

吲哚-1,3,4-噁二唑类衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究

郑煦阳^{1,2}, 李凌宇², 胡玥², 尚海^{2*}, 邹忠梅^{1,2*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301600

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 合成吲哚-1,3,4-噁二唑类衍生物, 并进行体外抗肿瘤活性研究。**方法** 以吲哚-3-甲酰肼为起始原料, 通过 [4+1] 环加成反应、水解反应、缩合反应得到目标化合物。采用 MTT 法测试目标化合物对 HeLa、SCG-7901 和 MDA-MB-231 细胞的体外抗肿瘤活性。采用克隆形成实验考察化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞增殖的影响。采用 Annexin V-APC/PI 双染法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞凋亡和坏死的影响。采用 DAPI 染色法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞凋亡核染色质形态学的影响。采用 DCFH-DA 染色法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞中活性氧含量的影响。**结果** 合成了 15 个吲哚-1,3,4-噁二唑类衍生物, 其结构经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HR-ESI-MS 确证。部分化合物表现出良好的抗肿瘤活性, 其中化合物 **6f** 对 HeLa、SCG-7901 和 MDA-MB-231 3 种肿瘤细胞株均表现出明显的抗增殖作用, 且具有一定的选择性。进一步研究表明, 化合物 **6f** 以浓度相关的方式促进细胞产生活性氧, 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡。**结论** 部分吲哚-1,3,4-噁二唑类衍生物表现出良好的抗肿瘤活性, 为该类别化合物的进一步抗肿瘤活性研究提供思路。

关键词: 吲哚-1,3,4-噁二唑; 合成; 抗肿瘤; SCG-7901 细胞; 活性氧

中图分类号: R914; R962 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)04-0886-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.010

Synthesis and antitumor activity *in vitro* of indole-1,3,4-oxadiazole derivatives

ZHENG Xuyang^{1,2}, LI Lingyu², HU Yue², SHANG Hai², ZOU Zhongmei^{1,2}

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To synthesize indole-1,3,4-oxadiazole derivatives and investigate antitumor activities *in vitro*. **Methods** Taking 1*H*-indole-3-carbohydrazide as the starting material, the target compounds were obtained through [4+1] cycloaddition reaction, hydrolysis reaction and condensation reaction. Antitumor activity *in vitro* of target compounds against HeLa, SCG-7901, and MDA-MB-231 cells were evaluated by MTT assay. The effect of compound **6f** against the growth of SCG-7901 cells was assessed by colony formation assay, the effect of it on apoptosis and necrosis in SCG-7901 cells was detected using Annexin V-APC/PI double staining method, the effect of it on nuclear chromatin morphological changes of SCG-7901 cells were examined using DAPI staining method, and the effect of it on contents of reactive oxygen species (ROS) in SCG-7901 cells was detected using DCFH-DA staining method. **Results** Fifteen indole-1,3,4-oxadiazole derivatives were synthesized and their structures were characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and HR-ESI-MS. Some compounds exhibited significant antitumor activity, among which compound **6f** exhibited significant anti-proliferative effects against all three tumor cell lines and had certain selectivity. Further research has shown that compound **6f** promoted cell production of ROS generation, inhibited cell proliferation, and induced cell apoptosis in a concentration dependent manner. **Conclusion** Some indole-1,3,4-oxadiazole derivatives have shown good antitumor activity, providing ideas for further research on the anti-tumor activity of these compounds.

Key words: indole-1,3,4-oxadiazole; synthesis; antitumor; SCG-7901 cell; ROS

收稿日期: 2023-12-21

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2019ZX09735002); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2022-I2M-1-017)

作者简介: 郑煦阳 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物结构修饰与活性研究。E-mail: 845740226@qq.com

*通信作者: 尚海, 男, 研究员, 博士, 从事天然产物结构修饰与活性研究。E-mail: hshang@implad.ac.cn

邹忠梅, 女, 博士生导师, 博士, 从事天然产物化学研究。E-mail: zmozou@implad.ac.cn

天然产物是发现新型生物活性分子的重要源泉^[1]。其中含有 5-(3-吡啶基)噻唑结构的天然产物表现出多种生物活性,如抗病毒^[2]、抗菌^[3]、抗癌^[4]、抗氧化^[5]、抑制细胞增殖^[6]和杀虫活性^[7]。从丁香假单胞杆菌的发酵产物中分离出来的 labradorin 1 就是一种含有 5-(3-吡啶基)噻唑母核结构的天然产物,其对人肿瘤细胞系 MCF-7、KM20L2 表现出明显的抗增殖活性,GI₅₀ 值分别为 3.9、3.5 μg/mL^[8]。1,3,4-噻二唑是一种含有 1 个氧原子和 2 个氮原子的五元芳香杂环化合物,具有广泛的生物活性,包括抗癌^[9]、抗微生物^[10]、抗真菌^[11]、抗炎^[12]和抗艾滋病^[13]。值得注意的是,由于其独特的结构,常常作为重要的药效团出现在抗肿瘤药物设计中。本研究以 labradorin 1 为研究对象,采用骨架跃迁策略,将 labradorin 1 中的噻唑环替换为 1,3,4-噻二唑环,设计并合成了 15 个吡啶-1,3,4-噻二唑类化合物,其结构均经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 HR-ESI-MS 进行确证。通过 MTT 法测试了目标化合物对 HeLa、SCG-7901 和 MDA-MB-231 3 种肿瘤细胞的体外抗增殖活性,并筛选出活性较好的化合物,进行了作用机制研究。

1 仪器与试剂

Bruker AV III 600 核磁共振仪(北京布鲁克科技有限公司);Waters SYNAPT G2 HDMS 高分辨质谱仪(上海沃特世科技有限公司);Mettler-AB104-S 分析天平(梅特勒托利多测量设备有限公司);IKARCT basic 磁力搅拌器(德国艾卡仪器设备有限公司);EYELA-N1100 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社);DLSB-5/20 型低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司);H1 型多功能酶标仪(美国 Biotek 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);多功能成像分析系统(上海勤翔科学仪器有限公司);PSC603-07S 型荧光显微镜(美国 OPLENIC 公司);薄层色谱板 GF254(烟台化工厂);快速柱色谱用硅胶(200~300 目,青岛海洋化工厂)。

吡啶-3-甲酰肼(毕得科技有限公司),3,3,3-三氟乙酸乙酯、苯胺、异丙胺、苄胺、对氟苄胺、邻氟苄胺、间氟苄胺、对甲基苄胺、对甲基苄胺、对溴苄胺、对氟苄胺、对氯苄胺、苄乙胺、3-氨基吡啶、2-咪唑甲胺、对溴苄胺均购自北京伊诺凯科技有限公司;HATU(韶远科技有限公司),DIEA(安耐吉化学),碳酸钠、氢氧化钠(北京通广精细化工

有限公司);其余试剂均为分析纯,购于天津北联精细化学品开发公司。

人宫颈癌细胞 HeLa、人胃癌细胞 SCG-7901、人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和人胚肺成纤维细胞 CCC-HPF-1 均购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,二甲亚砜(DMSO,上海阿拉丁试剂有限公司);噻唑蓝(MTT,碧云天生物技术有限公司)、胎牛血清(货号 10099-141)、DMEM 高糖培养基(货号 8122175)、青霉素-链霉素(货号 15140-122)购自 Gibco 公司;2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA, HY-D0940-5 mg, MedChemExpress 公司);含 DAPI 抗荧光淬灭封片液(P0131-5 mL)购自碧云天生物技术有限公司;Annexin V-APC/PI 细胞凋亡试剂盒(AP107-100T)购自联科生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 化合物的合成

以吡啶-3-甲酰肼为起始原料,通过[4+1]环加成反应、水解反应和缩合反应得到目标化合物,合成路线见图 1。

2.1.1 化合物 3 的合成 将吡啶-3-甲酰肼(100 mg, 0.57 mmol)、3,3,3-三氟乙酸乙酯(82.5 μL, 0.63 mmol)、Na₂CO₃(90.6 mg, 0.85 mmol)和无水乙醇(3 mL)依次加入一个干燥的密封管中。将混合物加热至 90 °C 反应 7 h, TLC 监测反应完全。将反应液冷却至室温,硅藻土滤过,并用醋酸乙酯洗涤,浓缩滤液,残余物经硅胶柱色谱纯化,得到化合物 3 (160 mg, 产率 88%)。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.03 (s, 1H), 8.16 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.26 (ddd, *J*=7.5、6.7、1.2 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.0、7.0、1.2 Hz, 1H), 4.25 (s, 2H), 4.17 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 1.22 (t, *J*=7.1 Hz, 3H)。

2.1.2 化合物 4 的合成 将化合物 3 (0.59 mmol)溶于四氢呋喃(2 mL)中,加入 10% NaOH 水溶液 1 mL,室温搅拌 0.5 h, TLC 监测反应完全。反应液浓缩至 1 mL,加入稀盐酸调 pH 值至 2 左右,析出白色固体,抽滤,收集滤饼,得化合物 4 (83 mg, 产率 58%)。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13.15 (s, 1H), 12.08 (s, 1H), 8.16 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.28~7.21 (m, 2H), 4.12 (s, 2H)。

2.1.3 化合物 6a~6o 的合成 将化合物 4 (0.29

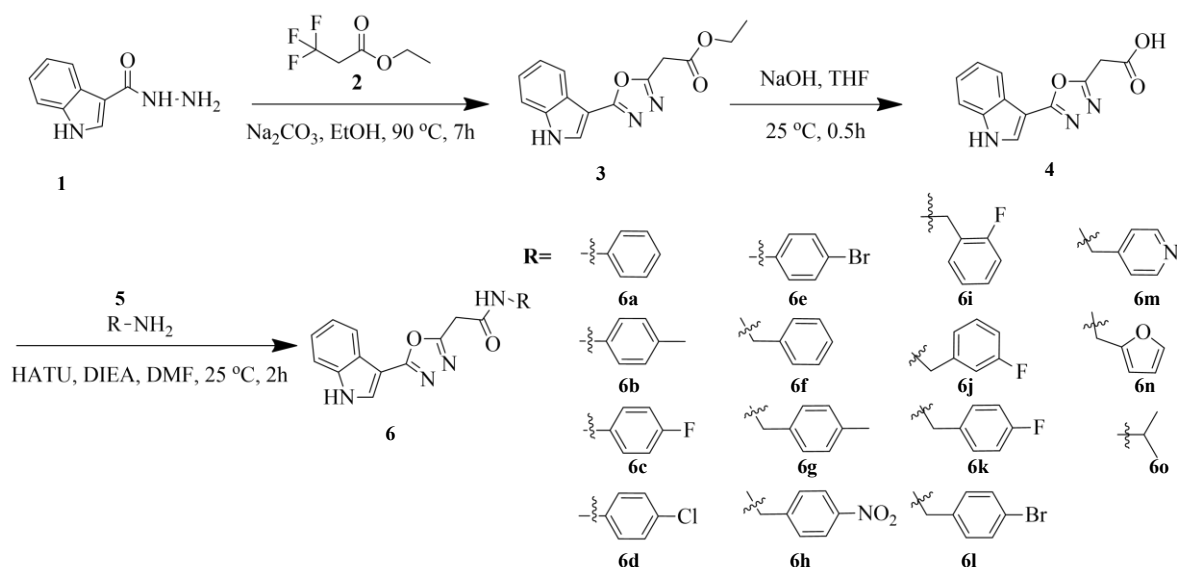


图 1 化合物 6a~6o 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of compounds 6a — 6o

mmol) 和胺类化合物 **5** (0.37 mmol) 溶于 DMF (2 mL) 中, 依次加入 HATU (0.37 mmol) 和 DIEA (0.37 mmol), 室温搅拌 2 h, TLC 监测反应完全。将反应液倒入水中, 用醋酸乙酯 (20 mL×3) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水硫酸钠干燥, 滤过, 减压浓缩至析出大量固体, 抽滤, 滤饼依次用石油醚、二氯甲烷洗涤, 收集滤饼, 干燥, 得到化合物 **6a~6o**。

2-[5-(1*H*-吲哚-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-苯乙酰胺 (**6a**): 白色固体, 收率 45.6%。mp 252.0~253.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.01 (s, 1H), 10.47 (s, 1H), 8.16 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 8.09 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.60 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.52 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.34 (t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.26 (ddd, *J*=7.5、6.6、1.3 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.6、7.0、1.3 Hz, 1H), 7.09 (t, *J*=7.4 Hz, 1H), 4.18 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.5, 162.3, 159.6, 138.7, 136.4, 128.9 (2C), 128.1, 124.1, 123.7, 122.9, 121.2, 120.2, 119.2 (2C), 112.5, 99.4, 33.6; HR-MS *m/z*: 319.119 5 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吲哚-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(对甲苯基)乙酰胺 (**6b**): 白色固体, 收率 54.6%。mp 249.1~251.6 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.00 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.15 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 8.09 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.26 (ddd, *J*=7.4、6.5、1.3 Hz, 1H), 7.23 (ddd,

J=8.5、7.4、1.3 Hz, 1H), 7.14 (d, *J*=8.3 Hz, 2H), 4.16 (s, 2H), 2.26 (s, 3H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.2, 162.3, 159.7, 136.4, 136.2, 132.7, 129.3 (2C), 128.1, 124.1, 122.8, 121.2, 120.2, 119.2 (2C), 112.4, 99.4, 33.5, 20.5; HR-MS *m/z*: 333.135 2 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吲哚-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-氟苯基)乙酰胺 (**6c**): 白色固体, 收率 63.5%。mp 262.7~264.8 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.01 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 10.53 (s, 1H), 8.16 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.09 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.64~7.61 (m, 2H), 7.53 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 7.27 (ddd, *J*=7.5、6.6、1.3 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J*=8.3、7.0、1.2 Hz, 1H), 7.20~7.16 (m, 2H), 4.17 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.4, 162.4, 159.6, 158.2 (d, *J*=240.5 Hz), 136.4, 135.1 (d, *J*=2.0 Hz), 128.1, 124.1, 122.9, 121.2, 121.0 (d, *J*=7.8 Hz), 120.2, 115.5 (d, *J*=21.6 Hz), 112.5, 99.4, 33.5; HR-MS *m/z*: 337.110 1 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吲哚-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-氯苯基)乙酰胺 (**6d**): 白色固体, 收率 49.0%。mp 254.5~256.0 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.02 (d, *J*=2.1 Hz, 1H), 10.61 (s, 1H), 8.16 (d, *J*=2.9 Hz, 1H), 8.10 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.65~7.63 (m, 2H), 7.53 (d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.40~7.38 (m, 2H), 7.27 (ddd, *J*=7.7、6.6、1.2 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.2、7.8、1.2 Hz, 1H),

4.20 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164.8, 162.5, 159.6, 137.8, 136.6, 128.9 (2C), 128.2, 127.4, 124.2, 123.0, 121.3, 120.9 (2C), 120.3, 112.6, 99.5, 33.8; HR-MS m/z : 353.080 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-溴苄基)乙酰胺 (**6e**): 白色固体, 收率 34.8%. mp 256.3~258.0 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.02 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 10.61 (s, 1H), 8.12 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.54~7.52 (m, 3H), 7.27 (ddd, $J=7.6$ 、6.5、1.2 Hz, 1H), 7.23 (ddd, $J=8.2$ 、7.0、1.2 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 164.9, 162.4, 159.5, 138.1, 136.4, 131.7 (2C), 128.1, 124.1, 122.9, 121.2 (2C), 121.1, 120.2, 115.3, 112.5, 99.4, 33.7; HR-MS m/z : 397.030 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-苄基乙酰胺 (**6f**): 白色固体, 收率 64.5%. mp 237.2~239.2 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.00 (s, 1H), 8.87 (t, $J=5.9$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.35~7.30 (m, 4H), 7.28~7.23 (m, 3H), 4.34 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 4.00 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 165.6, 162.2, 159.9, 139.0, 136.4, 128.4 (2C), 128.0, 127.3 (2C), 127.0, 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 112.5, 99.5, 42.5, 32.6; HR-MS m/z : 333.135 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-甲基苄基)乙酰胺 (**6g**): 白色固体, 收率 55.2%. mp 243.0~245.6 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.00 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 8.81 (t, $J=5.9$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.27 (ddd, $J=7.6$ 、6.6、1.3 Hz, 1H), 7.22 (ddd, $J=8.2$ 、7.0、1.1 Hz, 1H), 7.19 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 4.29 (d, $J=5.9$ Hz, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.28 (s, 3H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 165.5, 162.2, 159.9, 136.4, 136.0, 135.9, 128.9 (2C), 128.0, 127.4 (2C), 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 112.5, 99.5, 42.2, 32.6, 20.7; HR-MS m/z : 347.150 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-

硝基苄基)乙酰胺 (**6h**): 白色固体, 收率 40.4%. mp 195.2~197.9 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.00 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 9.03 (t, $J=6.3$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 8.14 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.27 (ddd, $J=8.3$ 、7.5、1.1 Hz, 1H), 7.22 (ddd, $J=8.0$ 、6.9、1.0 Hz, 1H), 4.48 (d, $J=6.1$ Hz, 2H), 4.04 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 166.0, 162.3, 159.8, 147.2, 146.5, 136.4, 128.3 (2C), 128.0, 124.1, 123.6 (2C), 122.9, 121.2, 120.2, 112.5, 99.6, 42.0, 32.5; HR-MS m/z : 378.120 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(2-氟苄基)乙酰胺 (**6i**): 白色固体, 收率 48.2%. mp 237.2~239.5 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.00 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 8.88 (t, $J=5.9$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J=2.9$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.42~7.39 (m, 1H), 7.35~7.32 (m, 1H), 7.26 (ddd, $J=7.5$ 、6.7、1.3 Hz, 1H), 7.24~7.17 (m, 3H), 4.37 (d, $J=5.8$ Hz, 2H), 4.00 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 165.7, 162.2, 160.13 (d, $J=244.4$ Hz), 159.8, 136.4, 129.7 (d, $J=4.4$ Hz), 129.1 (d, $J=8.4$ Hz), 128.0, 125.5 (d, $J=15.0$ Hz), 124.4 (d, $J=3.5$ Hz), 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 115.2 (d, $J=21.1$ Hz), 112.5, 99.5, 36.4 (d, $J=4.4$ Hz), 32.5; HR-MS m/z : 351.125 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(3-氟苄基)乙酰胺 (**6j**): 白色固体, 收率 48.3%. mp 239.2~241.5 °C; ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.00 (s, 1H), 8.91 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.40~7.36 (m, 1H), 7.26 (ddd, $J=7.5$ 、6.6、1.2 Hz, 1H), 7.23 (ddd, $J=8.4$ 、7.1、1.1 Hz, 1H), 7.17~7.13 (m, 2H), 7.11~7.07 (m, 1H), 4.36 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 4.02 (s, 2H); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.7, 162.2, 160.1 (d, $J=244.4$ Hz), 159.8, 136.4, 129.7 (d, $J=4.4$ Hz), 129.1 (d, $J=8.4$ Hz), 128.0, 125.5 (d, $J=15.0$ Hz), 124.4 (d, $J=3.5$ Hz), 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 115.2 (d, $J=21.1$ Hz), 112.5, 99.5, 36.4 (d, $J=4.4$ Hz), 32.5; HR-MS m/z : 351.125 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-氟苄基)乙酰胺 (**6k**): 白色固体, 收率 51.5%。mp 229.6~231.0 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.00 (d, *J*=1.8 Hz, 1H), 8.88 (t, *J*=5.9 Hz, 1H), 8.12 (d, *J*=2.7 Hz, 1H), 8.07 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.37~7.33 (m, 2H), 7.27 (ddd, *J*=7.4、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J*=8.4、7.3、1.2 Hz, 1H), 7.19~7.15 (m, 2H), 4.32 (d, *J*=5.8 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.6, 162.2, 161.3 (d, *J*=242.0 Hz), 159.9, 136.4, 135.2 (d, *J*=3.2 Hz), 129.3 (d, *J*=8.0 Hz), 128.0, 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 115.1 (d, *J*=21.0 Hz), 112.5, 99.5, 41.8, 32.5; HR-MS *m/z*: 351.125 7 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-溴苄基)乙酰胺 (**6l**): 白色固体, 收率 33.6%。mp 210.2~212.2 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.00 (s, 1H), 8.90 (t, *J*=6.2 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.07 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.52~7.54 (m, 3H), 7.28~7.21 (m, 4H), 4.31 (d, *J*=6.2 Hz, 2H), 4.00 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.7, 162.3, 159.8, 138.5, 136.4, 131.2 (2C), 129.6 (2C), 128.0, 124.1, 122.9, 121.2, 120.2, 120.0, 112.5, 99.4, 41.8, 32.5; HR-MS *m/z*: 411.045 7 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(4-硝基苄基)乙酰胺 (**6m**): 白色固体, 收率 72.9%。mp 193.4~194.8 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.01 (d, *J*=1.9 Hz, 1H), 8.93 (t, *J*=5.8 Hz, 1H), 8.54 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 8.48 (d, *J*=8.5 Hz, 1H), 8.12 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 8.07 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J*=4.7、3.0 Hz, 1H), 7.27 (ddd, *J*=7.5、6.8、1.3 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.3、7.5、1.2 Hz, 1H), 4.37 (d, *J*=5.8 Hz, 2H), 4.00 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.8, 162.3, 159.8, 148.8, 148.3, 136.4, 135.2, 134.5, 128.0, 124.1, 123.5, 122.9, 121.2, 120.2, 112.5, 99.4, 40.2, 32.5; HR-MS *m/z*: 334.130 4 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-(呋喃-2-基甲基)乙酰胺 (**6n**): 白色固体, 收率 39.6%。mp 208.5~210.5 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.02 (d, *J*=1.9 Hz, 1H), 8.84 (t, *J*=5.5

Hz, 1H), 8.13 (d, *J*=2.8 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J*=1.9 Hz, *J*=0.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=8.0, 1H), 7.27 (ddd, *J*=7.7、6.7、1.3 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.5、7.3、1.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, *J*=3.8、1.8 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J*=3.2、0.6 Hz, 1H), 4.33 (d, *J*=5.6 Hz, 2H), 3.96 (s, 2H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 165.6, 162.4, 159.5, 151.8, 142.5, 136.5, 128.1, 124.2, 123.0, 121.3, 120.3, 112.6, 110.6, 107.3, 99.6, 35.9, 32.5; HR-MS *m/z*: 323.114 4 [M+H]⁺。

2-[5-(1*H*-吡啶-3-基)-1,3,4-噁二唑-2-基]-*N*-异丙基乙酰胺 (**6o**): 白色固体, 收率 67%。mp 242.0~243.6 °C; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.00 (s, 1H), 8.26 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 8.12 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J*=7.5 Hz, 1H), 7.26 (ddd, *J*=7.5、6.6、1.3 Hz, 1H), 7.23 (ddd, *J*=8.4、7.3、1.2 Hz, 1H), 3.88~3.83 (m, 3H), 1.10 (d, *J*=6.6 Hz, 6H); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.4, 163.2, 160.0, 136.4, 127.9, 124.1, 122.8, 121.1, 120.2, 112.5, 99.5, 55.0, 40.9, 32.6, 22.3 (2C); HR-MS *m/z*: 285.135 2 [M+H]⁺。

2.2 化合物的抗肿瘤活性研究

2.2.1 目标化合物对肿瘤细胞增殖的影响 采用 MTT 法测试目标化合物 **6a**~**6o** 对 HeLa、SCG-7901 和 MDA-MB-231 细胞的体外抗肿瘤活性。将 HeLa、SCG-7901、MDA-MB-231 细胞以 5×10⁴ 个/mL 密度接种到 96 孔板中, 每孔 100 μL。在 CO₂ 培养箱中培养 24 h。设置对照组和给药组, 给药组每孔加入梯度稀释的化合物 **6a**~**6o** 药液 (终浓度分别为 2.5、5、10、20、40 μmol/L) 200 μL, 对照组加入含有等体积 DMSO 的培养基。培养 48 h 后, 加入 5 mg/mL MTT 溶液 5 μL, 再继续培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 100 μL, 震荡 10 min, 酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度 (*A*) 值。实验设置 3 个平行孔, 重复 2 次, 取平均值。采用 GraphPad Prism 9 计算目标化合物 **6a**~**6o** 对肿瘤细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀), 结果见表 1。

化合物 **6f**、**6g**、**6k**、**6l** 表现出抗肿瘤活性, 其中化合物 **6f**、**6g** 对 3 种肿瘤细胞均表现出良好的抗增殖作用。活性最好的化合物 **6f** 对 HeLa、SCG-7901 和 MDA-MB-231 细胞的 IC₅₀ 分别为 (4.35±0.32)、(3.94±0.03)、(4.04±1.06) μmol/L。初步的构效关

表 1 化合物 6a~6o 的体外抗肿瘤活性
Table 1 *In vitro* antitumor effect of compounds 6a — 6o

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)				SI
	HeLa 细胞	SCG-7901 细胞	MDA-MB-231 细胞	CCC-HPF-1 细胞	
6a	>40	>40	>40	—	—
6b	>40	>40	>40	—	—
6c	>40	>40	>40	—	—
6d	>40	>40	>40	—	—
6e	>40	>40	>40	—	—
6f	4.35±0.32	3.94±0.03	4.04±1.06	13.97±0.90	3.54
6g	12.81±2.40	5.02±2.18	6.68±0.2	55.70±4.52	11.09
6h	>40	>40	>40	—	—
6i	>40	>40	>40	—	—
6j	>40	>40	>40	—	—
6k	>40	14.78±0.09	>40	—	—
6l	>40	29.20±0.21	>40	—	—
6m	>40	>40	>40	—	—
6n	>40	>40	>40	—	—
6o	>40	>40	>40	—	—

系研究表明, 苄胺衍生物具有良好的抗肿瘤活性。其中苄胺的苯环上无取代基或为甲基取代基时, 衍生物表现出明显的抗肿瘤活性。当苯环上的取代基替换为卤素或硝基取代时则活性下降, 甚至消失, 说明苄胺的苯环上连有供电子基团有助于抗肿瘤活性。当酰胺的氨基部分由苄胺替换为苯胺、烷基胺时, 衍生物的抗肿瘤活性丧失。此外, 将苄胺的苯基替换为吡啶或呋喃基团时, 衍生物同样无明显抗肿瘤作用。说明苄胺基团对衍生物发挥抗肿瘤活性至关重要。

为了进一步考察目标化合物抗肿瘤作用是否具有选择性, 实验测试了化合物 **6f**、**6g** 对人胚肺成纤维细胞 CCC-HPF-1 存活率的影响, 结果见表 1。结果显示, 化合物 **6f**、**6g** 的选择性指标[SI, SI=IC₅₀(CCC-HPF-1)/IC₅₀(SGC-7901)] 分别为 3.54、11.09, 具有良好的细胞选择性。考虑到化合物 **6f** 的活性更优, 故选择化合物 **6f** 进行后续实验。

2.2.2 化合物 6f 抑制 SCG-7901 细胞增殖 采用克隆形成实验考察化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞增殖的影响。实验设置空白组和给药组。取对数生长期的 SCG-7901 细胞, 调整细胞密度至 800 个/mL, 接种于 6 孔板内, 待细胞贴壁后, 给药组分别加入不同浓度的化合物 **6f**, 终浓度分别为 10、20、40 μmol/L,

空白组加入含等体积 DMSO 的培养基。培养 14 d 后, 弃去上清液, 加入 4%多聚甲醛固定细胞 10 min, 除去 4%多聚甲醛。使用结晶紫染色液染色 10 min, 水洗除去多余的结晶紫染色液, 晾干后进行拍照记录。用 Image J 软件分析细胞集落数量 (大于 50 个细胞的细胞群为 1 个集落), 结果见图 3。在 40 μmol/L 的浓度下, 化合物 **6f** 可显著抑制细胞集落的形成, SCG-7901 细胞的平均集落数量由 711 个 (空白组) 减少至 2 个。

2.2.3 化合物 6f 诱导 SCG-7901 细胞凋亡和坏死 采用 Annexin V-APC/PI 双染法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞凋亡和坏死的影响^[14]。实验设置空白组和给药组。取对数生长期的 SCG-7901 细胞, 调整细胞密度至 3×10⁵ 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 1 mL。待细胞贴壁后, 给药组分别加入不同浓度的化合物 **6f**, 终浓度分别为 10、20、40 μmol/L, 空白组加入含等体积 DMSO 的培养基。培养 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤细胞, 将细胞转移至流式管中, 向流式管内分别加入 Annexin V-APC (10 μL) 和 PI (5 μL) 染液, 室温孵育 10 min, 使用流式细胞仪检测凋亡和坏死细胞的比例。并使用 Flow Jo 软件进行数据分析, 数据显示为伪彩图, 结果见图 4。40 μmol/L 化合物 **6f** 处理 24 h 后, SCG-7901 细胞的早

期凋亡细胞占比由 4.76% 升高到 17.6%，晚期凋亡细胞占比由 1.92% 上升到 13.2%。细胞凋亡率（早期凋亡与晚期凋亡）随浓度的升高而升高，呈一定的浓度相关性。提示化合物 **6f** 通过促进肿瘤细胞的凋亡从而发挥抗肿瘤作用。

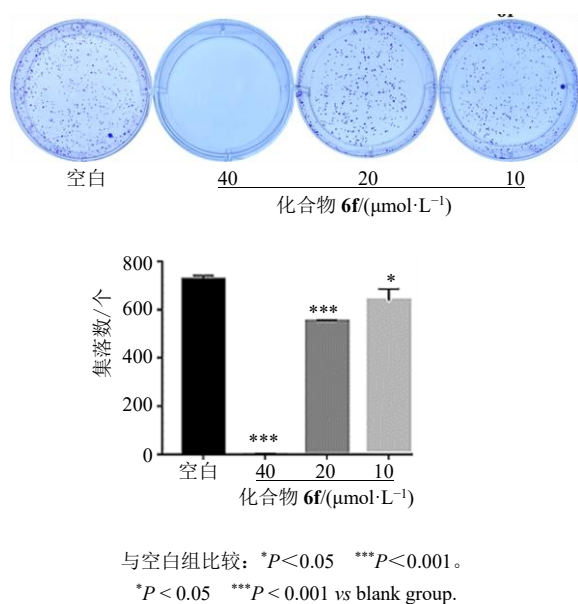


图 3 化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 3 Effect of compound **6f** on colony formation of SCG-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

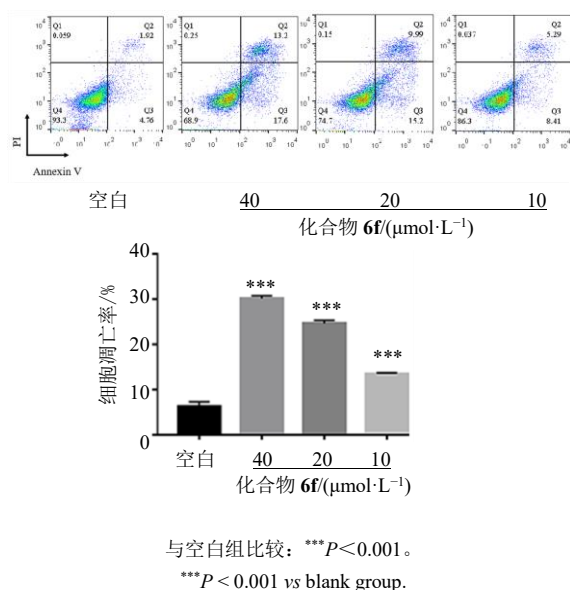


图 4 化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effect of compound **6f** on apoptosis rate of SCG-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2.4 化合物 **6f 对 SCG-7901 细胞形态学的影响** 采用 DAPI 染色法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞调

亡核染色质形态学的影响。实验设置空白组和给药组。取对数生长期 SCG-7901 细胞，以 4×10^4 个/mL 的细胞密度接种于置有直径为 8 mm 爬片的 48 孔板内，待细胞贴壁后，给药组分别加入不同浓度的化合物 **6f**，终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ，空白组加入含等体积 DMSO 的培养基。培养 24 h，弃去上清，PBS 洗涤细胞，4% 多聚甲醛固定细胞 10 min，PBS 洗涤细胞 3 次，取出爬片，置于含有 DAPI 抗荧光淬灭封片液的载玻片上，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，使用荧光显微镜观察染色情况并拍照记录，结果见图 5。空白组的细胞核形态规则，且呈弥散均匀的淡蓝色荧光。给予不同浓度的化合物 **6f** 后，SCG-7901 细胞的细胞核固缩，染色质高度凝聚，说明化合物 **6f** 能够诱导 SCG-7901 细胞的凋亡。

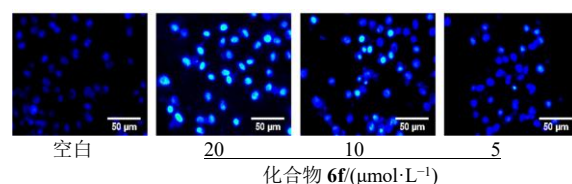


图 5 化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞核形态变化的影响
Fig. 5 Effect of compound **6f** on the nuclear morphological changes of SCG-7901 cells

2.2.5 化合物 **6f 诱导 SCG-7901 细胞活性氧(ROS)水平升高** 采用 DCFH-DA 染色法检测化合物 **6f** 对 SCG-7901 细胞中 ROS 含量的影响。实验设置空白组和给药组。取对数生长期的 SCG-7901 细胞，以 3×10^5 个/mL 的细胞密度接种于 24 孔板内。待细胞贴壁后，给药组分别加入不同浓度的化合物 **6f**，终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ ，空白组加入含等体积 DMSO 的培养基。培养 24 h，弃去上清液，加入 DCFH-DA 荧光探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)，室温避光孵育 30 min，无血清培养基洗涤细胞 3 次，使用荧光显微镜观察染色情况并拍照记录，结果见图 6。与空白组相比，化合物 **6f** 处理后的细胞内 DCFH-DA 的平均荧光强度明显增强，说明细胞内的 ROS 水平显著升高，且具有剂量相关性。结果表明，化合物 **6f** 可有效促进 SCG-7901 细胞活性氧的生成。

3 讨论

labradorin 1 是一种具有抗肿瘤活性的天然产物，实验在 labradorin 1 的结构基础上采用骨架跃迁策略合成了一系列吡啶-1,3,4-噁二唑类衍生物，部分化合物表现出良好的抗肿瘤作用，其中化合物 **6f**

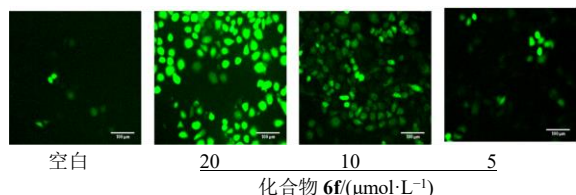


图6 化合物6f对SCG-7901细胞内ROS水平的影响

Fig. 6 Effect of compound 6f on ROS level of SCG-7901 cell

表现出最好的抗肿瘤活性,并具有一定的细胞选择性,说明酰胺的氨基部分为苄胺基团取代时活性最优。此外化合物6f对所测试的3种肿瘤细胞株均表现出抗增殖作用,说明化合物6f还具有抗肿瘤谱广的特点。作用机制研究发现,该类衍生物可以诱导肿瘤细胞的凋亡和坏死。其中衍生物诱导肿瘤细胞凋亡作用可能与促进肿瘤细胞内ROS的产生,进而造成线粒体损伤有关^[15-16]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Karageorgis G, Foley D J, Laraia L, *et al.* Principle and design of pseudo-natural products [J]. *Nat Chem*, 2020, 12(3): 227-235.
- [2] Wei Y, Fang W, Wan Z, *et al.* Antiviral effects against EV71 of pimprinine and its derivatives isolated from *Streptomyces* sp [J]. *Virol J*, 2014, 11(1): 1-14.
- [3] Kroiss J, Kaltenpoth M, Schneider B, *et al.* Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6(4): 261-263.
- [4] Naik S R, Harindran J, Varde A B. Pimprinine, An extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity [J]. *J Biotechnol*, 2001, 88(1): 1-10.
- [5] Nishida A, Fuwa M, Naruto S, *et al.* Solid-phase synthesis of 5-(3-indolyl) oxazoles that inhibit lipid peroxidation [J]. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41(24): 4791-4794.
- [6] Park C, Shin H J, Kim G Y, *et al.* Induction of apoptosis by

streptochlorin isolated from *Streptomyces* sp. in human leukemic U937 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(6): 1573-1581.

- [7] Zhang M Z, Mulholland N, Seville A, *et al.* First discovery of pimprinine derivatives and analogs as novel potential herbicidal, insecticidal and nematocidal agents [J]. *Tetrahedron*, 2021, 79: 131835.
- [8] Pettit G R, Knight J C, Herald D L, *et al.* Isolation of labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae* pv. *Coronafaciens* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(12): 1793-1797.
- [9] Kumar D, Sundaree S, Johnson E O, *et al.* An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1,3,4-oxadiazoles as potent anticancer agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(15): 4492-4494.
- [10] Gaonkar S L, Rai K M L, Prabhuswamy B. Synthesis and antimicrobial studies of a new series of 2-{4-[2-(5-ethylpyridin-2-yl) ethoxy] phenyl}-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles [J]. *Eur J Med Chem*, 2006, 41(7): 841-846.
- [11] Xu W, He J, He M, *et al.* Synthesis and antifungal activity of novel sulfone derivatives containing 1,3,4-oxadiazole moieties [J]. *Molecules*, 2011, 16(11): 9129-9141.
- [12] Sondhi S M, Kumar S, Kumar N, *et al.* Synthesis anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some pyrazole and oxadiazole derivatives [J]. *Med Chem Res*, 2012, 21: 3043-3052.
- [13] Summa V, Petrocchi A, Bonelli F, *et al.* Discovery of raltegravir, A potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(18): 5843-5855.
- [14] Crowley L C, Marfell B J, Scott A P, *et al.* Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016(11): 953-957.
- [15] Valko M, Izakovic M, Mazur M, *et al.* Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 266: 37-56.
- [16] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305: 626-629.

[责任编辑 解学星]