

新型川芎嗪类衍生物的设计、合成及其生物活性的研究

张 阳^{1,2}, 杨 雨^{1,2}, 李家明^{1,2*}, 马晓东^{1,2}, 张艳春^{1,2}, 王玉骏^{1,2}, 朱盼虎^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽省中医药科学院药物化学研究所, 安徽 合肥 230038)

摘要: 以川芎嗪为先导化合物, 设计合成了 10 个川芎嗪类衍生物, 其结构经 ¹H NMR、¹³C NMR、ESI-MS 确证。采用 MTT 法考察目标化合物对 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞株增殖的影响; 采用划痕实验, transwell 小室法考察目标化合物对 A549 迁移和侵袭能力的影响; 采用 Western 印迹考察目标化合物对 A549 细胞迁移和侵袭的作用机制; 另外, 通过流式细胞仪分析其细胞周期。结果显示, 目标化合物 **Z8** 和 **Z10** 有一定的抗增殖活性, 其对 A549 细胞迁移和侵袭的能力有很强的抑制作用; 其抑制作用与 MMP-2 和 MMP-9 浓度水平下降有关。细胞周期分析显示, 目标化合物 **Z8** 和 **Z10** 会增强 G2/M 期细胞阻滞。

关键词: 川芎嗪类衍生物; 迁移; 侵袭; 细胞周期

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1722-09

Design, synthesis and biological evaluation of the novel ligustrazine derivatives

ZHANG Yang^{1,2}, YANG Yu^{1,2}, LI Jia-ming^{1,2*}, MA Xiao-dong^{1,2}, ZHANG Yan-chun^{1,2},
WANG Yu-jun^{1,2}, ZHU Pan-hu^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Department of Medicinal Chemistry, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract: Using ligustrazine as the leading compound, we designed and synthesized ten novel ligustrazine derivatives, whose structures were determined by ¹H NMR, ¹³C NMR and MS. Inhibitory effects of the new compounds on the proliferation of A549, A549/DDP and HBE cells were detected by MTT assay. The inhibitory activity of the synthesized compounds on migration and invasion of A549 cells were evaluated through scratch assay and transwell assay. Mechanism of the inhibition on migration and invasion was investigated by Western blotting. In addition, the cell cycle was analyzed with flow cytometry. The results showed that, both compounds **Z8** and **Z10** have an anti-proliferative activity, and the potencies of inhibition of tumor-cell migration and invasion were attributed to the down-regulation of MMP-2 and MMP-9. The compounds **Z8** and **Z10** could also enhance G2/M arrest in A549 cell as revealed by cell cycle analysis.

Key words: ligustrazine derivative; migration; invasion; cell cycle

肿瘤细胞的侵袭与迁移是恶性肿瘤最重要的生物学特征, 也是恶性肿瘤难以治愈的主要原因, 在癌

症相关的死亡率中所占比例超过 90%^[1,2]。肿瘤细胞侵袭转移到邻近组织或器官是一个多步骤复杂的过程。在此过程中, 肿瘤细胞必须具备降解细胞外基质及基底膜功能, 而基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在降解细胞外基质及基底膜过程中能够起重要的作用^[3]。有关研究发现, MMP-2 和 MMP-9 的表达与肿瘤细胞的迁移和侵袭密切相

收稿日期: 2017-04-07; 修回日期: 2017-06-07.

基金项目: 国家创新药物孵化基地项目 (2012ZX09401066).

*通讯作者 Tel: 86-551-68129147, Fax: 86-551-65169222,

E-mail: lijiaming2017@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0323

关^[4, 5]。通过抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移达到抑制其在体内扩散的目的, 是临床治疗恶性肿瘤重要而有效的手段^[6-8]。

川芎嗪 (图 1) 是中药川芎中的主要活性生物碱, 具有扩张血管、抑制血小板聚集、防止血栓形成等多种作用, 临床上被广泛用于缺血性脑血管病的治疗并取得较好疗效^[9]。近年来研究证明川芎嗪可诱导肿瘤细胞凋亡^[10, 11]。Zheng 等^[12]研究表明川芎嗪有抑制肺癌 A549 细胞增殖和迁移作用, TMP (tetramethylpyrazine, $7.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与细胞作用 24 h 后, 对肺癌 A549 细胞增殖的抑制率仅为 20% 左右。

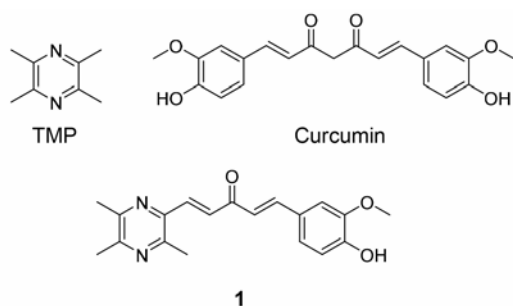


Figure 1 Structures of TMP, curcumin and 1

姜黄素 (图 1) 是中药姜黄中主要活性成分, 药理研究表明姜黄素具有抑制多种肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和血管生成作用^[13]。同时 Guan 等^[14]研究显示姜黄素可抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移。Ai 等^[15]设计了一系列姜黄素衍生物, 具有较好的抗肿瘤活性, 其中图 1 中的化合物 1 ($\text{IC}_{50} = 2.19 \pm 0.14 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抗肿瘤活性优于顺铂 (cisplatin, DDP, $\text{IC}_{50} = 8.10 \pm 0.97 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、TMP ($\text{IC}_{50} > 200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和姜黄素 (curcumin, $\text{IC}_{50} = 38.12 \pm 2.87 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。但是, 近来研究^[16]发现姜黄素稳定性差, 易转化成非活性化合物。Potter 等^[17]将姜黄素的结构简化, 用哌啶酮代替 β -二酮, 设计合成了一系列 3,5-二芳基亚甲基-4-哌啶酮衍生物, 生物学评价显示有一定的抗肿瘤作用。

本课题组努力寻求具有抗迁移和抗侵袭效果的抗癌剂时, 以川芎嗪为先导化合物, 将药效团拼合原理和构象限制策略引入姜黄素以获得具有新骨架的化合物, 由于姜黄素的不稳定和生物活性差的特点, 本研究组将姜黄素结构简化, 保留单羰基结构。首先, 川芎嗪取代姜黄素的 3-甲氧基-4-羟基苯基部分; 其次, 通过用环戊酮部分代替 β -二酮, 姜黄素中的两个取代的苯基之间的连接被构象限制 (图 2)。建立在理论基础, 设计合成了 10 个川芎嗪类衍生物, 并对其针

对 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞株的抗增殖活性进行生物学评价。此外, 选择其中的一些代表性化合物评价其抗迁移和抗侵袭效应, 并进一步研究其机制。

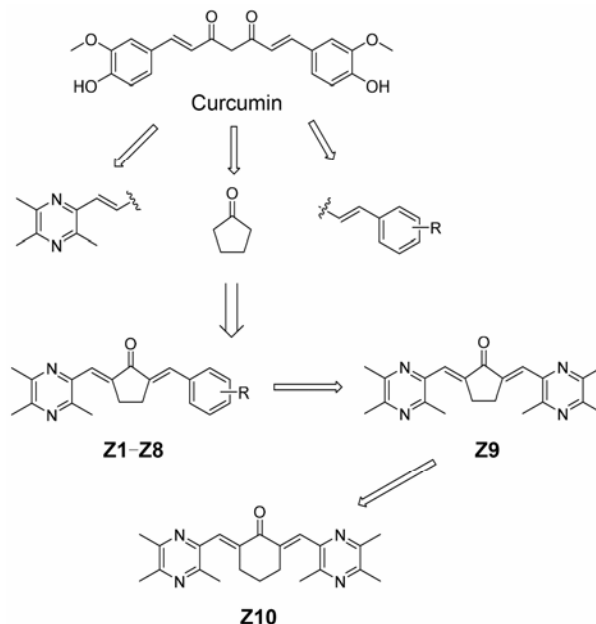


Figure 2 The design of ligustrazine derivatives

结果与讨论

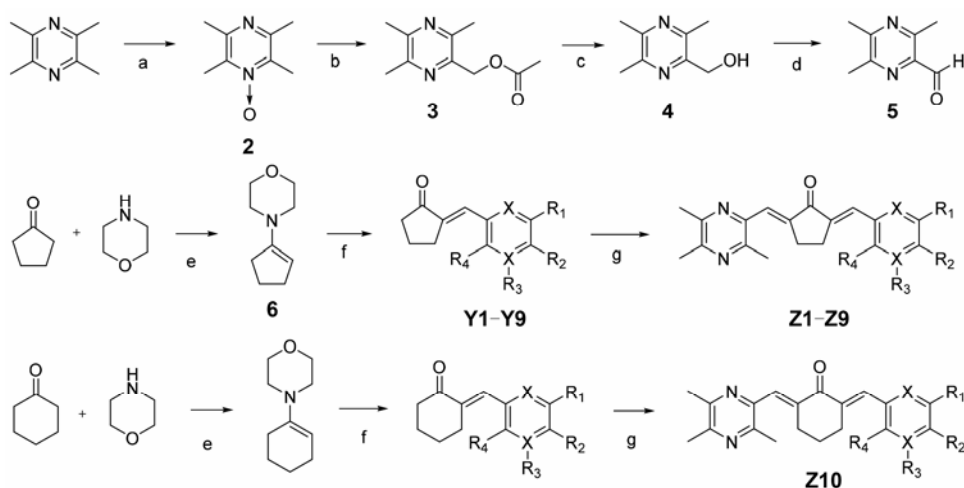
1 化学合成部分

在合成目标化合物 Z1~Z8 时, 为了提高产率以及防止取代的苯甲醛和环戊酮两边同时发生缩合, 先将环戊酮与吗啉反应生成烯胺, 再与取代的苯甲醛进行单边缩合。

目标化合物结构经 NMR、ESI-MS 确证, 化合物的合成见合成路线 1, 化合物的理化数据见表 1、2。

2 目标化合物的药理性

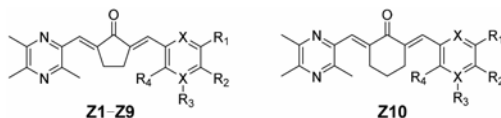
2.1 目标化合物对 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞增殖的影响 由于 DDP 的抗肿瘤细胞增殖活性远强于 TMP 和姜黄素, 所以选用 DDP 为阳性对照, 选用不同浓度梯度的待测物与 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞作用 48 h。MTT 法结果显示 (表 3), 目标化合物均表现出一定的抗增殖活性, 其中化合物 Z8 对 A549 和 A549/DDP 细胞株的 IC_{50} 分别为 41 ± 2.5 、 $35 \pm 1.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 Z10 对 A549 和 A549/DDP 细胞株的 IC_{50} 分别为 17 ± 1.5 、 $22 \pm 1.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 化合物 Z10 和 Z8 对 A549/DDP 细胞株的抗增殖活性优于 DDP ($88 \pm 6.9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而 DDP ($15 \pm 2.9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 A549 细胞株的抗增殖活性与化合物 Z10 相当, 强于化合物 Z8。与 A549 细胞株相比, 化合物 Z9 对 A549/DDP 有较好的抗增殖活性。所有目标化合物对 HBE



Reagents and conditions: (a) H_2O_2 , HOAc, 94°C , 12 h; (b) Ac_2O , 130°C , 5 h; (c) 20% NaOH, r.t., 12 h; (d) MnO_2 , 78°C , 10 h; (e) morpholine, benzene, 110°C , 10 h; (f) the corresponding aldehyde, reflux, 8 h; (g) ligustrazine aldehyde NaOH, EtOH, 1 h.

Scheme 1 Synthetic route of target compounds

Table 1 Structure and physical property of target compounds



Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Yield/%	mp/ $^\circ\text{C}$	Character
Z1	H	OCH ₃	H	H	C	61.2	160.2–161.7	Yellow crystal
Z2	H	H	CH ₃	H	C	63.8	168.2–169.7	Yellow crystal
Z3	H	H	H	H	C	60.9	197.5–198.1	Light yellow crystal
Z4	H	Cl	H	H	C	40.9	205.4–206.5	Yellow crystal
Z5	H	Br	H	H	C	60.9	205.5–206.5	Light yellow crystal
Z6	H	N(CH ₃) ₂	H	H	C	53.2	209.7–210.8	Dark red crystal
Z7	OCH ₃	H	OCH ₃	H	C	65.4	197.9–199.2	Light yellow crystal
Z8	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	C	58.7	205.4–206.5	Yellow crystal
Z9	CH ₃	CH ₃	–	CH ₃	N	45.3	210.4–211.4	Light yellow crystal
Z10	CH ₃	CH ₃	–	CH ₃	N	50.6	198.4–199.2	Yellow crystal

细胞株有较弱的抑制作用。

初步构效关系显示, 当 R_1 、 R_2 、 R_3 为 $-\text{OCH}_3$ 时, 细胞株的抗增殖作用优于单甲氧基取代和双甲氧基取代。当 R_2 为 Cl 或 Br 时, 抗增殖活性没有明显的差异。当中间体的连接桥为环己酮时, 活性优于环戊酮。双川芎嗪衍生物与单川芎嗪衍生物的抗增殖活性没有明显的差异。为了进一步讨论该类化合物的构效关系, 在后续的研究中, R_1 、 R_2 、 R_3 将引入其他不同类型的取代基。同时, 右侧芳环引入其他杂环, 如吡啶、咪唑、呋喃等。进一步研究其对抑制细胞增殖活性的影响。

2.2 目标化合物对 A549 细胞迁移和侵袭的影响
基于 MTT 实验结果, 以 DDP、TMP 和姜黄素为阳性对照。分别采用划痕实验 (图 3) 和 transwell 小室实验 (图 4) 进一步检测抗增殖活性较好的化合物 **Z8** 和 **Z10** 对 A549 细胞株迁移及侵袭的影响。

划痕实验结果表明目标化合物 **Z8** 和 **Z10** 对 A549 细胞的迁移能力有不同程度的抑制作用, 其中化合物 **Z10** 对 A549 细胞迁移的抑制作用优于 DDP、TMP 和姜黄素, 化合物 **Z8** 的抑制作用优于 DDP、TMP, 与姜黄素抑制作用相当。Transwell 小室实验结果显示, 阳性对照 DDP、TMP 和姜黄素对 A549 细胞侵袭抑制率分别为 40% ($3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、49% ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 62% ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。化合物 **Z8** 对 A549 细胞侵袭抑制率达到 65% ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), **Z10** 对 A549 细胞侵袭抑制率高达 92% ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对细胞的侵袭能力的抑制呈现出效应剂量依赖关系。化合物 **Z10** 和 **Z8** 抑制 A549 细胞侵袭活性优于 TMP ($P < 0.001$), 化合物 **Z8** 在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平浓度对 A549 细胞侵袭抑制作用与姜黄素 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相当, 尤其是化合物 **Z10** 对 A549 细胞侵袭有显著的抑制作用。

Table 2 Spectral data of target compounds

Compd.	¹ H NMR, ¹³ C NMR, ESI-MS
Z1	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.62 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.58–7.55 (m, 3H, Ar-CH= and ArH), 6.96 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, ArH), 3.85 (s, 3H, OCH ₃), 3.37–3.31 (m, 2H, CH ₂), 3.04–2.98 (m, 2H, CH ₂), 2.65 (s, 3H, CH ₃), 2.53 (s, 3H, CH ₃), 2.51 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 195.66, 159.69, 150.04, 148.92, 148.15, 144.67, 142.47, 134.44, 133.22, 131.69, 127.62, 124.55, 113.29, 54.35, 26.25, 25.53, 20.82, 20.78, 20.23; ESI-MS for C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O: <i>m/z</i> 335.25 [M+H] ⁺ .
Z2	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.57 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.50 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Ar-CH=), 7.35 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.26 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.12 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H, ArH), 3.31–3.25 (m, 2H, CH ₂), 3.02–2.96 (m, 2H, CH ₂), 2.58 (s, 3H, CH ₃), 2.46 (s, 3H, CH ₃), 2.44 (s, 3H, CH ₃), 2.32 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.77, 151.17, 150.10, 149.17, 145.53, 143.11, 138.32, 137.57, 135.77, 134.39, 131.64, 130.31, 128.62, 127.90, 125.95, 27.31, 26.64, 21.86, 21.79, 21.46, 21.24; ESI-MS for C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O: <i>m/z</i> 319.26 [M+H] ⁺ .
Z3	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.66 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.63–7.60 (m, 3H, Ar-CH= and ArH), 7.47–7.38 (m, 3H, ArH), 3.40–3.34 (m, 2H, CH ₂), 3.11–3.05 (m, 2H, CH ₂), 2.67 (s, 3H, CH ₃), 2.54 (s, 3H, CH ₃), 2.52 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.87, 151.23, 150.20, 149.22, 145.53, 143.06, 137.79, 135.83, 134.23, 130.85, 129.46, 128.77, 126.16, 27.30, 26.63, 21.91, 21.83, 21.29; ESI-MS for C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O: <i>m/z</i> 305.30 [M+H] ⁺ .
Z4	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.66 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.57 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.52 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Ar-CH=), 7.46 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, ArH), 3.41–3.35 (m, 2H, CH ₂), 3.05–2.99 (m, 2H, CH ₂), 2.67 (s, 3H, CH ₃), 2.55 (s, 3H, CH ₃), 2.53 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.55, 151.21, 150.21, 149.30, 145.45, 142.75, 138.38, 134.69, 132.75, 132.09, 131.99, 126.34, 123.80, 27.24, 26.56, 21.84, 21.81, 21.19; ESI-MS for C ₂₀ H ₁₉ BrN ₂ O: <i>m/z</i> 383.18 [M+H] ⁺ .
Z5	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.56 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.45–7.42 (m, 3H, Ar-CH= and ArH), 7.31 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, ArH), 3.31–3.25 (m, 2H, CH ₂), 2.97–2.91 (m, 2H, CH ₂), 2.57 (s, 3H, CH ₃), 2.45 (s, 3H, CH ₃), 2.43 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.57, 151.28, 150.27, 149.24, 145.41, 142.72, 138.23, 135.38, 134.29, 132.68, 131.89, 129.02, 126.36, 27.24, 26.54, 21.90, 21.81, 21.25; ESI-MS for C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O: <i>m/z</i> 339.28 [M+H] ⁺ .
Z6	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.60–7.57 (m, 2H, Py-CH= and Ar-CH=), 7.53 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H, ArH), 6.71 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H, ArH), 3.40–3.24 (m, 2H, CH ₂), 3.03 (s, 6H, NCH ₃ ×2), 3.01–2.97 (m, 2H, CH ₂), 2.65 (s, 3H, CH ₃), 2.53 (s, 3H, CH ₃), 2.50 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.36, 151.04, 150.88, 149.63, 149.03, 145.97, 144.39, 135.60, 133.00, 132.94, 124.63, 123.79, 111.82, 40.07, 27.33, 26.72, 21.86, 21.82, 21.34; ESI-MS for C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O: <i>m/z</i> 348.25 [M+H] ⁺ .
Z7	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.65 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.51 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Ar-CH=), 6.76 (d, <i>J</i> = 2.3 Hz, 2H, ArH), 6.50 (t, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H, ArH), 3.83 (s, 6H, OCH ₃ ×2), 3.39–3.33 (m, 2H, CH ₂), 3.10–3.04 (m, 2H, CH ₂), 2.66 (s, 3H, CH ₃), 2.54 (s, 3H, CH ₃), 2.52 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.80, 160.79, 151.26, 150.23, 149.22, 145.48, 142.98, 138.21, 137.57, 134.23, 126.22, 108.74, 101.79, 55.41, 27.29, 26.65, 21.92, 21.81, 21.29; ESI-MS for C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃ : <i>m/z</i> 365.21 [M+H] ⁺ .
Z8	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.66 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Py-CH=), 7.53 (t, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H, Ar-CH=), 6.87 (s, 2H, ArH), 3.92 (s, 6H, OCH ₃ ×2), 3.91 (s, 3H, OCH ₃), 3.43–3.37 (m, 2H, CH ₂), 3.13–3.07 (m, 2H, CH ₂), 2.67 (s, 3H, CH ₃), 2.54 (s, 3H, CH ₃), 2.53 (s, 3H, CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 196.61, 153.23, 151.25, 150.21, 149.19, 145.51, 143.03, 139.56, 136.88, 134.47, 131.38, 126.07, 108.17, 61.00, 56.22, 56.13, 27.31, 26.56, 21.92, 21.80, 21.29; ESI-MS for C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄ : <i>m/z</i> 395.20 [M+H] ⁺ .
Z9	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.67 (s, 2H, =CH×2), 3.33 (s, 4H, CH ₂ ×2), 2.67 (s, 6H, CH ₃ ×2), 2.54 (s, 6H, CH ₃ ×2), 2.52 (s, 6H, CH ₃ ×2); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 197.37, 151.29, 150.23, 149.22, 145.52, 143.52, 126.46, 27.39, 21.90, 21.78, 21.28; ESI-MS for C ₂₁ H ₂₄ N ₄ O: <i>m/z</i> 349.23 [M+H] ⁺ .
Z10	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ: 7.76 (s, 2H, =CH×2), 3.16–3.11 (m, 4H, CH ₂ ×2), 2.57 (s, 6H, CH ₃ ×2), 2.51 (s, 6H, CH ₃ ×2), 2.50 (s, 6H, CH ₃ ×2), 1.81–1.72 (m, 2H, CH ₂); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ: 190.75, 150.63, 150.02, 148.66, 145.84, 141.12, 130.06, 28.37, 22.25, 21.83, 21.69, 21.38; ESI-MS for C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O: <i>m/z</i> 363.23 [M+H] ⁺ .

Table 3 The inhibitory activities of compounds anti-proliferation induced by A549, A549/DDP and HBE. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. The anti-proliferative activities of compounds against all the tested cell lines were determined using the MTT assay, cisplatin (DDP) was taken as the positive control. The results were expressed as the IC₅₀. ND: Not determined

Compd.	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹		
	A549	A549/DDP	HBE
Z1	79 ± 4.3	47 ± 3.6	>200
Z2	>200	>200	>200
Z3	>400	>400	ND
Z4	>400	>400	ND
Z5	>300	>300	ND
Z6	>300	>300	ND
Z7	>300	>300	ND
Z8	41 ± 2.5	35 ± 1.1	>200
Z9	116 ± 6.4	81 ± 3.2	>200
Z10	17 ± 1.5	22 ± 1.4	69 ± 3.3
DDP	15 ± 2.9	88 ± 6.9	22 ± 3.6

2.3 蛋白质印迹 (Western blotting) 为了进一步确定目标化合物对 A549 细胞迁移和侵袭能力影响的机制。A549 细胞分别用不同浓度的化合物 **Z8** 和 **Z10** 作用 48 h 后, Western blotting 结果显示 (图 5), MMP-2 和 MMP-9 的浓度水平呈降低的趋势。这些发现表明, 化合物 **Z10** 和 **Z8** 可能通过下调 MMP-2 和 MMP-9 的浓度水平来抑制 A549 细胞的迁移和侵袭。

2.4 细胞周期 选用不同浓度梯度的待测物与 A549 细胞作用 24 h, 采用流式细胞仪分析目标化合物 **Z8** 和 **Z10** 对细胞周期进展的影响, 结果如图 6 所示, A549 细胞与 **Z10** 处理 48 h 后, G2/M 期细胞百分比从 11.34% 增加至 18.12% (5 μmol·L⁻¹)、31.78% (10 μmol·L⁻¹) 和 63.42% (20 μmol·L⁻¹)。与 **Z8** 处理 48 h 后, G2/M 期细胞百分比从 14.79% 增加至 31.30% (5 μmol·L⁻¹)、50.12% (10 μmol·L⁻¹) 和 62.53% (20 μmol·L⁻¹)。结果显示, 与待测物作用的 A549 细胞株

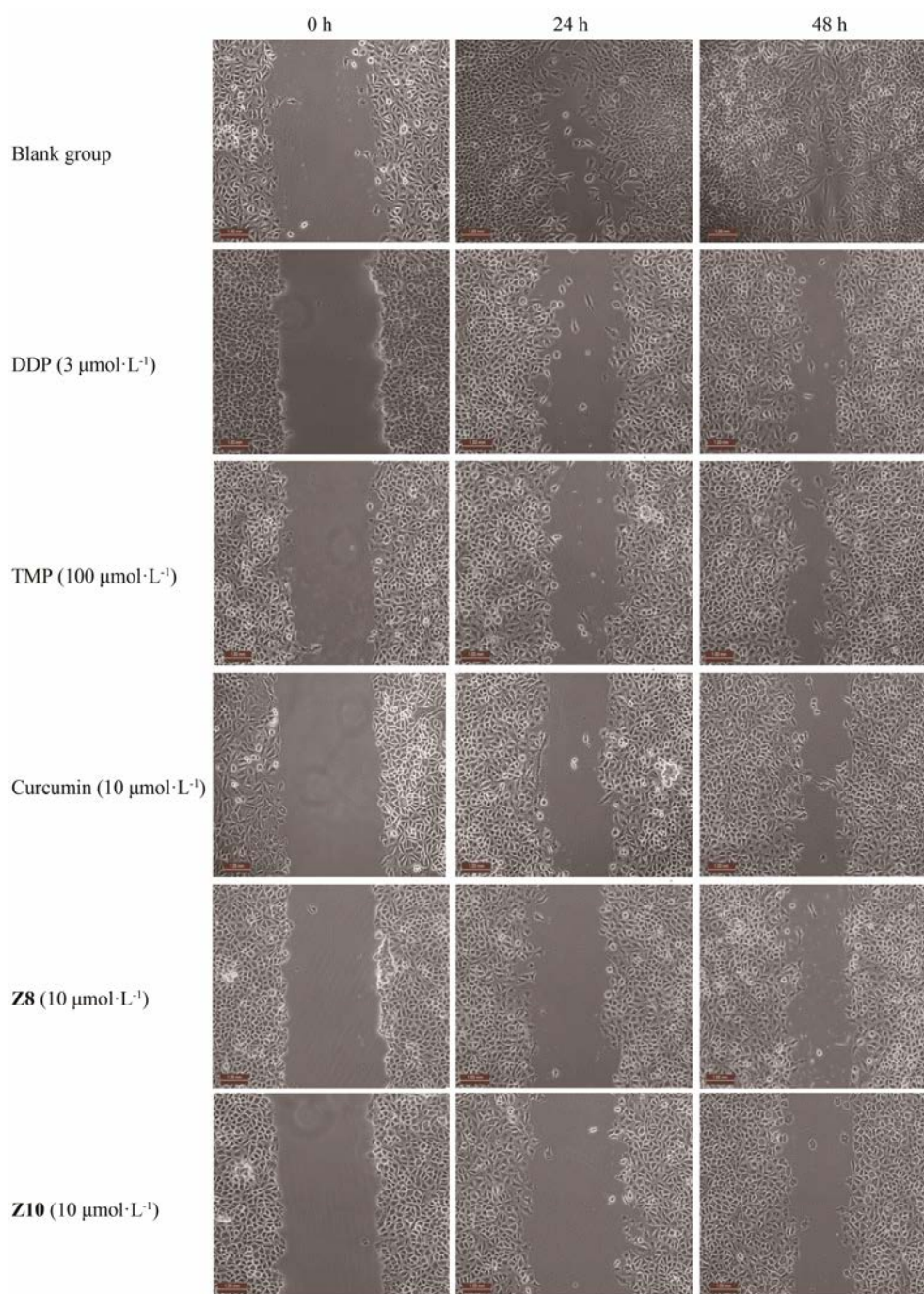


Figure 3 Anti-migration effect of compounds on A549 cells *via* scratch assay. Representative images of A549 cells were treated with vehicle, $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPP, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TMP, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z8, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Z10 for 24 h and 48 h, respectively

导致其在 G2/M 期的剂量依赖性蓄积，并且在处理 48 h 后 G0/G1 期的细胞伴随减少。这些结果表明，化合物 Z8 和 Z10 主要通过 G2/M 期的细胞周期阻滞而不是凋亡来抑制 A549 细胞增殖。

小结

MTT 实验结果表明化合物 Z10 和 Z8 具有一定的抗增殖活性。进一步通过划痕实验和 Transwell 小

室实验考察其抗迁移和抗侵袭效应，结果表明化合物 Z10 和 Z8 对 A549 细胞的迁移和侵袭有显著的抑制作用。而 Western blotting 实验表明，化合物 Z10 和 Z8 可能通过下调 MMP-2 和 MMP-9 的浓度水平来抑制 A549 细胞的迁移和侵袭。细胞周期结果显示化合物 Z8 和 Z10 主要通过 G2/M 期的细胞周期阻滞而不是凋亡来抑制 A549 细胞增殖。本研究结果对进一步优化设计川芎嗪类衍生物作为抗癌剂的研究具

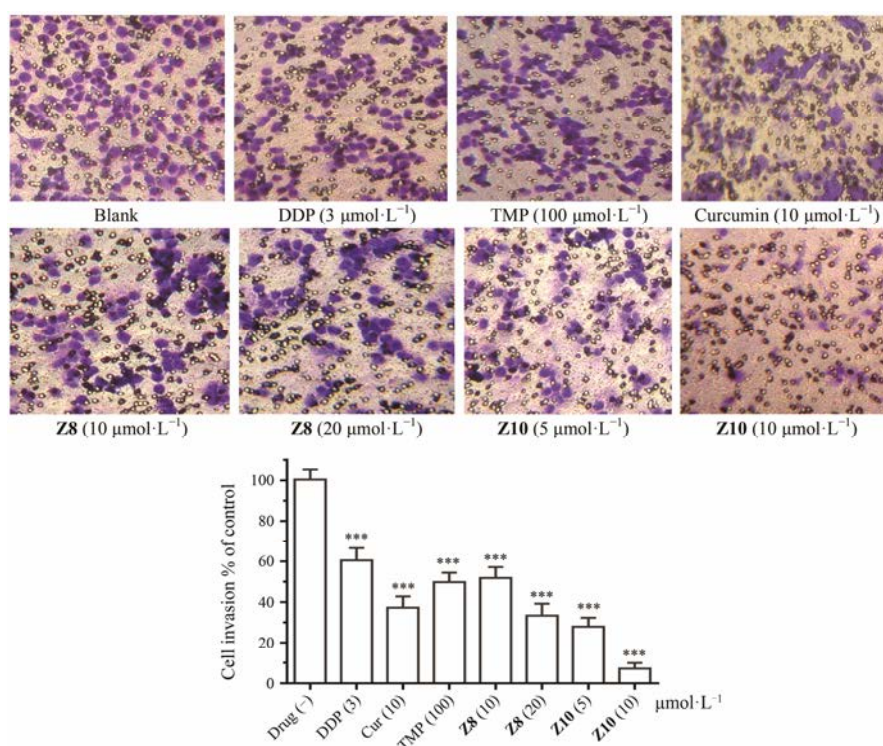


Figure 4 Anti-invasion effect of compound **Z8** (concentration of 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and **Z10** (concentration of 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on A549 cells *via* transwell invasion assay. DPP, TMP and Cur (curcumin) were used as positive control. *** $P < 0.001$ vs drug (-)

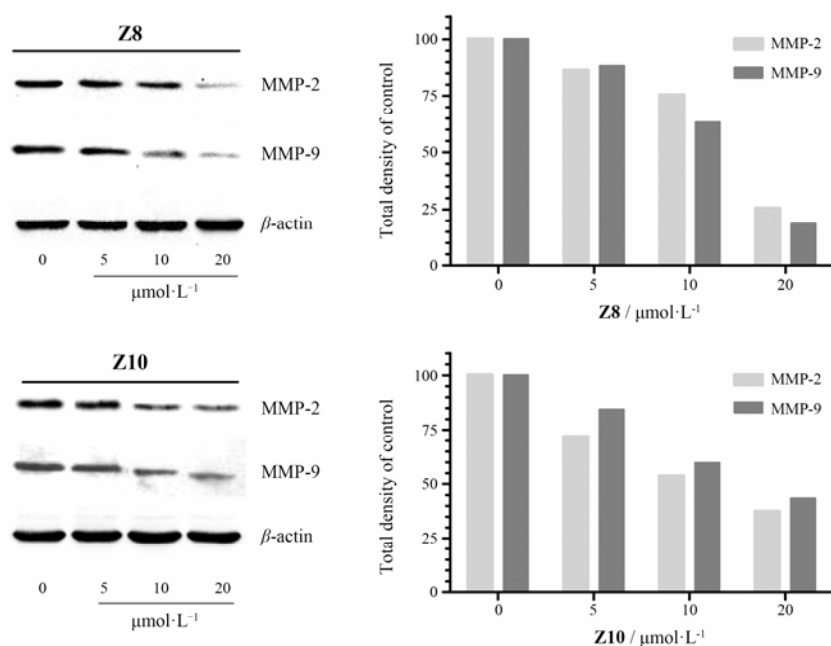


Figure 5 Analysis of expression of MMP-2 and MMP-9 in A549 cells exposed to 0, 5, 10 or 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ **Z8** and **Z10** for 48 h by Western blotting

有一定的指导意义。

实验部分

LCQ ADVANTAGE MAX 液质连用质谱仪 (Finnig 公司); Bruker 300 MHz 超导核磁共振仪 (CDCl_3 为溶

剂, TMS 为内标); WRS-1B 数字熔点仪 1 台 (上海精密科学仪器有限公司, 温度未校正); 苯甲醛等原料购于国药集团试剂有限公司; 其他试剂均为市售分析纯; 柱色谱所用硅胶均为烟台德信生物科技有限公司产品。

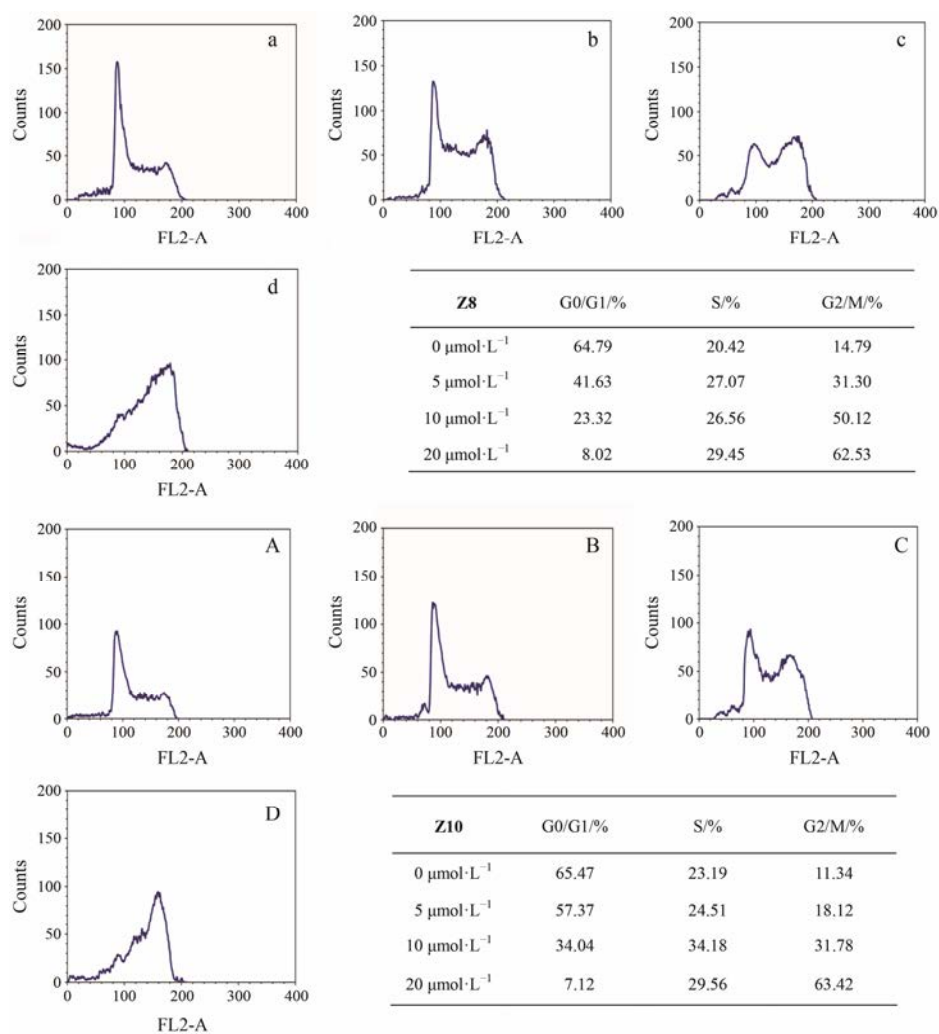


Figure 6 Cell cycle analysis of A549 cell treated with compound **Z8** and **Z10** at concentrations of 0, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h, showing enhanced dose-dependent G2/M arrest with treatment of **Z8** and **Z10**. All experiments were performed in triplicate. a, A: 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; b, B: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; c, C: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; d, D: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

1 化合物的合成^[18-20]

1.1 川芎嗪单氮氧化物的合成 (2) 在 250 mL 三颈烧瓶中依次加入川芎嗪 (15.0 g, 0.1 mol)、30% H_2O_2 溶液 (24 mL, 0.2 mol) 和冰醋酸 15 mL, 94 $^\circ\text{C}$ 反应 12 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯 1:1) 检测反应基本完全后, 冷却后, 用 50% NaOH 溶液调节 pH 10, 二氯甲烷萃取 (3 \times 30 mL), 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩, 得川芎嗪单氮氧化物白色晶体 13.2 g, 收率 78.8%, mp 82.4~84.1 $^\circ\text{C}$ 。

1.2 (3,5,6-三甲基吡嗪-2-基) 乙酸甲酯的合成 (3) 在 250 mL 三颈烧瓶中依次加入川芎嗪单氮氧化物 (13.2 g, 86.8 mmol)、乙酸酐 (31.2 mL, 330.4 mmol), 130 $^\circ\text{C}$ 反应 5 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯 1:1) 检测反应基本完全后, 蒸除过量乙酸酐, 得黑色浆状物 (3,5,6-三甲基吡嗪-2-基) 乙酸甲酯。

1.3 2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪的合成 (4) 往上步

反应得到的 (3,5,6-三甲基吡嗪-2-基) 乙酸甲酯中加入 20% NaOH 溶液 80 mL, 室温反应 12 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯 1:1) 检测反应基本完全, 过滤, 滤液用二氯甲烷萃取 (3 \times 50 mL), 合并有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 石油醚重结晶, 得淡黄色针状结晶, 即为 2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪纯品 9.7 g, 收率 57.8%, mp 75.3~77.2 $^\circ\text{C}$ 。

1.4 3,5,6-三甲基吡嗪-2-甲醛的合成 (5) 在 250 mL 三颈烧瓶中依次加入 2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪 (9.5 g, 62.5 mmol)、 MnO_2 (16.2 g, 187.5 mmol) 和无水乙醇 100 mL, 回流 12 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯 2:1) 检测反应基本完全, 冷却, 过滤, 减压回收乙醇, 得黄色固体, 经硅胶柱色谱 (石油醚-乙酸乙酯 4:1) 纯化, 得淡黄色固体 8.8 g, 收率 93.9%, mp 84.7~86.5 $^\circ\text{C}$ 。

1.5 (2E,5E)-2-(4-甲氧基苯亚甲基)-5-[(3,5,6-三甲基

吡嗪-2-基]亚甲基]环戊酮的合成 (Z1) 在 250 mL 三颈烧瓶中依次加入环戊酮 (10 mL, 0.115 mol)、吗啉 (10 mL, 0.114 mol) 和苯 100 mL, 连接油水分离器, 在 110 °C 下反应至无水生成为止。冷却至室温, 加入对甲氧基苯甲醛 (13 mL, 0.115 mol), 升温至 110 °C, 回流 8 h。TLC (石油醚-乙酸乙酯 1:1) 检测反应完全, 逐滴滴加 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 50 mL, 常温下搅拌 1 h, 再逐滴加入 10% Na_2CO_3 溶液 115 mL, 常温下搅拌 30 min, 将溶液倒入分液漏斗中, 静置分层, 收集有机层并用无水硫酸钠干燥, 浓缩。用 40 mL 无水乙醇溶解, 加入 1.5 g 川芎醛 (0.01 mol), 冰浴条件下缓慢滴加 10% NaOH 乙醇溶液 5 mL, 反应约 1 h, TLC (石油醚-乙酸乙酯 2:1) 检测反应基本完全, 滤出沉淀, 沉淀用无水乙醇洗涤, 经硅胶柱色谱 (二氯甲烷-乙酸乙酯 2:1) 纯化得 **Z1** 黄色晶体 2.01 g, 收率为 61.2%, mp 160.2~161.7 °C。

类似方法合成目标化合物 **Z2~Z10**。

2 目标化合物生物活性的评价

2.1 细胞培养 将 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 37 °C、5% CO_2 和 95% 空气的培养箱中培养并传代。A549/DDP 细胞除上述培养条件外, 还需加入 $0.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DDP 维持培养, 以维持细胞的耐药性。

2.2 目标化合物对 A549、A549/DDP 和 HBE 细胞增殖的影响 取对数生长期的各株细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板内, 每组 6 个复孔, 培养 24 h 后备用。实验组以倍比稀释的方法由低到高分别加入不同浓度的待测化合物, 终质量浓度分别为 0.079、0.158、0.315、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阴性对照组只加培养基, 不加药物, 并以顺铂 ($3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作为阳性对照药。药物作用 48 h 后, 加入 MTT 溶液 ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL , 继续培养 4 h, 弃去各孔内液体, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 置震荡器上震荡 5 min, 测定 A570 并求出各组细胞的 IC_{50} , 抑制率=(对照组 OD 值-药物组 OD 值)/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

2.3 目标化合物对 A549 细胞迁移能力的影响 (划痕实验) 取对数生长期的 A549 细胞以每孔 5×10^4 个接种于 24 孔板中, 待细胞生长至 90% 面积时备用。DDP 对 A549 细胞的 IC_{50} 约 $3.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 当其剂量为 $0.8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (约 $3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时细胞生长抑制率为 16.5% (48 h 后), 属于相对低毒剂量, 故选用 DDP 为 $0.8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为抑制细胞迁移的阳性对照; 将 **Z10** 的低毒剂量 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($10\% < \text{细胞抑制率} < 20\%$)

用于检测待测化合物对细胞迁移的抑制作用; 空白对照组不加顺铂或待测化合物; 用 200 μL 规格的 Tip 头进行划痕, 要求划痕直且宽度一致; 在划痕及加待测药物后 24、48 h, 分别用 TS100-F DH1 倒置光学显微镜拍照记录。

2.4 目标化合物对 A549 细胞侵袭能力的影响 (transwell 小室法) 基质胶用冷过滤蒸馏水稀释至规定浓度, 加到 transwell 小室中, 制备细胞悬液备用。用无血清培养基轻洗凝胶, 用 PBS 漂洗 3 次。在小室内加入 1×10^5 个细胞, 用含有不同浓度的待测化合物 **Z8** 及 **Z10** 共同孵育 (一般选择中低毒浓度, 本实验选择的浓度在 IC_{20} 附近)。小室下层加入 500 μL 含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGF (表皮生长因子) 的培养液, 37 °C 条件下孵育 24 h。孵育结束时, 在膜的上表面层细胞仔细用湿棉签轻轻擦去 Matrigel 凝胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞, 并做好标记, 用冰预冷的甲醛固定 30 min。侵入基底膜下表面的细胞用甲醇固定和 0.5% 结晶紫染色 30 min。细胞面朝下, 置于载玻片上, 摄像, 在倒置显微镜下计数移至微孔膜下层的穿膜细胞数。每个样本计数 5~10 个视野, 求出每个视野平均穿膜细胞数。(倍数: 200 \times)。

2.5 Western blotting 实验 将 A549 细胞接种在 6 cm 培养皿中。当其在孔区域中生长至 80% 时, 细胞分别用 **Z8** 和 **Z10** (0 、 5 、 10 、 $20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理。弃培养液, PBS 润洗两次, 胰酶 (不加 EDTA) 消化收集, 加细胞裂解液 200 μL , 混匀后于冰浴中放置 30 min, 通过离心 ($14\,000\times g$, 4 °C, 10 min) 得到蛋白提取液。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度。对于蛋白质印迹分析, 在 SDS-PAGE 凝胶上分离等量的蛋白质并转移到硝酸纤维素 NC 膜。将印迹在封闭缓冲液 (TBST 中的 5% 脱脂奶粉) 中在室温下封闭 1 h, 然后与兔抗人 MMP-2 和 MMP-9 的抗体的稀溶液, 兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 的抗体在封闭缓冲液中 4 °C 过夜。然后将印迹与合适的第二抗体温育, 使用 β -actin 作为上样对照。使用化学发光成像系统显现蛋白条带。以 Image J 软件采集数据, 计算灰度值。

2.6 细胞周期 通过碘化丙啶 (PI) 染色进行细胞周期分析。将 A549 细胞接种在培养皿中并用不同剂量的化合物 **Z10** 和 **Z8** 处理 24 h 时, 随后进行 PBS 洗涤。用冷的 70% 乙醇在 4 °C 固定至少 12 h 后, 然后将细胞在 PBS 中洗涤 1 次, 并在含有 RNA 酶和 PI 的 PBS 中在黑暗中悬浮 30 min。然后通过流式细胞仪 (BD Facsverse) 分析细胞。

References

- [1] Nilay S, Yibin K. Unravelling the complexity of metastasis – molecular understanding and targeted therapies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 735–748.
- [2] Chen KM, Wei H, Ling SR, et al. Expression and significance of transforming growth factor- β 1 in epithelial ovarian cancer and its extracellular matrix [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8: 2171–2174.
- [3] Duarte S, Baber J, Fujii T, et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44: 147–156.
- [4] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141: 52–67.
- [5] Sani IK, Marashi SH, Kalalinia F. Solamargine inhibits migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of matrix metalloproteinases 2 and 9 expression and activity [J]. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29: 893–900.
- [6] Chai SH, Seow HY, Neoh HP, et al. MicroRNAs associated with tumour migration, invasion and angiogenic properties in A549 and SK-Lu1 human lung adenocarcinoma cells [J]. *Lung Cancer*, 2014, 83: 154–162.
- [7] Shi QQ, Li J, Feng ZQ, et al. Effect of ginsenoside Rh2 on the migratory ability of HepG2 liver carcinoma cells: recruiting histone deacetylase and inhibiting activator protein 1 transcription factors [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10: 1779–1785.
- [8] Kulrut B, Prasit P, Tony B, et al. High threshold of β 1 integrin inhibition required to block collagen I-induced membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) activation of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) [J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14: 99.
- [9] Guo SK, Chen KJ, Qian ZH, et al. Tetramethylpyrazine in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Planta Med*, 1983, 47: 89.
- [10] Yu KM, Chen Z, Pan XK, et al. Tetramethylpyrazine-mediated suppression of C6 gliomas involves inhibition of chemokine receptor CXCR4 expression [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28: 955–960.
- [11] Cao J, Miao Q, Miao S, et al. Tetramethylpyrazine (TMP) exerts antitumor effects by inducing apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 26: 212–220.
- [12] Zheng CY, Xiao W, Zhu MX, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by tetramethylpyrazine and its effects on A549 cell invasion and metastasis [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40: 2029–2037.
- [13] Ajaikumar BK, Preetha A, Bharat BA. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269: 199–225.
- [14] Guan F, Ding YM, Zhang YM, et al. Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through autophagy-dependent Akt degradation [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0146553.
- [15] Ai Y, Zhu B, Ren CP, et al. Discovery of new monocarbonyl ligustrazine – curcumin hybrids for intervention of drug-sensitive and drug-resistant lung cancer [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 1747–1760.
- [16] Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, et al. The essential medicinal chemistry of curcumin [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1620–1637.
- [17] Potter E, Jha M, Bhullar KS, et al. Investigation of fatty acid conjugates of 3,5-bisarylmethylene-4-piperidone derivatives as antitumor agents and human topoisomerase-IIa inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 411–421.
- [18] Deng LJ, Guo XL, Li Z, et al. Ligustrazine derivatives. Part 4: design, synthesis, and biological evaluation of novel ligustrazine-based stilbene derivatives as potential cardiovascular agents [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 79: 731–739.
- [19] Xu YY, Cao Y, Ma HK, et al. Design, synthesis and molecular docking of α,β -unsaturated cyclohexanone analogous of curcumin as potent EGFR inhibitors with antiproliferative activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 388–394.
- [20] Liu D, Yu WS, Li JJ, et al. Novel 2-(*E*)-substituted benzylidene-6-(*N*-substituted aminomethyl)cyclohexanones and cyclohexanols as analgesic and anti-inflammatory agents [J]. *Med Chem Res*, 2013, 22: 3779–3786.