**(2): e0247652.
- [13] Lu DH, Qu LL, Wang C, *et al.* Harmine-based dual inhibitors targeting histone deacetylase (HDAC) and DNA as a promising strategy for cancer therapy[J]. *Bioorg Chem*, 2022, **120**: 105604.
- [14] Du HT, Tian S, Chen JC, *et al.* Synthesis and biological evaluation of N⁹-substituted harmine derivatives as potential anticancer agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, **26**(16): 4015-4019.
- [15] Tang L. Design, synthesis and antitumor activity *in vitro* of derivatives of harmine N⁹-cinnamic acid(去氢骆驼蓬碱 N⁹位-肉桂酸衍生物的设计、合成与体外抗肿瘤活性研究)[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2020.
- [16] Filali I, Bouajila J, Znati M, *et al.* Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, **30**(3): 371-376.
- [17] Frédérick R, Bruyère C, Vancraeynest C, *et al.* Novel trisubstituted harmine derivatives with original *in vitro* anticancer activity[J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(14): 6489-6501.
- [18] Fu JJ, Yang JX, Seeberger PH, *et al.* Glycoconjugates for glucose transporter-mediated cancer-specific targeting and treatment[J]. *Carbohydr Res*, 2020, **498**: 108195.
- [19] Zhang XR, Ruan Q, Jiang YH, *et al.* Evaluation of ^{99m}Tc-CN5DG as a broad-spectrum SPECT probe for tumor imaging [J]. *Transl Oncol*, 2021, **14**(1): 100966.
- [20] Wang HF, Yang XD, Zhao CL, *et al.* Glucose-conjugated platinum(IV) complexes as tumor-targeting agents: design, synthesis and biological evaluation[J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, **27**(8): 1639-1645.
- [21] Chen F, Huang GL. Application of glycosylation in targeted drug delivery[J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **182**: 111612.
- [22] Cao J, Cui SS, Li SW, *et al.* Targeted cancer therapy with a 2-deoxyglucose-based adriamycin complex[J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(4): 1362-1373.
- [23] Punganuru SR, Mostofa AGM, Madala HR, *et al.* Potent anti-proliferative actions of a non-diuretic glucosamine derivative of ethacrynic acid[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, **26**(12): 2829-2833.
- [24] Wang SQ, Chen YT, Xia C, *et al.* Synthesis and evaluation of glycosylated quercetin to enhance neuroprotective effects on cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, **73**: 117008.
- [25] He QL, Minn I, Wang QL, *et al.* Targeted delivery and sustained antitumor activity of triptolide through glucose conjugation[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, **55**(39): 12035-12039.
- [26] Henderson AS, Medina S, Bower JF, *et al.* Nucleophilic aromatic substitution (S_NAr) as an approach to challenging carbohydrate-aryl ethers[J]. *Org Lett*, 2015, **17**(19): 4846-4849.