

鬼臼毒素衍生物的合成及细胞毒活性研究

田丹丽¹, 梁春坡², 陈虹^{3*}

1. 天津市第一中心医院, 天津 300192

2. 天津医科大学总医院, 天津 300052

3. 武警后勤学院 生药学教研室, 天津 300309

摘要: 目的 基于鬼臼毒素进行结构修饰, 并对得到的衍生物进行体外抗肿瘤活性评价。方法 以鬼臼毒素和醛类化合物为起始原料, 经多步反应合成目标化合物, 并采用 MTT 法测试所有的目标化合物对人宫颈癌 HeLa 细胞、人慢性髓性白血病急变期 K562 细胞及其阿霉素耐药株 K562/A02 的体外抗肿瘤活性。结果 合成了 11 个文献未报道的鬼臼毒素衍生物, 其结构经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、HR-ESI-MS 及熔点测定分析确证。抗肿瘤活性筛选结果表明所有目标化合物均具有不同程度的体外细胞毒活性, 大部分化合物对耐药的 K562 细胞具有较好的细胞毒活性。结论 通过对鬼臼毒素进行结构修饰, 能够增强其抗肿瘤活性。

关键词: 鬼臼毒素; 抗肿瘤活性; 构效关系; 结构修饰; 衍生物; 细胞毒活性

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4281-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.005

Synthesis and cytotoxic activities of podophyllotoxin derivatives

TIAN Dan-li¹, LIANG Chun-po², CHEN Hong³

1. Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

2. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

3. Pharmacognosy Division, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To modify the structure of podophyllotoxin derivatives and evaluate the antitumor activities of the derivatives.

Methods The target compounds were synthesized by multi-step reaction with podophyllotoxin and aldehyde compound as starting material. MTT assay was used to test antitumor activity of all the target compounds on Hela cells, K562 cells, and K562/A02 cell.

Results Eleven novel derivatives were synthesized which had not been reported in any literature and the structures were characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HR-ESI-MS and melting point determination analysis. The antitumor activity screening results showed that all the target compounds had different degrees of cytotoxic activity *in vitro*. Most of the compounds had significant anti-MDR activity *in vitro*. **Conclusion** Through structural modification of podophyllotoxin derivatives, the antineoplastic activities are enhanced.

Key words: podophyllotoxin; antitumor activity; structure-activity relationship; structure modification; derivatives; cytotoxic activities

鬼臼毒素及相关木脂素是一类具有显著细胞毒活性的天然活性物质, 主要来源于小檗科的八角莲属、桃儿七属和山荷叶属及大麻科和柏科的少数科属中^[1]。研究表明, 鬼臼毒素具有抗癌、抗病毒、抗炎、杀虫等多种生物活性, 其中抗肿瘤活性最为显著^[2-3]。由于鬼臼毒素严重的毒副作用, 如对正常细胞的损伤太大, 引起胃肠不适等, 在使用上受到了很大的限制^[4]。从 20 世纪 50 年代开始, 很多机构开始对鬼臼毒素进行结构改造。其中以 β -糖基取

代的衍生物依托泊苷(etoposide, VP-16)和替尼泊苷(teniposide, VM-26)为代表, 广泛应用于临床, 对乳腺癌、睾丸癌、小细胞肺癌等多种癌症均有良好的治疗效果^[5]。然而, 在临床应用中发现 VP-16 和 VM-26 仍然有其局限性, 存在水溶性差、骨髓抑制、出现多药耐药性等缺点^[6]。为进一步寻找高效低毒的抗肿瘤新药, 增加鬼臼毒素的临床应用价值, 人们对鬼臼毒素的结构改造工作仍在不断地进行, 主要围绕着提高药物水溶性、降低毒性以及多

收稿日期: 2019-03-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873363)

作者简介: 田丹丽, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药物分子的设计与合成和活性研究。E-mail: 279050230@qq.com

*通信作者 陈虹, 女, 教授, 研究方向为天然产物的结构改造及活性研究。Tel: (022)84876771 E-mail: chen hongtian06@163.com

药耐药性等方面开展研究。随着分子药理学对肿瘤本质的逐步阐明,鬼臼毒素及其衍生物的抗肿瘤机制、结构修饰及构效关系等方面的研究也取得了很大的进展^[7]。构效关系研究表明保留反式内酯环的基础上,C-4 位是比较有效的修饰位点,新型 4 β -鬼臼毒素衍生物,尤其是 4 β -N 取代物的合成和药理活性分析是目前研究的热点。近年来本课题组一直致力于新型鬼臼毒素衍生物的研究,在分析鬼臼毒素类化合物构效关系的基础上,保留 C-4 位取代基的 β 构型及反式内酯环构向,集中在 C-4 位上设计并合成了很多 4 β -氮取代鬼臼毒素衍生物,其中一些表现出良好的抗癌活性和抗多药耐药性^[8-10]。而 Ahmed Kamal 小组将鬼臼毒素 C-4 位羟基用含不同取代基的苯胺取代,合成的一系列鬼臼毒素衍生物均具有较好的抗肿瘤活性,尤其是 4-4'-去甲脱氧表鬼臼毒素和对氟苯胺生成的 NPF,与对硝基苯胺生成的 GL331,作为抗肿瘤新药已进入临床研究^[11-12]。因此,本实验利用电子等排原理,运用药物设计的拼合原理,变换鬼臼毒素 4 α -羟基成 4 β -氨基得 4 β -氨基-4-脱氧表鬼臼毒素,然后与取代苯甲醛类化合物反应生成亚胺类化合物,最后还原成 4 β -取代苯胺类鬼臼毒素衍生物。以探讨在鬼臼毒素 C-4 位增加 1 个碳原子变成不同类型取代苯胺的鬼臼毒素衍

生物与 GL331 类似物相比,对抗肿瘤活性的影响,以期发现具有深入研究价值的新型抗肿瘤化合物,为中药新药的研发奠定基础。

1 仪器与试药

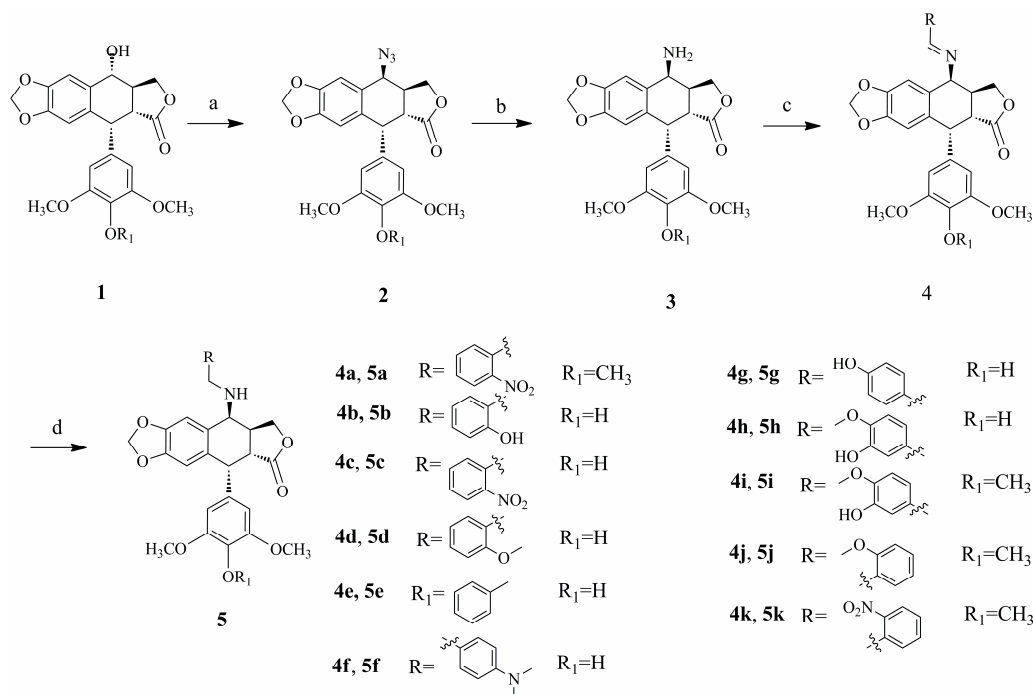
核磁共振光谱用 Bruker Advance 2B/400(德国)或 Varian Mercury Vx300 核磁共振光谱仪,采用 CDCl₃ 为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标。质谱用 Agilent 6210 LC-TOF 型(德国)质谱仪测定。薄层色谱(TLC)和柱色谱分别采用青岛海洋化工公司 GF254 硅胶和 60~100、200~300 目硅胶。鬼臼毒素(98%)购自南京青泽医药科技开发有限公司。除特殊说明外,其余试剂均为市售分析纯或化学纯产品。

2 衍生物的合成

以鬼臼毒素或 4'-去甲鬼臼毒素为起始原料 **1**,在酸性条件下,鬼臼毒素或 4'-去甲鬼臼毒素与叠氮钠发生取代反应得中间体 **2**,中间体 **2** 在 10% Pd/C 催化下被甲酸铵还原得到中间体 **3**,中间体 **3** 与醛类化合物在冰乙酸的催化下脱水得到亚胺类化合物 **4**,化合物 **4** 再在 NaBH₄ 作用下还原成目标化合物 **5**。合成路线见图 1。

2.1 4 β -叠氮-4-脱氧表鬼臼毒素或 4 β -叠氮-4-4'-去甲-脱氧表鬼臼毒素(中间体 **2**)的合成

将 10 mmol 鬼臼毒素或 4'-去甲鬼臼毒素溶于



a-CH₂Cl₂, NaN₃, CF₃COOH, 0—50 °C, 4 h; b-CH₃COOC₂H₅, 10% Pd/C, HCOONH₄, reflux, 5 h; c-methanol anhydrous, acetic acid glacial, rt, 1—8 h; d-methanol anhydrous, NaBH₄, 0 °C, 3—5 h

图 1 目标化合物 **5a-5k** 的合成

Fig. 1 Synthetic routes of target compounds **5a-5k**

50 mL 干燥二氯甲烷中, 小心加入 NaN_3 (2.60 g, 40 mmol) 搅拌使其溶解, 冰浴下将 10 mL CF_3COOH 缓慢滴加到反应液中, 反应 1 h 后撤冰浴, 回流 4 h。TLC 检测反应基本完成, 冰浴下, 滴入 NaHCO_3 饱和溶液至无气泡为止, 分出有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸干, 粗品用二氯甲烷-醋酸乙酯 (1:1) 重结晶, 得白色晶体 3.99 g, 收率 89%。

2.2 4β-氨基-4-脱氧表鬼臼毒素或 4β-氨基-4-4'-去甲-脱氧表鬼臼毒素 (中间体 3) 的合成

将 10 mmol 中间体 2 溶于 50 mL 醋酸乙酯中, 加入 10% Pd/C (1.00 g)、 HCOONH_4 (2.52 g, 40 mmol), 加热回流搅拌 5 h, TLC 检测反应完全, 过滤回收 Pd/C, 滤液用饱和食盐水洗 3 遍, 减压蒸干得白色泡沫状固体粗产物 3.63 g, 收率 88%, 不经进一步分离纯化可直接用于下一步反应。

2.3 亚胺类鬼臼毒素衍生物 (中间体 4) 的合成 (通法)

将 2.4 mmol 醛类化合物、2 mmol 中间体 3 溶于 20 mL 无水甲醇中, 加入几滴冰乙酸, 室温搅拌反应 1~8 h, TLC 检测反应完全, 停止反应, 抽滤, 用 10 mL 无水甲醇洗涤得到中间体 4。总收率为 70%~95%。由此方法可以得到中间体化合物 4a~4d。

2.4 目标化合物 5 的合成及鉴定

2.4.1 目标化合物 5a~5d 合成 (通法) 将 1 mmol 上述合成亚胺类化合物 4a~4d, 溶于 15 mL 无水甲醇中, 加入 NaBH_4 (0.15 g, 4 mmol), 冰浴下搅拌反应 3~5 h, TLC 检测反应完全, 加入 5% HCl 调 pH 至中性, 停止反应, 室温搅拌 30 min, 减压过滤得粗品。粗品用二氯甲烷-醋酸乙酯 (1:1) 重结晶, 得白色晶体, 总收率为 65%~75%。

化合物 5a: 白色固体, 收率 75%, mp 200~204 °C; HR-ESI-MS m/z : 549.187 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 理论值 549.187 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.95~3.03 (1H, m, H-2), 3.11~3.17 (1H, m, H-3), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.99~4.00 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-11β), 4.03~4.17 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 4.37~4.40 (2H, m, H-1, 11α), 4.58~4.60 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-4), 5.97 (1H, s, β-OCH₂O), 5.98 (1H, s, α-OCH₂O), 6.23 (2H, s, H-2', 6'), 6.51 (1H, s, H-8), 6.76 (1H, s, H-5), 6.82~6.89 (2H, m, Ar-H-4'', 5''), 7.08~7.11 (1H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H-3''), 7.18~7.21 (1H, d, J = 7.9 Hz, Ar-H-6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 40.6 (C-1), 43.1 (C-2), 36.6 (C-3), 66.8 (C-4), 109.3

(C-5), 147.1 (C-6), 147.8 (C-7), 109.5 (C-8), 129.7 (C-9), 132.6 (C-10), 67.4 (C-11), 174.2 (C-12), 133.8 (C-1'), 107.3 (C-2'), 156.1 (C-3'), 132.7 (C-4'), 156.1 (C-5'), 107.8 (C-6'), 100.5 (OCH₂O), 55.3 (3', 5'-OCH₃), 59.8 (4'-OCH₃), 146.4 (C-1''), 156.1 (C-2''), 123.5 (C-3''), 128.4 (C-4''), 146.9 (C-5''), 128.9 (C-6''), 66.9 (NHCH₂)。

化合物 5b: 白色固体, 收率 65%, mp 249~258 °C; HR-ESI-MS m/z : 506.181 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 理论值 506.181 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.95~3.03 (1H, m, H-2), 3.11~3.17 (1H, m, H-3), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.99~4.00 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-11β), 4.03~4.17 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 4.37~4.40 (2H, m, H-1, 11α), 4.58~4.60 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-4), 5.97 (1H, s, β-OCH₂O), 5.98 (1H, s, α-OCH₂O), 6.23 (2H, s, H-2', 6'), 6.51 (1H, s, H-8), 6.76 (1H, s, H-5), 6.82~6.89 (2H, m, Ar-H-4'', 5''), 7.08~7.11 (1H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H-3''), 7.18~7.21 (1H, d, J = 7.91 Hz, Ar-H-6''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 41.1 (C-1), 43.4 (C-2), 37.3 (C-3), 67.3 (C-4), 109.8 (C-5), 145.9 (C-6), 146.8 (C-7), 107.0 (C-8), 129.4 (C-9), 130.5 (C-10), 67.3 (C-11), 172.6 (C-12), 132.48 (C-1'), 107.43 (C-2'), 155.7 (C-3'), 132.9 (C-4'), 155.8 (C-5'), 107.4 (C-6'), 100.6 (OCH₂O), 56.0 (3', 5'-OCH₃), 120.6 (C-1''), 145.0 (C-2''), 115.6 (C-3''), 128.3 (C-4''), 118.8 (C-5''), 129.0 (C-6''), 55.0 (NHCH₂)。

化合物 5c: 白色固体, 收率 75%, mp 281~284 °C; HR-ESI-MS m/z : 533.157 8 $[\text{M}-\text{H}]^+$, 理论值: 533.157 3 $[\text{M}-\text{H}]^+$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.50~1.81 (1H, m, 4'-NH), 3.07~3.19 (1H, m, H-2), 3.70~3.72 (1H, m, H-3), 3.79 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.75~3.84 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 4.01~4.07 (1H, m, H-11β), 4.29~4.34 (1H, m, H-11α), 4.69~4.71 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-1), 4.72~4.74 (1H, d, J = 4.2 Hz, H-4), 5.43 (1H, s, 4'-OH), 5.91 (1H, d, J = 1.3 Hz, β-OCH₂O), 5.97 (1H, d, J = 1.3 Hz, α-OCH₂O), 6.37 (2H, s, H-2', 6'), 6.55 (1H, s, H-8), 6.66 (1H, s, H-5), 7.56~7.62 (1H, m, Ar-H-6''), 7.64~7.69 (1H, m, Ar-H-4''), 7.95~7.98 (1H, m, Ar-H-5''), 8.04~8.07 (1H, m, Ar-H-3''); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 40.7 (C-1), 43.0 (C-2), 36.5 (C-3), 66.9 (C-4), 109.5 (C-5), 147.1 (C-6), 147.8 (C-7), 106.9 (C-8), 129.7

(C-9), 131.2 (C-10), 66.9 (C-11), 174.2 (C-12), 133.0 (C-1'), 107.7 (C-2'), 156.0 (C-3'), 132.7 (C-4'), 156.0 (C-5'), 107.7 (C-6'), 100.5 (OCH₂O), 55.5 (3', 5'-OCH₃), 146.4 (C-1''), 146.4 (C-2''), 123.5 (C-3''), 128.3 (C-4''), 145.4 (C-5''), 128.9 (C-6''), 66.9 (NHCH₂)。

化合物 **5d**: 白色固体, 收率 68%, mp 233~236 °C; HR-ESI-MS m/z : 520.197 0 [M+H]⁺, 理论值 520.197 5 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.50~1.65 (1H, m, 4'-NH), 2.69~2.81 (1H, m, H-2), 3.34~3.40 (1H, m, H-3), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.86 (3H, s, 2''-OCH₃), 3.62~3.86 (3H, m, 4'-NH-CH₂, H-11 β), 4.35~4.39 (2H, m, H-1, 11 α), 4.49~4.51 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-4), 5.38 (1H, s, 4'-OH), 5.91 (2H, s, α , β -OCH₂O), 6.25 (3H, s, H-8, 2', 6'), 6.43 (1H, s, H-5), 6.93~7.01 (2H, m, Ar-H-3'', 5''), 7.25~7.34 (2H, m, Ar-H-4'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.4 (C-1), 44.4 (C-2), 39.5 (C-3), 57.2 (C-4), 110.2 (C-5), 147.0 (C-6), 147.6 (C-7), 110.8 (C-8), 129.3 (C-9), 132.6 (C-10), 69.3 (C-11), 175.2 (C-12), 134.0 (C-1'), 108.3 (C-2'), 156.1 (C-3'), 132.6 (C-4'), 156.1 (C-5'), 108.6 (C-6'), 101.6 (OCH₂O), 56.0 (3', 5'-OCH₃), 120.9 (C-1''), 157.4 (C-2''), 110.8 (C-3''), 127.7 (C-4''), 123.9 (C-5''), 129.3 (C-6''), 51.3 (NHCH₂), 55.6 (OCH₃)。

2.4.2 目标化合物 5e~5k 合成 (通法) 将 1.2 mmol 醛类化合物、1 mmol 中间体 **3**, 溶于 15 mL 无水甲醇中, 加入几滴冰乙酸, 室温搅拌反应 1~8 h, TLC 检测反应完全, 无需处理, 直接加入 NaBH₄ (0.23 g, 6 mmol), 冰浴下搅拌反应 3~5 h, TLC 检测反应完全, 加入 5% HCl 调 pH 至中性, 停止反应, 室温搅拌 30 min, 减压干燥, 蒸除无水甲醇, 剩余液用二氯甲烷萃取, 萃取液水洗 3 遍, 无水 NaSO₄ 干燥, 蒸干得粗品。粗品经柱色谱分离 (石油醚-醋酸乙酯) 纯化得产品。总收率为 55%~75%。

化合物 **5e**: 白色固体, 收率 70%, mp 199~201 °C; HR-ESI-MS m/z : 512.317 3 [M+H]⁺, 理论值 512.317 1 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.72~2.84 (1H, m, H-2), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.81~3.87 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 3.29~3.35 (1H, m, H-3), 3.91~3.92 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-11 β), 4.27~4.38 (2H, m, H-1, 11 α), 4.51~4.53 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-4), 5.91 (1H, d, J = 1.2 Hz, β -OCH₂O), 5.93 (1H, d,

J = 1.2 Hz, α -OCH₂O), 6.26 (2H, s, H-2', 6'), 6.44 (1H, s, H-8), 6.51 (1H, s, H-5), 7.26~7.39 (5H, m, Ar-H-2''~6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 40.5 (C-1), 42.5 (C-2), 37.6 (C-3), 55.4 (C-4), 109.2 (C-5), 146.2 (C-6), 146.6 (C-7), 107.3 (C-8), 130.6 (C-9), 130.2 (C-10), 67.6 (C-11), 174.5 (C-12), 138.7 (C-1'), 106.9 (C-2'), 145.3 (C-3'), 132.9 (C-4'), 145.3 (C-5'), 106.9 (C-6'), 100.3 (OCH₂O), 55.4 (3', 5'-OCH₃), 131.6 (C-1''), 127.7 (C-2''), 127.3 (C-3''), 126.5 (C-4''), 127.3 (C-5''), 127.7 (C-6''), 54.5 (NHCH₂)。

化合物 **5f**: 白色固体, 收率 55%, mp 158~163 °C; HR-ESI-MS m/z : 533.230 5 [M+H]⁺, 理论值 533.230 9 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.70~2.84 (1H, m, H-2), 2.95 (6H, s, 4''-NCH₃), 3.75 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.72~3.82 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 3.29~3.35 (1H, m, H-3), 3.91~3.92 (1H, d, J = 3.8 Hz, H-11 β), 4.26~4.40 (2H, m, H-1, 11 α), 4.49~4.51 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-4), 5.91 (1H, s, β -OCH₂O), 5.93 (1H, s, α -OCH₂O), 6.26 (2H, s, H-2', 6'), 6.44 (1H, s, H-8), 6.55 (1H, s, H-5), 6.71~6.74 (2H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H-3'', 5''), 7.18~7.21 (2H, d, J = 8.5 Hz, Ar-H-2'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.4 (C-1), 44.4 (C-2), 39.5 (C-3), 57.1 (C-4), 110.4 (C-5), 147.1 (C-6), 147.5 (C-7), 108.6 (C-8), 131.3 (C-9), 130.6 (C-10), 69.3 (C-11), 175.3 (C-12), 133.9 (C-1'), 108.2 (C-2'), 146.2 (C-3'), 132.8 (C-4'), 146.2 (C-5'), 108.2 (C-6'), 101.6 (OCH₂O), 55.8 (3', 5'-OCH₃), 128.9 (C-1''), 129.4 (C-2''), 112.9 (C-3''), 150.0 (C-4''), 112.9 (C-5''), 129.4 (C-6''), 54.9 (NHCH₂), 41.5 (2×NHCH₃)。

化合物 **5g**: 白色固体, 收率 60%, mp 169~172 °C; HR-ESI-MS m/z : 506.181 1 [M+H]⁺, 理论值 506.181 6 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.04~2.21 (1H, m, 4'-NH), 2.75~2.89 (1H, m, H-2), 3.30~3.39 (1H, m, H-3), 3.77 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.77~3.86 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 3.90~3.91 (1H, d, J = 3.7 Hz, H-11 β), 4.28~4.39 (2H, m, H-1, 11 α), 4.49~4.51 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-4), 5.90 (1H, s, β -OCH₂O), 5.92 (1H, s, α -OCH₂O), 6.25 (2H, s, H-2', 6'), 6.43 (1H, s, H-8), 6.53 (1H, s, H-5), 6.79~6.82 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H-3'', 5''), 7.18~7.21 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H-2'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.4 (C-1), 44.4 (C-2), 39.6 (C-3), 57.2 (C-4), 110.0 (C-5), 147.1 (C-6), 147.5 (C-7), 108.5

(C-8), 131.2 (C-9), 131.6 (C-10), 69.4 (C-11), 175.5 (C-12), 133.9 (C-1'), 108.2 (C-2', 6'), 132.6 (C-4'), 155.1 (C-3'), 101.6 (OCH₂O), 56.0 (3', 5'-OCH₃), 129.7 (C-1''), 146.2 (C-2''), 110.4 (C-3''), 131.6 (C-4''), 115.7 (C-5''), 131.2 (C-6''), 54.9 (NHCH₂)。

化合物 **5h**: 白色固体, 收率 73%, mp 192~196 °C; HR-ESI-MS m/z : 536.189 0 [M+H]⁺, 理论值 536.189 7 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.74~2.85 (1H, m, H-2), 3.29~3.36 (1H, m, H-3), 3.76 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.91 (3H, s, 4''-OCH₃), 3.69~3.80 (3H, m, H-11 β , 4'-NH-CH₂), 4.30~4.39 (2H, m, H-1, 11 α), 4.52~4.54 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-4), 5.92~5.94 (2H, d, J = 3.3 Hz, α , β -OCH₂O), 6.26 (2H, s, H-2', 6'), 6.48 (1H, s, H-8), 6.57 (1H, s, H-5), 6.82~6.91 (3H, m, Ar-H-2'', 5'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.4 (C-1), 44.4 (C-2), 39.5 (C-3), 59.2 (C-4), 110.4 (C-5), 147.1 (C-6), 147.5 (C-7), 108.6 (C-8), 131.2 (C-9), 132.6 (C-10), 69.2 (C-11), 175.2 (C-12), 133.9 (C-1'), 108.2 (C-2', 6'), 146.6 (C-3'), 132.6 (C-4'), 146.6 (C-5'), 101.7 (OCH₂O), 56.7 (3', 5'-OCH₃), 131.6 (C-1''), 111.0 (C-2''), 145.0 (C-3''), 146.2 (C-4''), 114.6 (C-5''), 121.4 (C-6''), 55.3 (NHCH₂), 56.04 (OCH₃)。

化合物 **5i**: 白色固体, 收率 75%, mp 198~203 °C; HR-ESI-MS m/z : 550.208 9 [M+H]⁺, 理论值 550.208 5 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.75~2.86 (1H, m, H-2), 3.30~3.37 (1H, m, H-3), 3.72 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.91 (3H, s, 4''-OCH₃), 3.48~4.46 (1H, m, H-11 β), 3.70~3.80 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 4.31~4.39 (2H, m, H-1, 11 α), 4.52~4.54 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-4), 5.92~5.94 (2H, d, J = 3.7 Hz, α , β -OCH₂O), 6.25 (2H, s, H-2', 6'), 6.45 (1H, s, H-8), 6.58 (1H, s, H-5), 6.80~6.90 (3H, m, Ar-H-2'', 5'', 6''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.3 (C-1), 44.6 (C-2), 39.5 (C-3), 59.2 (C-4), 110.4 (C-5), 147.2 (C-6), 147.6 (C-7), 108.5 (C-8), 131.5 (C-9), 132.5 (C-10), 69.2 (C-11), 175.1 (C-12), 137.0 (C-1'), 108.6 (C-2', 6'), 152.3 (C-3'), 135.7 (C-4'), 152.3 (C-5'), 101.7 (OCH₂O), 56.7 (3', 5'-OCH₃), 61.4 (4'-OCH₃), 131.5 (C-1''), 111.0 (C-2''), 145.0 (C-3''), 146.6 (C-4''), 114.6 (C-5''), 121.4 (C-6''), 55.3 (NHCH₂), 56.1 (OCH₃)。

化合物 **5j**: 白色固体, 收率 65%, mp 207~210

°C; HR-ESI-MS m/z : 534.364 9 [M+H]⁺, 理论值 534.364 6 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.50~1.80 (1H, m, 4'-NH), 2.69~2.83 (1H, m, H-2), 3.35~3.42 (1H, m, H-3), 3.72 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.72~3.85 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 3.86 (3H, s, 2''-OCH₃), 3.78 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.64~3.93 (1H, m, H-11 β), 4.37~4.44 (2H, m, H-1, 11 α), 4.50~4.51 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-4), 5.91 (2H, s, α , β -OCH₂O), 6.25 (2H, s, H-2', 6'), 6.27 (1H, s, H-8), 6.42 (1H, s, H-5), 6.93~6.99 (2H, m, Ar-H-3'', 5''), 7.22~7.24 (1H, d, J = 9.2 Hz, Ar-H-6''); 7.29~7.35 (1H, m, Ar-H-4''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.2 (C-1), 44.6 (C-2), 39.7 (C-3), 56.9 (C-4), 110.2 (C-5), 147.1 (C-6), 147.4 (C-7), 110.8 (C-8), 129.1 (C-9), 132.7 (C-10), 69.3 (C-11), 175.3 (C-12), 137.0 (C-1'), 108.5 (C-2'), 152.3 (C-3'), 135.8 (C-4'), 152.3 (C-5'), 108.6 (C-6'), 101.6 (OCH₂O), 56.0 (3', 5'-OCH₃), 61.4 (4'-OCH₃), 120.7 (C-1''), 157.4 (C-2''), 110.8 (C-3''), 127.7 (C-4''), 123.9 (C-5''), 129.3 (C-6''), 51.3 (NHCH₂), 55.7 (OCH₃)。

化合物 **5k**: 白色固体, 收率 75%, mp 187~192 °C; HR-ESI-MS m/z : 549.187 7 [M+H]⁺, 理论值 549.187 4 [M+H]⁺。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.50~1.81 (1H, m, 4'-NH), 2.80~2.92 (1H, m, H-2), 3.30~3.36 (1H, m, H-3), 3.73 (6H, s, 3', 5'-OCH₃), 3.88~3.97 (2H, m, 4'-NH-CH₂), 3.79 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.10~4.18 (1H, m, H-11 β), 4.28~4.38 (2H, m, H-1, 11 α), 4.55~4.57 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-4), 5.94 (1H, s, β -OCH₂O), 5.96 (1H, s, α -OCH₂O), 6.25 (2H, s, H-2', 6'), 6.49 (1H, s, H-8), 6.65 (1H, s, H-5), 7.52~7.54 (2H, d, J = 8.5 Hz, Ar-H-2'', 6''), 8.18~8.21 (2H, d, J = 8.6 Hz, Ar-H-3'', 5''); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 42.2 (C-1), 44.6 (C-2), 39.4 (C-3), 61.4 (C-4), 110.7 (C-5), 147.3 (C-6), 147.8 (C-7), 108.5 (C-8), 131.6 (C-9), 131.9 (C-10), 68.9 (C-11), 174.7 (C-12), 137.1 (C-1'), 108.4 (C-2', 6'), 152.4 (C-3'), 135.5 (C-4'), 152.4 (C-5'), 101.8 (OCH₂O), 56.9 (3', 5'-OCH₃), 57.0 (4'-OCH₃), 146.9 (C-1''), 128.8 (C-2''), 123.9 (C-3''), 147.3 (C-4''), 123.9 (C-5''), 68.9 (NHCH₂)。

3 讨论

3.1 取代苄胺类鬼臼毒素衍生物 C-4 构型的确证

合成目标化合物所设计的合成路线, 只有 1 个

反应涉及到化合物 C-4 构型的改变, 即由鬼臼毒素合成 4-叠氮鬼臼毒素的反应。由于鬼臼毒素 C-4 为环内碳原子, 环张力的影响很难通过 SN_2 机理生成五键过渡态, 故只能通过 SN_1 机理进行, 生成碳正离子, 而 C-1 位有大体积的 3',4',5'-三甲氧基苯基, 亲核试剂叠氮离子从 C 环上位阻较小的 β 位进攻比从 α 位进攻更为有利, 生成优势构型的 4 β -叠氮-4-脱氧鬼臼毒素, 之后的还原、生成亚胺以及亚胺还原都不涉及 C-4 原子, 因而 C-4 位取代基的取向不变, 为 β 构型。通过 X-单晶衍射很容易判断其构型。图 2 为目标化合物 5f 的 X-单晶衍射的结构图, 从图中可以清楚看到, 鬼臼毒素 C 环上 4 个原子的构型, 内酯环仍然保持反式状态。

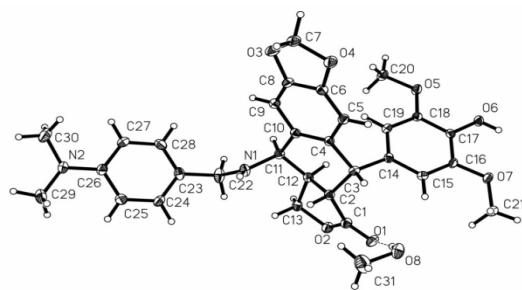


图 2 化合物 5f 的 X-单晶衍射的结构

Fig. 2 Molecular structure of compound 5f

3.2 体外抗肿瘤活性评价及构效关系

采用 MTT 法, 以依托泊苷 (VP-16) 为阳性对照药, 测试了化合物 4a~4e、5a~5k 对人宫颈癌 HeLa 细胞、人慢性髓性白血病急变期细胞 K562 及其阿霉素耐药株 K562/A02 的体外细胞毒活性。抗肿瘤活性数据以半数抑制浓度 (IC_{50}) 表示^[13], 结果见表 1。

从表 1 中结果可以看出本实验合成了 4 个亚胺类和 11 个取代苄胺类鬼臼毒素类衍生物, 绝大多数衍生物具有相当的体外细胞毒活性。在 HeLa 细胞的测试中, 化合物 4a、4c、4d、5b、5i、5e 表现出了良好的抗肿瘤活性, 其活性优于阳性对照药 VP-16。而在 K562 细胞测试中, 化合物 5a、5c、5d、5e、5h、5i、5j、5k 对 K562 细胞的体外抗肿瘤活性比 VP-16 强, 是 VP-16 的 3~40 倍。值得注意的是, 在耐药肿瘤细胞株 K562/A02 的测试中, 化合物 4a~4d、5a、5c、5d、5e、5f、5h、5i、5k 对耐药的 K562/A02 细胞也具有比较好的活性。且化合物 4a~4d、5d、5f、5h、5k 对耐药 K562/A02 细胞显示出比普通 K562 细胞更强的细胞毒活性,

表 1 化合物 4a~4d、5a~5k 对肿瘤细胞株增殖抑制活性
Table 1 Structures of compounds 4a—4d, 5a—5k and their antitumor activities

化合物	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			RF
	HeLa	K562	K562/A02	
4a	0.41	44.21	0.08	0.002
4b	6.62	>100	3.47	—
4c	0.93	37.01	0.13	0.004
4d	1.07	25.37	6.43	0.250
5a	5.46	0.99	5.07	5.120
5b	0.30	—	—	—
5c	6.92	1.90	2.76	1.450
5d	4.24	5.83	1.88	0.320
5e	0.10	1.13	6.20	5.490
5f	8.94	>100	3.47	—
5g	3.40	39.53	18.29	0.460
5h	—	12.79	4.37	0.340
5i	0.05	0.55	1.14	2.070
5j	12.21	5.81	>100	—
5k	3.10	7.72	2.76	0.360
VP-16	1.40	25.71	8.02	0.310

“—” 未测活性; RF-抗药因子, $\text{RF} = \text{IC}_{50}(\text{K562/A02})/\text{IC}_{50}(\text{K562})$

“—” not detected; RF-resistant factor, $\text{RF} = \text{IC}_{50}(\text{K562/A02})/\text{IC}_{50}(\text{K562})$

且活性优于阳性对照药 VP-16。大致可以得出以下构效关系: 4 β -取代苄胺类鬼臼毒素衍生物对 K562 细胞抑制活性的大小与鬼臼毒素 4'位为 OCH_3 或 OH 有关, N' -4 β -取代苄胺类-4-脱氧表鬼臼毒素衍生物的活性高于 N' -4 β -取代苄胺类-4-4'-脱氧表鬼臼毒素衍生物。当取代基相同时, 取代苄胺类鬼臼毒素衍生物对 K562 细胞的活性强于亚胺类鬼臼毒素衍生物。该类化合物具有较好的抗肿瘤活性和抗多药耐药性, 具有深入的研究价值。

参考文献

- [1] 杨显志, 邵 华, 张玲琪. 鬼臼毒素资源研究现状 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 1042-1044.
- [2] Wu Y P, Jin Z Y, Feng H P, *et al.* Clinical study on treatment of condyloma acuminata with 0.5% podophyllotoxin film [J]. *Chin Pharm J*, 2001, 36(8): 564-565.
- [3] Canel C, Moraes R M, Dayan F E, *et al.* Podophyllotoxin [J]. *Phytochemistry*, 2000, 54(2): 115-120.
- [4] Kamal A, Suresh P, Ramaiah M J, *et al.* 4 β [4'-(1-(Aryloxy)ureido)benzamide] podophyllotoxins as DNA

- topoisomerase I and II α inhibitors and apoptosis inducing agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(17): 5198-5208.
- [5] Wang L, Yang F, Yang X, *et al.* ChemInform abstract: Synthesis and biological evaluation of new 4 β -anilino-4'-O-demethyl-4-desoxypodophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(1): 285-296.
- [6] 王莉莉, 周应军. 抗癌物质鬼臼毒素及其衍生物研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(1): 6-9.
- [7] 成伟华, 陈虹, 邹忠梅. 鬼臼毒素的结构修饰及抗肿瘤活性研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(5): 644-650.
- [8] 孙强稳, 王杰, 陈虹, 等. 新型酰胺类鬼臼毒素衍生物的合成及体外抗肿瘤活性 [J]. 天津医科大学学报, 2015, 21(4): 282-286.
- [9] 梅昕, 蒋云根, 陈虹, 等. 鬼臼毒素衍生物 CIP-36 抗肿瘤多药耐药的机制 [J]. 药学学报, 2011, 46(10): 1193-1198.
- [10] 唐啸威, 谢文利, 陈虹, 等. 吲哚草酰类鬼臼毒素衍生物的合成及其抗肿瘤活性 [J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(3): 299-301.
- [11] Li W Q, Wang X L, Qian K, *et al.* Design, synthesis and potent cytotoxic activity of novel podophyllotoxin derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(8): 2363-2369.
- [12] 李楠, 赵阳, 魏菲, 等. 鬼臼毒素脲类衍生物的合成和体外抗癌活性的研究 [J]. 天津医科大学学报, 2016, 22(3): 199-203.