

1,3-取代吲唑类低氧诱导因子1抑制剂的 设计合成及其抗肝癌活性

李善花^{a*} 黄志宁^b 苗方笑^a 郑满意^b 梁涵^b
王宝睿^b 曲宁^a 乔红^a 王海莉^b 李福男^b
(厦门大学^a医学院;^b药学院 福建 厦门 361102)

摘要 低氧诱导因子1(HIF-1)与肿瘤细胞的生长、侵袭和耐药密切相关,在肿瘤细胞内HIF-1高度表达,因此新型的HIF-1抑制剂可作为潜在的抗肿瘤药物。本文合成了9个1,3-取代吲唑衍生物。通过蛋白质印迹(Western Blot)法及实时定量荧光PCR(Real time-PCR)等方法检测了其对HIF-1及其靶基因血管内皮生长因子(VEGF)表达水平的影响,并以3-(5'-羟甲基-2'-咪喃基)-1-苯甲基吲唑(YC-1)为阳性对照药物初步评价了其体外抗肝癌细胞增殖的生物活性。实验发现化合物7b可显著抑制HIF-1及其下游靶基因VEGF的表达,且体外抗肝癌增殖生物活性优于YC-1,半抑制浓度(IC₅₀)值为10.37 μmol/L。研究结果表明,3-(5'-羟甲基-2'-咪喃基)-1-(1''-对甲苯磺酰基)吲唑具有靶向抑制HIF-1及良好的抗肝癌活性作用。

关键词 吲唑; HepG2细胞; 低氧诱导因子1; 抗肝癌活性

中图分类号: O626.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2018)04-0410-10

DOI: 10.11944/j.issn.1000-0518.2018.04.170098

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的肿瘤之一,越来越多的研究发现,炎症微环境在包括肝癌在内的多种肿瘤进展、血管生成和侵袭中发挥了重要作用^[1]。低氧诱导因子1(HIF-1)是调控肿瘤内缺氧效应的关键转录因子,包括HIF-1 α 和HIF-1 β 。它能控制肿瘤细胞在缺氧条件下众多基因的表达,改变肿瘤细胞内糖代谢的方式,增强肿瘤组织血管生成,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移。由于细胞内对HIF-1的调控主要通过其 α 亚基进行,因此HIF-1 α 抑制剂成为抗肿瘤药物的研究热点。HIF-1 α 能够在3个方面加快糖酵解:1) HIF-1 α 转录表达出的与线粒体相关的酶类(如丙酮酸脱氢酶激酶1, PDK1等); 2) HIF-1 α 的表达上调其下游的葡萄糖转运蛋白靶基因(GLUT1和GLUT3); 3) 激活转录与葡萄糖代谢和糖酵解相关的关键酶类(如磷酸甘油酸酯激酶1, PKG1等)^[2]。其中,HIF抑制剂3-(5'-羟甲基-2'-咪喃基)-1-苯甲基吲唑(YC-1)因抑制HIF-1 α 表达及影响HIF-1 α 稳定性,而表现出潜在的抗肿瘤特性^[3-4]。

近年来,有大量的磺酰胺类抗肿瘤药物的研究发表。Lobb等^[5]将已有的抑制血管生成的磺酰胺类药物LY32262和LY33169结构进行改造获得了抗肿瘤活性更强的新化合物。刘菲等^[6]设计合成的一系列磺酰脲化合物也具有较好的抗肺癌、肝癌及结肠癌的作用。此外,在本课题组的前期研究中发现,在改造结构中连接哌啶基不仅能够提高化合物的稳定性,还能够调节化合物的pH值^[7-8]。

本文在前期研究工作的基础上,以HIF抑制剂YC-1为先导化合物,经优化药效基团设计合成了9个包含磺酰和哌啶结构的1,3-取代吲唑类化合物。所合成的化合物采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法初步评价了其对肝癌HepG2细胞增殖的体外抑制活性。其先导化合物及设计的目标化合物结构如图1所示。

2017-03-31 收稿 2017-06-20 修回 2017-07-10 接受

福建省科技厅项目(2015Y0081 2015J01350); 厦门大学大学生创新创业训练计划项目(2016X0644 20720152005)

通讯联系人: 李善花 副教授; Tel: 0592-2188672; Fax: 0592-2186786; E-mail: lish@xmu.edu.cn; 研究方向: 分子生物学

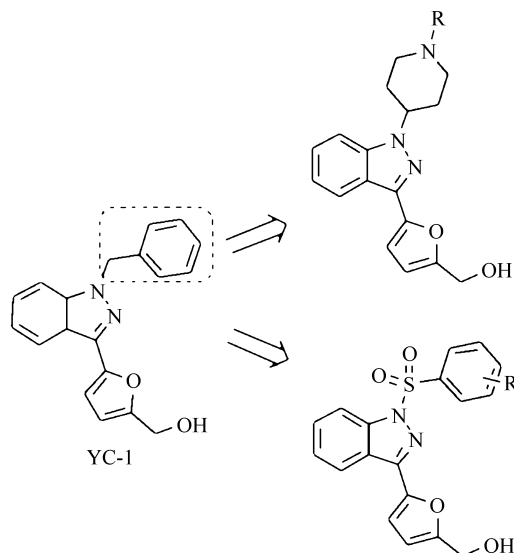


图1 先导化合物及设计的目标化合物结构

Fig. 1 The structures of lead compounds and designed compounds

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

AV III型 600 MHz 核磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司); Q-Exactive 型质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); AB3200Q 型 TRAP-MS 质谱仪(美国 AB 公司); Victor3 V 型多功能酶标仪(美国 Perkin-Elmer 公司); CEM DISCOVER 环形聚焦单模微波合成系统(美国 CEM 公司)。

细胞株 HepG2(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), 实验室自行传代培养。1-Boc-4-甲烷磺酰氨基哌啶($\geq 98\%$, 北京伊诺凯科技有限公司)、*N,N*-二甲基甲酰胺($\geq 98\%$, DMF, 上海泰坦科技股份有限公司)、硅胶(青岛海洋化工集团), 其它所用试剂均为市售化学纯或分析纯。

1.2 合成

1.2.1 3-(5'-甲酰-2'-咪喃)-1-哌啶基吡啶(3)的合成 将 1.00 g (8.46 mmol) 吡啶与 2.37 g (9.32 mmol) 碘晶体溶解于 10 mL DMF 中, 加入饱和氢氧化钠溶液 5 mL, 室温搅拌 3 h。反应完毕后, 加水、乙酸乙酯萃取 3 次, 有机层用无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂。除去溶剂后, 将 2.05 g (8.40 mmol) 中间产物与 2.37 g (8.48 mmol) 1-Boc-4-甲烷磺酰氨基哌啶再次溶于 10 mL DMF 中, 在冰浴下加入碳酸钾搅拌 10 min 后, 在油浴中加热到 100 °C, 搅拌过夜。反应后加水、乙酸乙酯萃取 3 次, 有机层依次用稀盐酸溶液、纯水、饱和氯化钠溶液分别萃取 2 次, 后用无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂, 经硅胶柱层析 ($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷}) = 1:10$) 分离得获得淡黄色固体(中间体 2)。将 3.50 g (8.20 mmol) 中间体 2, 1.38 g (9.86 mmol) 5-甲酰基咪喃-2-硼酸和 0.95 g (0.82 mmol) 四(三苯基膦)钯溶解于 50 mL 乙二醇二甲醚(DME)中, 加入 5 mL 饱和碳酸氢钠溶液, 在微波反应器中以 125 °C, 120 W 的条件反应 15 min。用水、乙酸乙酯萃取 3 次, 有机层用饱和氯化钠溶液萃取 2 次, 减压蒸除溶剂。将其溶于 20 mL 乙酸乙酯, 缓慢滴入 5~6 滴浓盐酸, 室温搅拌 4 h, 除去溶剂后, 经硅胶柱层析 ($V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷}) = 1:10$) 分离得获得 1.87 g 白色固体(中间体 3), 收率 74.8%。

1.2.2 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-哌啶基吡啶(4)的合成 将 2.36 g (8.00 mmol) 中间体 3 与 1.21 g (3.20 mmol) 硼氢化钠在干燥的 Ar 气条件下, 缓慢滴入 15 mL 无水乙醇, 室温搅拌 10 h。反应完成后, 加入稀盐酸溶液调节反应液 pH 值至 7, 抽滤去除沉淀, 减压蒸干溶剂, 经硅胶柱层析 ($V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷}) = 1:8$) 获得 1.40 g 白色固体(化合物 4), 收率 56%。 $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 8.20 (d,

$J = 8.25$ Hz, 1H) 7.93(d, $J = 8.25$ Hz, 1H) 7.75(d, $J = 3.85$ Hz, 1H) 7.56(dt, $J = 0.73, 7.70$ Hz, 1H), 7.38(t, $J = 7.61$ Hz, 1H) 7.33(d, $J = 3.85$ Hz, 1H) 5.14 ~ 5.21(m, 1H) 3.43 ~ 3.49(m, 3H) 3.14 ~ 3.21(m, 3H) 2.39 ~ 2.48(m, 3H) 2.12 ~ 2.22(m, 3H)。MS(ESI) 计算值 $C_{17}H_{19}N_3O_2$ $[M + H]^+$: 298.1 实测值: 298.1。

1.2.3 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-(1"-乙酮哌啶基) 咪唑(5a)的合成 将1.00 g(3.39 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-咪喃)-1-哌啶基咪唑(中间体3)溶于5 mL二氯甲烷(DCM),加入0.40 g(5.09 mmol)乙酰氯,缓慢滴入0.5 mL三乙胺,室温搅拌3 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (乙酸乙酯): V (正己烷) = 1:2)分离得到1.10 g白色固体。将1.10 g(3.26 mmol)白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌5 min,缓慢加入0.37 g(9.78 mmol)硼氢化钠,持续冰浴搅拌10 min后恢复室温,搅拌3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调pH值至7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (甲醇): V (DCM) = 1:10)分离得到0.74 g白色固体,收率为64%。mp 243.3 ~ 244.6 °C。 1H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.09(d, $J = 8.25$ Hz, 1H), 7.38 ~ 7.48(m, 3H) 7.23(ddd, $J = 1.19, 6.56, 8.02$ Hz, 1H) 6.83(d, $J = 3.30$ Hz, 1H) 6.46(d, $J = 3.30$ Hz, 1H) 4.78(d, $J = 13.76$ Hz, 1H) 4.74(s, 2H) 4.65 ~ 4.69(m, 1H) 4.03(d, $J = 14.12$ Hz, 1H) 3.25 ~ 3.34(m, 1H) 2.80 ~ 2.88(m, 1H) 2.37(dq, $J = 4.31, 12.20$ Hz, 1H) 2.26(dq, $J = 4.31, 12.20$ Hz, 1H) 2.16(s, 3H) 2.07 ~ 2.13(m, 2H); ^{13}C NMR(151 MHz, $CDCl_3$) δ : 169.0, 153.9, 148.8, 139.6, 136.1, 126.6, 121.9, 121.4, 121.3, 109.6, 108.9, 107.7, 57.6, 56.1, 45.6, 40.8, 31.7, 31.1, 21.4。MS(ESI) 计算值 $C_{19}H_{21}N_3O_3$ $[M + H]^+$: 340.2 实测值: 340.2。

1.2.4 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-(1"-丙烷酮哌啶基) 咪唑(5b)的合成 将1.00 g(3.39 mmol) 3-(5"-甲醛-2'-咪喃)-1-哌啶基咪唑(中间体3)溶于5 mL DCM,加入0.47 g(5.09 mmol)丙酰氯,缓慢滴入0.5 mL三乙胺,室温搅拌3 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (乙酸乙酯): V (正己烷) = 1:2)分离得到1.08 g白色固体。将1.08 g(3.09 mmol)白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌5 min,缓慢加入0.35 g(9.27 mmol)硼氢化钠,持续冰浴搅拌10 min后恢复室温,搅拌3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调pH值至7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (甲醇): V (DCM) = 1:10)分离得到0.73 g白色固体,收率为61%。mp 249.8 ~ 250.6 °C。 1H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.08(d, $J = 8.25$ Hz, 1H), 7.39 ~ 7.45(m, 2H) 7.22(t, $J = 7.24$ Hz, 1H) 6.83(d, $J = 3.30$ Hz, 1H) 6.45(d, $J = 3.30$ Hz, 1H), 4.80(d, $J = 13.02$ Hz, 1H) 4.74(s, 2H) 4.66(tt, $J = 4.17, 11.14$ Hz, 1H) 4.07(d, $J = 13.75$ Hz, 1H), 3.25(t, $J = 12.75$ Hz, 1H) 2.83(t, $J = 12.20$ Hz, 1H) 2.41(q, $J = 7.34$ Hz, 2H) 2.27 ~ 2.38(m, 2H), 2.16(s, 1H) 2.04 ~ 2.13(m, 2H) 1.19(t, $J = 7.43$ Hz, 3H); ^{13}C NMR(151 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.3, 154.0, 148.9, 139.7, 136.1, 126.6, 121.9, 121.4, 121.3, 109.6, 109.0, 107.7, 57.7, 56.3, 44.7, 41.0, 31.8, 31.2, 26.6, 9.6。MS(ESI) 计算值 $C_{20}H_{23}N_3O_3$ $[M + H]^+$: 354.2 实测值: 354.2。

1.2.5 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-(1"-异丁烷酮哌啶基) 咪唑(5c)的合成 将1.00 g(3.39 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-咪喃)-1-哌啶基咪唑(中间体3)溶于5 mL DCM,加入0.54 g(5.09 mmol)异丁酰氯,缓慢滴入0.5 mL三乙胺,室温搅拌3 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (乙酸乙酯): V (正己烷) = 1:2)分离得到1.07 g白色固体。将1.07 g(2.96 mmol)白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌5 min,缓慢加入0.34 g(8.88 mmol)硼氢化钠,持续冰浴搅拌10 min后恢复室温,搅拌3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调pH值至7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱(V (甲醇): V (DCM) = 1:10)分离得到0.74 g白色固体,收率为59%。mp 215.0 ~ 216.0 °C。 1H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.08(d, $J = 8.25$ Hz, 1H), 7.39 ~ 7.45(m, 2H) 7.23(dt, $J = 0.83, 7.29$ Hz, 1H) 6.83(d, $J = 3.30$ Hz, 1H) 6.46(d, $J = 3.12$ Hz, 1H) 4.82(d, $J = 12.65$ Hz, 1H) 4.74(d, $J = 5.50$ Hz, 2H) 4.68(tt, $J = 4.24, 11.26$ Hz, 1H) 4.16(d, $J = 12.84$ Hz, 1H) 3.28(t, $J = 12.20$ Hz, 1H) 2.79 ~ 2.90(m, 2H) 2.36(d, $J = 10.64$ Hz, 1H) 2.26(d, $J = 10.45$ Hz, 1H) 2.16 ~ 2.20(m, 1H) 2.06 ~ 2.16(m, 2H) 1.14 ~ 1.22(m, 6H); ^{13}C NMR(151 MHz,

CDCl_3) δ : 175.5, 153.9, 148.9, 139.7, 136.1, 126.6, 121.9, 121.4, 121.3, 109.6, 109.0, 107.7, 57.7, 56.4, 44.6, 41.1, 32.0, 31.3, 30.2, 19.6, 19.4。MS(ESI) 计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 368.2, 实测值: 368.2。

1.2.6 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃)-1-(1"-丁烷酮哌啶基)吡啶(5d)的合成 将1.00 g(3.39 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-呋喃)-1-哌啶基吡啶(中间体3)溶于5 mL DCM,加入0.54 g(5.09 mmol) 丁酰氯,缓慢滴入0.5 mL三乙胺,室温搅拌3 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:2$)分离得到1.05 g白色固体。将1.05 g(2.87 mmol)白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌5 min,缓慢加入0.33 g(8.61 mmol) 硼氢化钠,持续冰浴搅拌10 min后恢复室温,搅拌3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调pH值至7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{甲醇}):V(\text{DCM})=1:10$)分离得到0.73 g白色固体,收率为59%。mp 205.9~207.1 $^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H NMR}(600 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ δ : 8.08(d, $J=8.25 \text{ Hz}$, 1H), 7.43~7.45(m, 1H), 7.39~7.42(m, 1H), 7.23(ddd, $J=1.19, 6.56, 8.02 \text{ Hz}$, 1H), 6.83(d, $J=3.30 \text{ Hz}$, 1H), 6.46(d, $J=3.30 \text{ Hz}$, 1H), 4.80(d, $J=13.57 \text{ Hz}$, 1H), 4.74(s, 2H), 4.67(tt, $J=4.17, 11.23 \text{ Hz}$, 1H), 4.05~4.11(m, 1H), 3.22~3.29(m, 1H), 2.79~2.86(m, 1H), 2.35~2.40(m, 3H), 2.20~2.35(m, 2H), 2.07~2.14(m, 2H), 1.71(m, 2H), 1.00(t, $J=7.43 \text{ Hz}$, 3H); $^{13}\text{C NMR}(151 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ δ : 171.6, 153.9, 148.9, 139.7, 136.1, 126.6, 121.9, 121.4, 121.3, 109.6, 109.0, 107.7, 57.7, 56.3, 44.9, 40.9, 35.4, 31.8, 31.2, 18.8, 14.1。MS(ESI) 计算值 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 368.2, 实测值: 368.2。

1.2.7 3-(5'-甲醛-2'-呋喃)-吡啶(6)的合成 将1.00 g(8.46 mmol) 吡啶与2.37 g(9.32 mmol) 碘晶体溶解于10 mL DMF中,加入饱和氢氧化钠溶液5 mL,室温搅拌3 h。反应完毕后,加水、乙酸乙酯萃取3次,有机层用无水硫酸钠干燥,减压蒸除溶剂。除去溶剂后,将1.98 g(8.11 mmol) 中间体1, 2.5 g(8.92 mmol) 5-甲基呋喃-2-硼酸和0.94 g(0.81 mmol) 四(三苯基膦)钯溶解于50 mL DME中,加入5 mL饱和碳酸氢钠溶液,在微波反应器中以125 $^\circ\text{C}$, 120 W的条件反应15 min。加水、乙酸乙酯萃取3次,有机层用饱和氯化钠溶液萃取2次,减压蒸除溶剂。经硅胶柱层析($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:5$)分离得获得1.36 g白色固体(中间体6),收率76%。 $^1\text{H NMR}(600 \text{ MHz}, \text{DMSO}-d_6)$ δ : 13.72(s, 1H), 9.68(s, 1H), 8.17(d, $J=8.25 \text{ Hz}$, 1H), 7.73(d, $J=3.67 \text{ Hz}$, 1H), 7.66(d, $J=8.44 \text{ Hz}$, 1H), 7.48(ddd, $J=0.92, 7.01, 8.21 \text{ Hz}$, 1H), 7.32(ddd, $J=0.73, 7.02, 8.02 \text{ Hz}$, 1H), 7.29(d, $J=3.67 \text{ Hz}$, 1H); $^{13}\text{C NMR}(151 \text{ MHz}, \text{DMSO}-d_6)$ δ : 178.2, 154.6, 151.9, 141.5, 135.0, 127.4, 125.6, 122.7, 120.9, 120.3, 111.4, 109.5。

1.2.8 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃)-1-(1"-苯磺酰基)吡啶(7a)的合成 将1.00 g(4.72 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-呋喃)-吡啶(中间体6)溶于5 mL DCM,加入1.25 g(7.08 mmol) 苯磺酰,缓慢滴入1 mL三乙胺,室温搅拌6 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=1:2$)分离得到1.61 g白色固体。将1.61 g(4.57 mmol)白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌5 min,缓慢加入0.52 g(13.71 mmol) 硼氢化钠,持续冰浴搅拌10 min后恢复室温,搅拌3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调pH值至7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:2$)分离得到1.05 g白色固体,收率为63%。mp 198.6~199.5 $^\circ\text{C}$ 。 $^1\text{H NMR}(600 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ δ : 8.22(d, $J=8.62 \text{ Hz}$, 1H), 8.09(d, $J=8.07 \text{ Hz}$, 1H), 7.98~8.00(m, 2H), 7.58(ddd, $J=0.92, 7.24, 8.34 \text{ Hz}$, 1H), 7.51~7.55(m, 1H), 7.41~7.45(m, 2H), 7.36~7.40(m, 1H), 7.07(d, $J=3.30 \text{ Hz}$, 1H), 6.47(d, $J=3.48 \text{ Hz}$, 1H), 4.73(s, 2H), 1.70(br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}(151 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ δ : 155.7, 146.8, 143.3, 141.4, 137.4, 134.1, 129.5, 129.2, 127.5, 124.7, 123.4, 122.3, 113.4, 111.5, 109.8, 57.6。

1.2.9 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃)-1-(1"-对甲苯磺酰基)吡啶(7b)的合成 将1.00 g(4.72 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-呋喃)-吡啶(中间体6)溶于5 mL DCM,加入1.35 g(7.08 mmol) 对甲苯磺酰,缓慢滴入1 mL三乙胺,室温搅拌6 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取2次,有机层用饱和食盐水萃取2次后,减压旋蒸。经

硅胶层析柱($V(\text{甲醇}):V(\text{DCM})=1:2$)分离得到 1.52 g 白色固体。将 1.52 g(4.15 mmol) 白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌 5 min,缓慢加入 0.47 g(12.45 mmol) 硼氢化钠,持续冰浴搅拌 10 min 后恢复室温,搅拌 3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调 pH 值至 7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:2$)分离得到 1.01 g 白色固体,收率为 58%。mp 203.5~204.5 °C。 $^1\text{H NMR}(600\text{ MHz},\text{CDCl}_3)$ δ : 8.21(d, $J=8.44\text{ Hz}$, 1H), 8.08(d, $J=8.07\text{ Hz}$, 1H), 7.86(d, $J=8.25\text{ Hz}$, 2H), 7.51~7.60(m, 1H), 7.37(t, $J=7.52\text{ Hz}$, 1H), 7.21(d, $J=8.25\text{ Hz}$, 2H), 7.06(d, $J=3.48\text{ Hz}$, 1H), 6.46(d, $J=3.30\text{ Hz}$, 1H), 4.73(s, 2H), 2.32(s, 3H), 1.73(br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}(151\text{ MHz},\text{CDCl}_3)$ δ : 155.6, 146.8, 145.4, 143.2, 141.4, 134.5, 129.8, 129.4, 127.6, 124.6, 123.4, 122.2, 113.4, 111.3, 109.8, 57.6, 21.6。HRMS(ESI) 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$: 369.0911, 实测值: 369.0909。

1.2.10 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-(1"-间甲苯磺酰基)吡唑(7c)的合成 将 1.00 g(4.72 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-咪喃)-吡唑(中间体 6)溶于 5 mL DCM,加入 1.35 g(7.08 mmol) 间甲苯磺酰,缓慢滴入 1 mL 三乙胺,室温搅拌 6 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取 2 次,有机层用饱和食盐水萃取 2 次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{甲醇}):V(\text{DCM})=1:2$)分离得到 1.37 g 白色固体。将 1.37 g(3.74 mmol) 白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌 5 min,缓慢加入 0.42 g(11.22 mmol) 硼氢化钠,持续冰浴搅拌 10 min 后恢复室温,搅拌 3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调 pH 值至 7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:2$)分离得到 0.89 g 白色固体,收率为 51%。mp 199.0~201.5 °C。 $^1\text{H NMR}(600\text{ MHz},\text{CDCl}_3)$ δ : 8.22(d, $J=8.62\text{ Hz}$, 1H), 8.10(d, $J=8.07\text{ Hz}$, 1H), 7.81(s, 1H), 7.78(d, $J=7.70\text{ Hz}$, 1H), 7.58(ddd, $J=1.10, 7.20, 8.39\text{ Hz}$, 1H), 7.36~7.40(m, 1H), 7.28~7.35(m, 2H), 7.07(d, $J=3.30\text{ Hz}$, 1H), 6.47(d, $J=3.48\text{ Hz}$, 1H), 4.74(d, $J=4.77\text{ Hz}$, 2H), 2.35(s, 3H), 2.14(br s, 1H); $^{13}\text{C NMR}(151\text{ MHz},\text{CDCl}_3)$ δ : 155.6, 146.9, 143.2, 141.4, 139.6, 137.3, 135.0, 129.5, 129.1, 127.8, 124.7, 124.6, 123.4, 122.2, 113.4, 111.4, 109.8, 57.6, 21.3。MS(ESI) 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$: 369.1, 实测值: 369.1。

1.2.11 3-(5'-羟甲基-2'-咪喃)-1-苯基吡唑(7d)的合成 将 1.00 g(4.72 mmol) 3-(5'-甲醛-2'-咪喃)-吡唑(中间体 6)溶于 5 mL DCM,加入 1.21 g(7.08 mmol) 溴化苯,缓慢滴入 1 mL 三乙胺,室温搅拌 6 h。反应后,加水、二氯甲烷萃取 2 次,有机层用饱和食盐水萃取 2 次后,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{甲醇}):V(\text{DCM})=1:2$)分离得到 1.22 g 白色固体。将 1.22 g(4.04 mmol) 白色固体在干燥的环境下,溶于无水乙醇,在冰浴下搅拌 5 min,缓慢加入 0.46 g(12.12 mmol) 硼氢化钠,持续冰浴搅拌 10 min 后恢复室温,搅拌 3 h。充分反应后,加入稀盐酸溶液淬灭,调 pH 值至 7,抽滤除去沉淀,减压旋蒸。经硅胶层析柱($V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{正己烷})=1:3$)分离得到 1.01 g 白色固体,收率为 71%。mp 111.0~112.5 °C。 $^1\text{H NMR}(600\text{ MHz},\text{CDCl}_3)$ δ : 8.05(d, $J=8.07\text{ Hz}$, 1H), 7.33~7.37(m, 1H), 7.29(dd, $J=7.98, 14.76\text{ Hz}$, 3H), 7.23~7.26(m, 1H), 7.19~7.23(m, 3H), 6.87(d, $J=3.30\text{ Hz}$, 1H), 6.46(d, $J=3.30\text{ Hz}$, 1H), 5.64(s, 2H), 4.74(s, 2H), 3.47(s, 1H)。MS(ESI) 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2 [\text{M}+\text{H}]^+$: 305.1, 实测值: 305.1。

1.4 靶向抑制 HIF 及体外抗肝癌增殖活性的评价

MTT 法:将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板(5000 个/孔),培养 24 h 后给药,药物浓度梯度设置为 0.1、1、10 及 20 $\mu\text{mol/L}$,给药 48 h 后进行 MTT 活性检测。

细胞增殖实验:将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 12 孔板(0.5×10^5 个/孔),培养 24 h 后给药,药物浓度梯度设置为 1、10 及 20 $\mu\text{mol/L}$,分别于给药 1、2 和 3 d 后进行细胞计数。

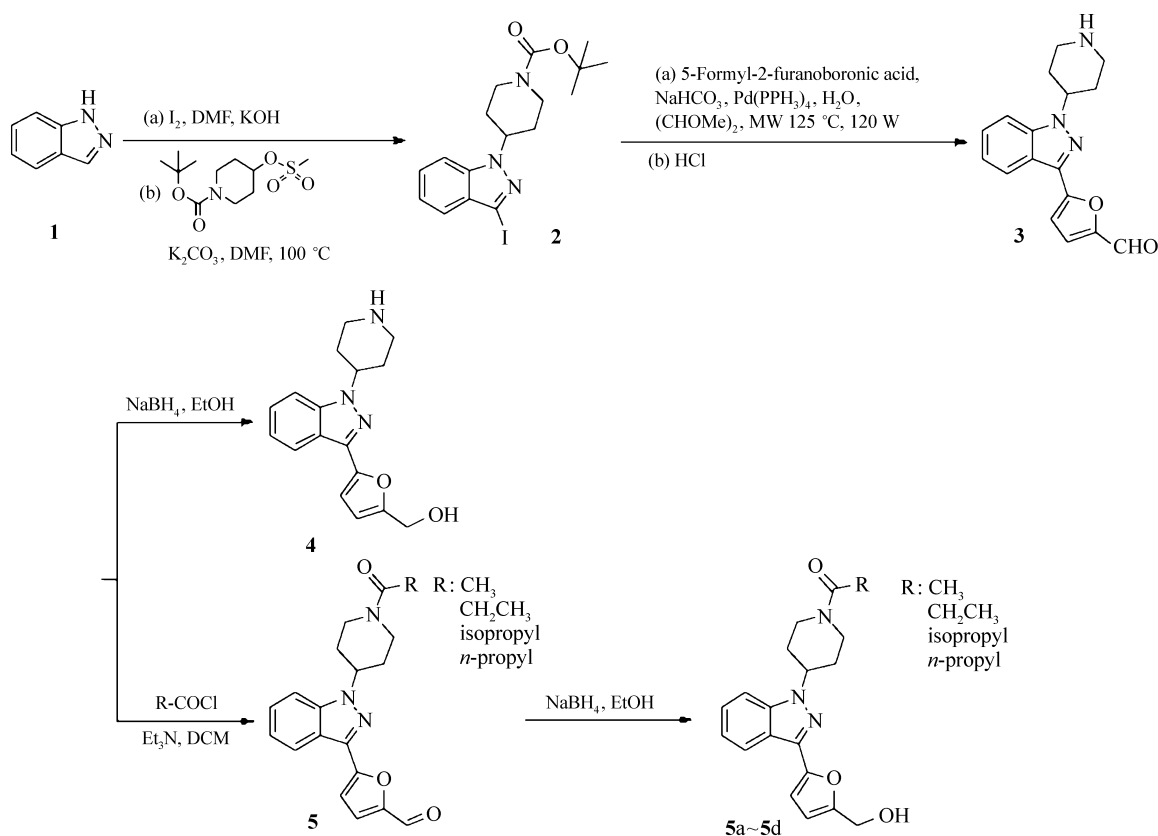
蛋白质印迹法(Western Blot assay):将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 60 mm 培养皿,培养 24 h 后,按照 1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度给药,同时予以低氧模拟剂去铁胺(Desferrioxamine, DFX) 130 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞,给药 24 h 后收集细胞,裂解细胞制备蛋白样品,经 8% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭后,分别以 1:1000/1:5000 的 HIF-1 α / β -actin(β -肌动蛋白)抗体 4 °C 孵育过夜,经 1:5000 的二抗室温孵育 1 h,应用 ECL 试剂盒显影。

荧光定量逆转录聚合酶链反应(Real time-PCR): 将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 35 mm 培养皿, 培养 24 h 后, 按照 1、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度给药, 同时予以 DFX 130 $\mu\text{mol/L}$ 处理细胞, 给药 24 h 后收集细胞, 提取核糖核酸(RNA), 逆转录为互补 DNA(cDNA), 应用 ABI 公司生产的 stepONE 实时定量 PCR 仪检测 VEGF 信使 RNA(mRNA) 的水平。

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成路线

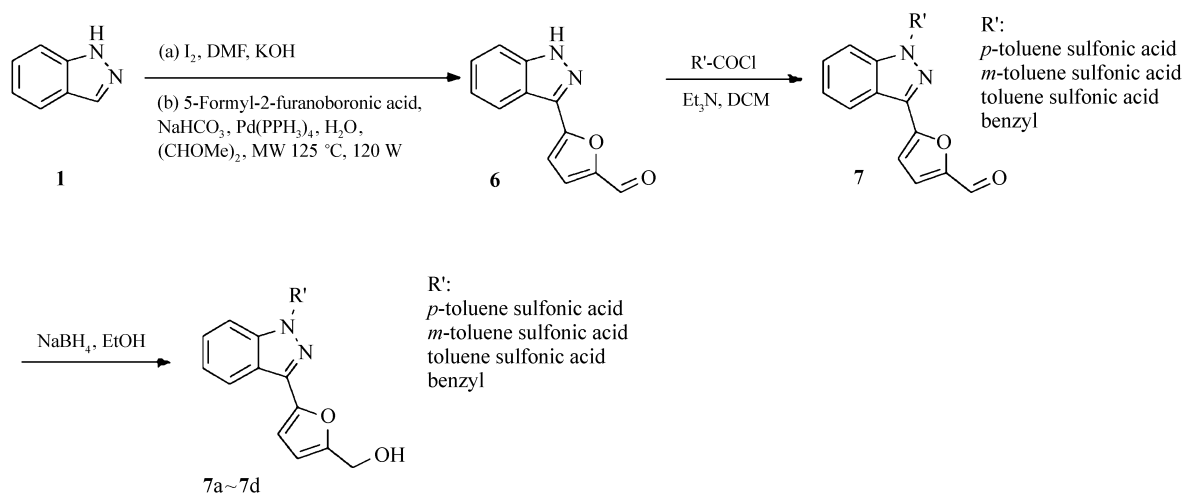
目标化合物的合成见 Scheme 1 和 Scheme 2。在 Scheme 1 中首先将吡唑(化合物 1) 与碘晶体溶解于 DMF 中, 在碱性条件下生成 3-碘吡唑, 将其与 1-Boc-4-甲氧磺酰氨基哌啶在碳酸钾的催化下生成中间体 2^[9-10]。中间体 2 与 5-甲酰基呋喃-2-硼酸溶解于 DME 中, 在饱和碳酸氢钠中加入催化剂四(三苯基膦)钯, 经微波反应后用稀盐酸处理获得中间体 3^[11]。中间体 3 经硼氢化钠催化的还原反应, 获得 3-(5'-羟甲基-2'-呋喃)-1-哌啶基吡唑(化合物 4)。化合物 4 经简单的脱水缩合反应可获得化合物 5a~5d。



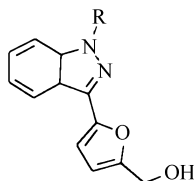
Scheme 1 Synthesis route of the target compounds 5a~5d

2.2 目标化合物的生物学数据

基于本课题组已报道的二芳醚类抗肿瘤活性的研究结果^[7-8], 本文设计并合成出了 9 个 1,3-取代吡唑衍生物 4、5a~5d、7a~7d。采用 MTT 法测试化合物对人肝细胞癌 HepG2 细胞株的体外增殖抑制作用^[12]。实验重复 3 次, 取平均值, 阳性对照药物为 7d(YC-1)(表 1)。在此基础上进一步比较了不同浓度的化合物 7b 与阳性对照 YC-1 对 HepG2 细胞存活率的抑制作用, 采用细胞计数检测了化合物 7b 对 HepG2 细胞体外增殖的抑制作用(图 2); 应用 Western blot 及 Real time-PCR 等方法检测了化合物 7b 对 HIF-1 及其下游基因 VEGF 表达的靶向抑制作用(图 3)。



Scheme 2 Synthesis route of the target compounds 7a ~ 7d

表 1 化合物 4、5a ~ 5d 和 7a ~ 7d 对 HepG2 细胞株的 IC_{50} Table 1 IC_{50} values of compounds 4, 5a ~ 5d, 7a ~ 7d on HepG2 cell line *in vitro*

Compounds	R	IRb@ 20 $\mu\text{mol/L}/\%$ ^a	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
4		7.93	not tested ^b
5a		8.83	not tested ^b
5b		61.01	12.41
5c		19.33	not tested ^b
5d		16.34	not tested ^b
7a		36.18	not tested ^b
7b		62.57	10.37
7c		45.83	not tested ^b

Continued on next page

continued from previous page

Compounds	R	IRb@20 $\mu\text{mol/L}/\%$	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
7d(YC-1)		54.21	16.56

a. IRb: Irbesartan; b. not tested as the inhibition rate of preliminary screening less than 50%.

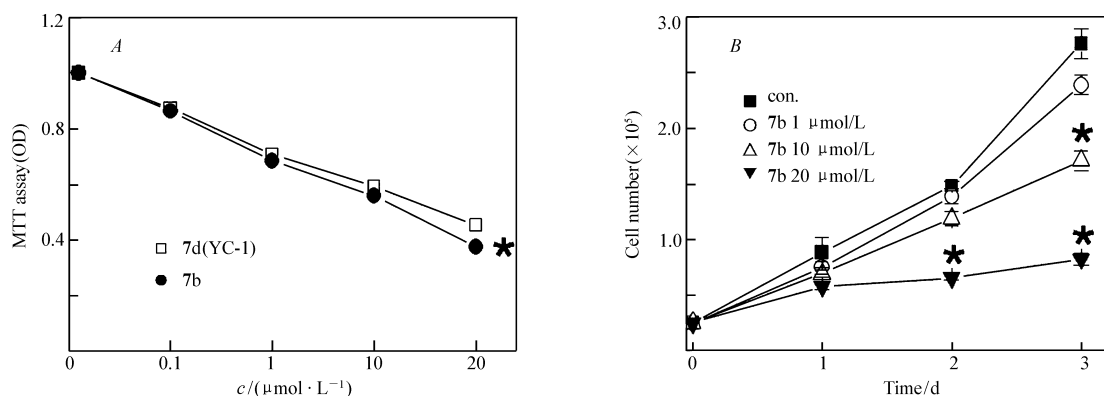


图2 化合物7b显著抑制HepG2细胞的增殖

Fig. 2 Proliferation of HepG2 cells was significantly inhibited by compound 7b

A. MTT assay was performed by YC-1 and different doses compound 7b ($n=4$) ($*P<0.05$); B. the growth curves of HepG2 cells treatment with different doses compound 7b ($n=3$) ($*P<0.01$)

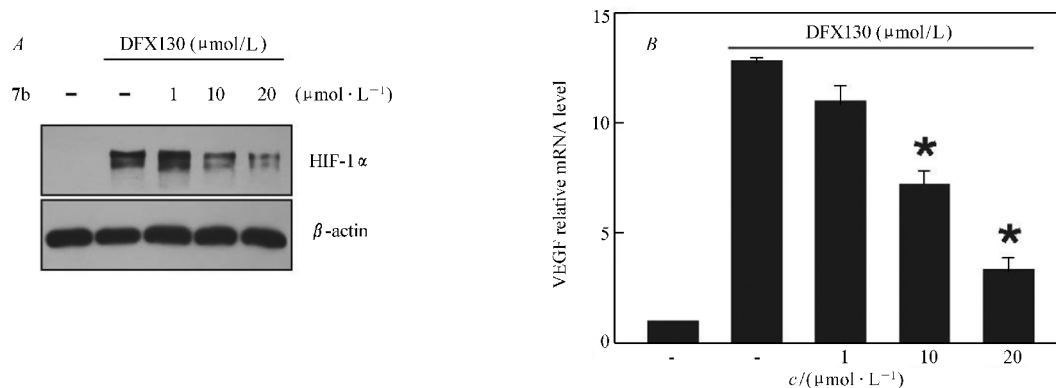


图3 化合物7b抑制HepG2细胞HIF-1 α (A)及靶基因VEGF(B)的表达

Fig. 3 Expression of HIF-1 α and target gene VEGF were inhibited by compound 7b in HepG2 cells

A. western blot analysis was used to examine the expression of HIF-1 α and β -actin proteins in HepG2 cells after incubation with compound 7b and DFX for 24 h; B. real time-PCR was used to examine the mRNA level of VEGF in HepG2 cells after incubation with compound 7b and DFX for 24 h ($n=3$) ($*P<0.01$)

初步的细胞凋亡粗筛 MTT 试验后,我们可以从粗筛结果中看出一些变化:相较于具有活泼氮氢的化合物 4,引入简单烷基结构(化合物 5a~5d)能够提高化合物的 HepG2 细胞抑制率;化合物 5a~5d 对比可以看出简单烷基链并不是越长越有利,过长的或是空间结构更加复杂的烷基结构反而会降低化合物的抑制活性,很有可能是因为过多的烷基破坏了化合物原本空间的电子云分布,降低了其与对应受体的结合率;化合物 7a~7c 与已知化合物 YC-1(化合物 7d)结构相近,磺酰基的替换并没有对化合物的活性造成太大影响,甚至略有降低,但在苯环上引入甲基后有所改变,对位甲基取代的稳定结构提升了化合物的活性,很可能是因为甲基的存在形成共轭,使化合物的电子云密度分布发生改变(共平面化、趋于平均)。我们以 50% 为分界线,抑制率低于 50% 的化合物不再做进一步分析,而抑制率高于 50% 的化合物 5b、7b 和 7d 进行了进一步 MTT 分析求出其 IC₅₀ 值。实验结果表明,相较于阳性对照 YC-1 的抑

制率($IC_{50} = 16.56 \mu\text{mol/L}$)而言,化合物5b和7b表现出较好的抗肝癌活性,其中化合物7b的 $IC_{50} = 10.37 \mu\text{mol/L}$ 尤为突出。苯环上引入推电子基团甲基后活性增加,其对位取代活性最强。初步推测可能与取代基的诱导效应及苯环上电子云密度有关。从图2A可以看出,在给药化合物7b后,HepG2细胞存活率随着给药浓度增加逐渐降低,而且化合物7b对HepG2细胞的抑制率要优于阳性对照药YC-1。从图2B可以看出,相对于空白对照,给药化合物7b后,HepG2细胞体外增殖速度显著降低,而且随着给药浓度增加,HepG2细胞体外增殖速度逐渐降低。化合物7b通过Western Blot及Real time-PCR等方法检测了其对HIF-1及其靶基因VEGF表达水平的影响,从图3A可以看出,化合物7b可显著抑制HIF-1的蛋白表达,图3B显示的是随着化合物7b给药浓度增加,HIF-1下游靶基因VEGF的mRNA表达水平逐渐被抑制。综上所述,新结构3-取代-1-对甲苯磺酰基吲唑类化合物具有靶向抑制HIF及良好的抗肝癌活性作用。由于化合物数量有限,因此其它取代基对抗肿瘤活性的影响有待于进一步研究。

3 结论

本文设计合成了9个1- β -取代吲唑衍生物。生物活性评价结果表明其具有不同程度的HIF-1抑制作用。将先导化合物YC-1的苯基结构替换为吡啶或苯磺酰基结构,发现化合物5b和7b活性优于YC-1的化合物,为今后的设计提供了理论和实验依据。特别是化合物7b具有良好的HIF-1靶向抑制作用及抗肝癌活性($IC_{50} = 10.37 \mu\text{mol/L}$),并较好地抑制了VEGF的表达水平。因此,化合物7b可作为潜在的抗肿瘤药物。更深层次机制,如HIF-1相关的信号通路和蛋白的关系,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] LIANG Hongyuan, LU Zaiming. Current Situation and Perplexity of Comprehensive Interventional Therapy for Primary Liver Cancer[J]. *J Clin Hepatol* 2016 **32**(1): 44-48 (in Chinese).
梁宏元, 卢再鸣. 原发性肝癌综合介入治疗现状与困惑[J]. *临床肝胆病杂志* 2016 **32**(1): 44-48.
- [2] Denko N C. Hypoxia, HIF1 and Glucose Metabolism in the Solid Tumour[J]. *Nat Rev Cancer* 2008 **8**(9): 705-713.
- [3] Tsui L, Fong T H, Wang I J. YC-1 Targeting of Hypoxia-Inducible Factor-1A Reduces RGC-5 Cell Viability and Inhibits Cell Proliferation[J]. *Mol Vis* 2012 **18**: 1594-1603.
- [4] Tsui L, Fong T H, Wang I J. The Effect of 3-(5-Hydroxymethyl-2'-Furyl)-1-Benzylindazole (YC-1) on Cell Viability Under Hypoxia[J]. *Mol Vis* 2013 **19**: 2260-2273.
- [5] Lobb K, Hipskind P, Aikins J, et al. Acyl Sulfonamide anti-Proliferatives: Benzene Substituent Structure-Activity Relationships for a Novel Class of Antitumor Agents[J]. *J Med Chem* 2004 **47**(22): 5367-5380.
- [6] LIU Fei, LIU Nan, HE Ling. Synthesis and Antitumor Activities of Sulfonyl Amidine Derivatives [J]. *Chinese J Synth Chem* 2014 **22**(4): 440-443 (in Chinese).
刘菲, 刘楠, 何菱. 磺酰脲衍生物的合成及其抗肿瘤活性[J]. *合成化学* 2014 **22**(4): 440-443.
- [7] Yang S M, Huang Z N, Zhou Z S, et al. Structure-based Design, Structure-Activity Relationship Analysis, and Antitumor Activity of Diaryl Ether Derivatives[J]. *Arch Pharm Res* 2015 **38**(10): 1761-1773.
- [8] Hou J, Zhao W, Huang Z N, et al. Evaluation of Novel N-(Piperidin-4-yl) Benzamide Derivatives as Potential Cell Cycle Inhibitors in HepG2 Cells[J]. *Chem Biol Drug Des* 2015 **86**(2): 223-231.
- [9] Xiao J, Jin C, Liu Z, et al. The Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel YC-1 Derivatives as Potent Anti-Hepatic Fibrosis Agents[J]. *Org Biomol Chem* 2015 **13**(26): 7257-7264.
- [10] Zhang D, Kohlman D, Krushinski J, et al. Design, Synthesis and Evaluation of Bicyclic Benzamides as Novel 5-HT_{1F} Receptor Agonists[J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2004 **14**(24): 6011-6016.
- [11] An H, Kim N J, Jung J W, et al. Design, Synthesis and Insight into the Structure Activity Relationship of 1- β -Disubstituted Indazoles as Novel HIF-1 Inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2011 **21**(21): 6297-6300.
- [12] Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, et al. Sulforaphane, a Naturally Occurring Isothiocyanate, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT29 Human Colon Cancer Cells[J]. *Cancer Res* 2000 **60**(5): 1426-1433.

Synthesis and Anti-Hepatoma Activities of 1,3-Substituted Indazole Derivatives as Hypoxia Induced Factor Inhibitors

LI Shanhua^{a*}, HUANG Zhining^b, MIAO Fangxiao^a, ZHENG Manyi^b, LIANG Han^b,
WANG Baorui^b, QU Ning^a, QIAO Hong^a, WANG Haili^b, LI Funan^b

(^aMedical College; ^bSchool of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China)

Abstract Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is closely related to the growth, invasion and drug resistance of tumor cells and is highly expressed in tumor cells, so new HIF-1 inhibitors can be used as potential antitumor drugs. Nine 1,3-substituted indazole derivatives were synthesized. The expression of HIF-1 and its target gene vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western Blot and Real time-PCR (polymerase chain reaction), and the anti-tumor activities of all the newly synthesized compounds were evaluated on the *in vitro* growth of HepG2 cell line taking 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole (YC-1) (compound 7d) as positive control. We found that compound 7b significantly inhibited the expression of HIF-1 and its downstream target gene VEGF, and the anti-hepatoma biological activity *in vitro* of compound 7b was better than that of YC-1 with half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 10.37 μmol/L. The results show that 3-(5'-hydroxy methyl-2'-furan)-1-(1'-p-tolylsulfonyl) indazole targets the inhibition of HIF activity, but also has a good anti-hepatoma activity.

Keywords indazole; hepG2 cells; hypoxia-inducible factor 1; anti-hepatoma activity

Received 2017-03-31; Revised 2017-06-20; Accepted 2017-07-10

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province of China (No. 2015Y0081, No. 2015J01350), XMU Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. 2016X0644, No. 20720152005)

Corresponding author: LI Shanhua, associate professor; Tel: 0592-2188672; Fax: 0592-2186786; E-mail: lish@xmu.edu.cn; Research interests: molecular biology