脱氢弯孢霉素肉桂酰类ACLY抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究

王 程[1#], 陈贤飞[1#], 周向锋[1], 常 煦[2], 邓张双[1,2*], 梁坚家[1,2*]

(1. 三峡大学生物与制药学院, 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002; 2. 安琪酵母股份有限公司, 湖北省酵母功能重点实验室, 湖北 宜昌 443003)

摘要: ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, ACLY) 作为肿瘤细胞能量代谢的关键桥梁, 与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。抑制或敲除ACLY已被证实可有效抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡。本研究设计合成了18个脱氢弯孢霉菌素类ACLY抑制剂, 采用生物学评价和分子动力学模拟的方法, 系统探讨了衍生物的构效关系。化合物**4e**对三阴乳腺癌及胰腺癌细胞均显示出优异的抗增殖活性, IC_{50}值分别为0.4和1.1 μmol·L^{-1}, 为该类大环内酯衍生物的结构修饰与构效关系研究提供了重要依据。

关键词: ATP-柠檬酸裂解酶; 结构改造; 抗肿瘤活性; 分子动力学模拟; 构效关系

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)07-2577-09

Design and synthesis of dehydrocurvularin cinnamy-based ACLY inhibitors for cancer treatment

WANG Cheng[1#], CHEN Xian-fei[1#], ZHOU Xiang-feng[1], CHANG Xu[2], DENG Zhang-shuang[1,2*], LIANG Jian-jia[1,2*]

(*1. Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China; 2. Hubei Key Laboratory of Yeast Function, Angel Yeast Co. Ltd., Yichang 443003, China*)

Abstract: ATP-citrate lyase (ACLY), serving as a critical energy metabolism bridge in tumor cells, is closely implicated in the development of various malignancies. Inhibition or knockout of ACLY has been reported to effectively suppress tumor cell proliferation and induce apoptosis. In this work, we have designed and synthesized 18 dehydrocurvularin cinnamy ACLY inhibitors. Through biological evaluation and molecular dynamics simulations, we systematically explored the structure-activity relationships (SAR) of these derivatives. Compound **4e** exhibited potent anti-proliferative activity against MDA-MB-231 and PANC-1 cells with a IC_{50} value of 0.4 and 1.1 μmol·L^{-1}, providing crucial insights for structural modification and SAR studies of this class of macrolide derivatives.

Key words: ATP-citrate lyase; structure modification; antitumour; molecular dynamics simulation; structure activity relationship

肿瘤的免疫逃逸与其独特的代谢重编程密切相关, 肿瘤细胞通过增强糖酵解与脂肪合成以支持快速增殖并重塑免疫抑制性微环境[1-3]。ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, ACLY) 是连接葡萄糖代谢、脂质合成及表观遗传调控的关键枢纽, 在多种肿瘤中显著高表达, 使ACLY成为热门的免疫抗癌靶点[4-8], 如2023年, Xiang等[9]研究发现, 抑制肿瘤细胞ACLY活性能够激活cGAS-STING信号通路, 进而增强癌症免疫治疗的疗效, 揭示了ACLY在肿瘤免疫逃逸中的关键作

收稿日期: 2025-12-04; 修回日期: 2026-01-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304312); 湖北省自然科学基金联合基金 (2024AFD135); 湖北省教育厅科学技术研究计划重点项目 (D20241205).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: dzs163@163.com; liangjj@ctgu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1454

用; 2025 年, Gautam 等[10]研究发现抑制或敲除 ACLY 能够提高肿瘤中 CXCL13 的表达水平并增加浆细胞样 B 细胞的数量, 从而增强免疫监视功能并抑制肿瘤进展。然而目前报道的 ACLY 抑制剂较少, 仅贝派地酸被 FDA 批准上市, 且大部分抑制剂易引发乙酰辅酶 A 合成酶 2、丙酮酸脱氢酶等代偿通路的激活, 导致耐药[11-13]。因此, 临床亟需开发新型安全有效的 ACLY 抑制剂; 天然产物因其结构多样性与良好生物相容性, 是开发新型 ACLY 抑制剂的重要源泉。

脱氢弯孢霉菌素 (dehydrocurvularin, DCV) 是一种天然来源的间苯二酚聚酮类化合物, 主要由弯孢霉属 (*Curvularia*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 真菌产生, 具有广谱的抗炎、抗菌和抗肿瘤活性[14]。课题组前期通过筛选获得一株 DCV 高产菌株曲霉 *Aspergillus* sp. WG4, 并实现了 DCV 克级的规模制备 (产率达 30%)。进一步利用化学蛋白质组学和生物学敲除技术, 对 DCV 的抗肿瘤作用靶点进行了研究, 确证其作用靶点为 ACLY, 酶抑制活性为 0.93 μmol·L^{-1}, 有望成为靶向 ACLY 的潜在抗肿瘤药物[15,16]。目前文献对 DCV 的研究主要集中于天然来源、生物活性和代谢稳定性等方面, 而有关其结构优化的报道相对较少[17]。通过分子对接发现 DCV 与 ACLY 结构口袋具有较强的氢键作用, 但其苯环 5 位羟基旁边仍有较大空间未被占据 (图 1, 黄色虚线)。基于此, 本研究将疏水芳烃和脂肪烃引入 DCV 骨架设计系列 ACLY 抑制剂, 进一步通过药理学评价和分子动力学模拟研究阐明衍生物的构效关系, 期望获得具有强效、安全的抗肿瘤候选化合物。

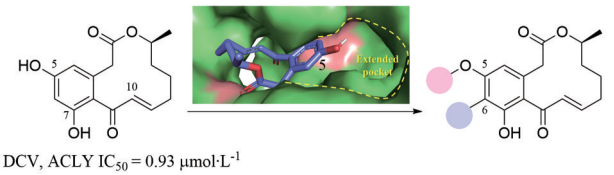


Figure 1 The design strategies for DCV derivatives targeting ACLY. Yellow: Extended pocket; DCV: Dehydrocurvularin; ACLY: ATP-citrate lyase

结果与讨论

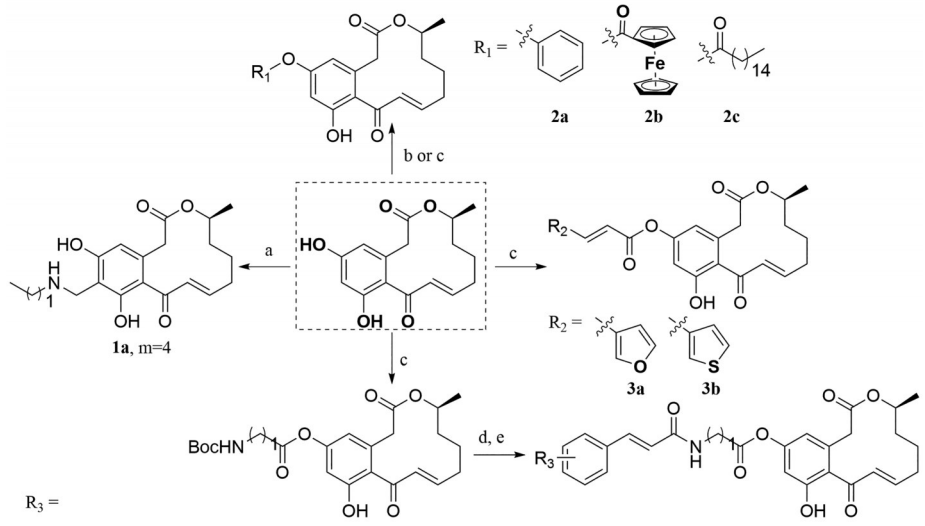
1 化合物的合成

以课题组前期从真菌 *Aspergillus* sp. WG4 发酵得到的 DCV 为起始原料, 通过曼尼希反应得到化合物 **1a**, 利用苄溴和羧酸的醚化和酯化反应得到化合物 **2a**～**2c**、**3a**～**3c** 和 **4a**～**4j**, 最后引入不同侧链, 利用脱保护和 HATU 催化的酰化反应得到化合物 **4k**～**4l**; 所有化合物如合成路线 1 所示得到。

2 化合物抗肿瘤活性研究

为了评价目标化合物的抗肿瘤活性, 选取代谢活性高的三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和胰腺癌 PANC-1 细胞为筛选模型, 以天然来源母核化合物 DCV 为母核对照, ACLY 抑制剂 BMS-303141 为阳性对照; 采用 CCK-8 法对上述合成的 DCV 衍生物进行肿瘤体外抗增殖活性评价, 得到化合物的 IC_{50}, 所有结果重复 3 次, 结果如表 1 所示。

根据所合成衍生物对肿瘤细胞的抗增殖活性, 初步建立了 DCV 衍生物的构效关系。结果显示, DCV 对 MDA-MB-231 和 PANC-1 细胞表现出中等强度的抗



Scheme 1 Synthesis of targeted compounds; regents and condition: a. Amylamine, CH_3OH, formaldehyde (37%), 40 ℃; b. Cs_2CO_3, CH_3CN, rt; c. EDCI, DMAP, corresponding acid, CH_2Cl_2, 0 ℃ to rt; d. TFA, CH_2Cl_2, 0 ℃; e. HATU, DIPEA, DMF, corresponding acid, rt

Table 1　Antiproliferation activity of targeted compounds to cancer cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

No.	Compound	IC_{50}/μmol·L^{-1}		No.	Compound	IC_{50}/μmol·L^{-1}	
		MDA-MB-231	PANC-1			MDA-MB-231	PANC-1
1	DCV	5.3 ± 0.9	3.4 ± 0.5	11	**4c**	2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.2
2	BMS-303141	7.2 ± 1.6	8.7 ± 2.3	12	**4d**	1.4 ± 0.6	1.9 ± 0.7
3	**1a**	4.5 ± 0.7	5.1 ± 0.3	13	**4e**	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1
4	**2a**	6.1 ± 0.4	7.9 ± 1.2	14	**4f**	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2
5	**2b**	7.6 ± 0.8	6.4 ± 1.1	15	**4g**	1.9 ± 0.4	2.3 ± 0.6
6	**2c**	3.3 ± 0.5	4.1 ± 0.7	16	**4h**	2.5 ± 0.7	2.9 ± 0.8
7	**3a**	5.8 ± 1.1	4.9 ± 1.6	17	**4i**	5.9 ± 1.5	5.6 ± 0.5
8	**3b**	4.3 ± 0.9	3.7 ± 0.4	18	**4j**	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.2
9	**4a**	2.5 ± 0.7	2.9 ± 0.1	19	**4k**	4.7 ± 0.9	1.4 ± 0.1
10	**4b**	3.1 ± 0.9	3.7 ± 0.2	20	**4l**	3.3 ± 0.8	3.9 ± 0.4

肿瘤活性, 其IC_{50}值均处于亚微摩尔水平; 母核C6位引入曼尼希碱衍生物对活性影响较小 (化合物**1a**); C5位醚化衍生物**2a**的抗肿瘤活性有所下降; 引入体积较大的二茂铁 (**2b**) 或长链基团 (**2c**) 均不利于抗肿瘤活性的提升; DCV骨架C5位引入肉桂酰片段对衍生物的抗肿瘤活性具有显著影响。其中, 肉桂酰苯环取代基 (**4a**～**4l**) 普遍优于肉桂酰杂环取代基 (**3a**、**3b**)。在苯环取代基中, 卤素取代对DCV抗肿瘤活性提升较小, 如**4b**、**4c**和**4h**; 相比之下, 甲基取代可显著提升衍生物抗肿瘤活性, 如化合物**4d**～**4g**肉桂酰甲基取代对活性提升较大; 其中, 苯环2位甲基取代的衍生物**4e**显示出最优的抗肿瘤活性, 对所选两种肿瘤细胞抗增殖活性的IC_{50}值为0.4和1.1 μmol·L^{-1}, 在MDA-MB-231细胞上相较DCV (IC_{50}值为5.3 μmol·L^{-1}) 提高了13倍, 而将2-甲基换成2-甲氧基时 (化合物**4i**), 活性显著下降, 表明苯环2位取代的活性并非受给电子效应的影响; 其次, 引入侧链使肉桂酰片段与DCV母核分离后, 体外抗肿瘤活性受到显著影响, 相较于无侧链化合物, 活性明显下降 (如化合物**4e**与**4k**的对比)。该结果与图1的设计思路相符, 进一步表明取代基的类型及中间链的长度对衍生物与ACLY的相互作用具有关键影响。鉴于化合物**4e**具有显著的抗肿瘤活性, 优于母核结构DCV, 值得进一步深入研究。

3　化合物4e对MDA-MB-231细胞钙离子的影响

钙离子是线粒体和内质网联系的典型信号分子, 肿瘤细胞钙离子浓度与内质网应激诱导的细胞凋亡密切相关, 当Ca^{2+}在细胞内外传递时, 肿瘤细胞会不间断地产生ROS; Zheng等[18]发现ACLY抑制BMS-303141可以通过p-eIF2α/ATF4/CHOP轴激发肝癌细胞内质网应激从而诱导细胞凋亡; 为探究最佳化合物**4e**对肿瘤细胞增殖的抑制作用机制, 本研究采用Fluo-4/AM染料检测了MDA-MB-231细胞中Ca^{2+}浓度的变化情况; 结果如图2所示, 不同浓度化合物**4e**给药24 h后, **4e**可以呈浓度依赖的方式上调MDA-MB-231细胞钙离子浓度, 当给药浓度为2 μmol·L^{-1}, Ca^{2+}浓度上调51.7%, 与空白对照组相比显著上调。上述结果表明化合物**4e**可以通过影响肿瘤细胞钙离子稳态发挥抗肿瘤细胞增殖活性。

4　化合物4e与ACLY的分子对接研究

为探究化合物**4e**与ACLY的可能结合模式, 采用AutoDock Vina软件对化合物进行了分子对接研究。如图3所示, 化合物**4e**可以嵌入ACLY的催化活性口袋 (docking score = −7.69), 且骨架中DCV的1位羰基和肉桂酰的羰基分别与ACLY的Lys58和Arg66蛋白残基形成稳定的氢键相互作用 (图3A, 红色区域); 此外, 化合物**4e**的大环内酯部分与ACLY疏水口袋内部

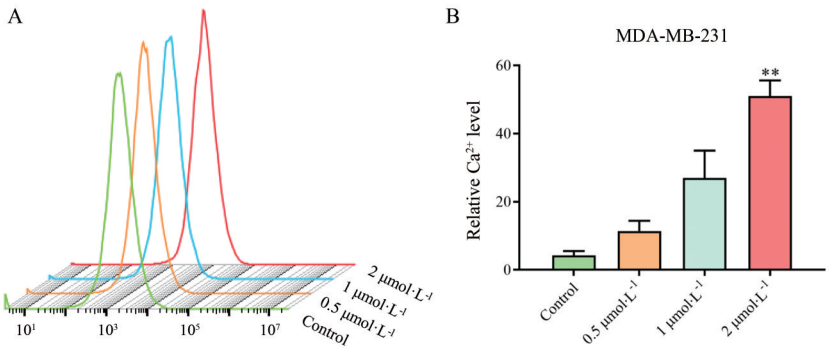


Figure 2　Effects of **4e** on Ca^{2+} in MDA-MB-231 cell lines. A: Compound **4e** elevated intracellular Ca^{2+} levels in MDA-MB-231 cells; B: Histograms display the percentage of Ca^{2+} level. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control

产生相互作用, 而肉桂酰片段的甲基占据了ACLY的疏水通道 (图3A, 黄色区域), 起到了“魔法甲基”的效果。上述分子对接结果与化合物**4e**的抗肿瘤活性具有一致性, 表明在DCV骨架中引入适宜的疏水结构有助于提高其与ACLY的结合能力从而增强其抗肿瘤活性。

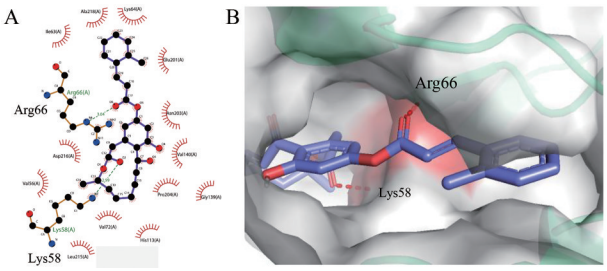


Figure 3 2D and 3D models of the interaction between **4e** and ACLY protein (PDB: 6O0H). A: The 2D ligand interaction; B: The predicted binding mode of compound **4e** in the active site of ACLY

5 化合物4e与ACLY复合物的分子动力学研究

为进一步验证化合物**4e**与ACLY分子对接结果的可靠性, 采用GROMACS软件对二者形成的对接复合物进行了时长为50 ns的分子动力学模拟研究, 并进行自由能景观图的分析。结果如图4A所示, 小分子−蛋白复合物体系在4 ns的MD动力学模拟后, 基本达到平衡稳定; 而体系RMSD波动越小, 表明化合物**4e**与ACLY结合越紧密; 复合物氢键分析结果表明, 化合物**4e**与ACLY之间形成的氢键作用较为稳定 (图4B, 蓝色)。自由能形貌图可用于表征复合物在模拟过程中自由能的变化情况。如图4C、D所示, 在50 ns的分子动力学模拟中, 化合物**4e**与ACLY形成的复合物表现出较高的构象稳定性, 且小分子的运动对蛋白质整体结构的影响较小。

6 结论

本文基于片段的药物设计策略, 在天然产物DCV的C5和C6位通过醚化、酯化和曼尼希缩合等反应下设计合成了18个DCV衍生物, 经检索所有化合物均为首次报道的新化合物。初步构效关系分析显示, DCV分子C5位进行醚化修饰或引入大体积取代基, 以及C6位发生缩合反应, 均会削弱DCV骨架的抗肿瘤活性; 而引入具有疏水特性的肉桂酰骨架, 则有助于增强其抗肿瘤活性, 其中2-甲基取代的肉桂酰衍生物**4e**活性最佳 (IC_{50}值为0.4和1.1 μmol·L^{-1}), 显著优于母核化合物DCV。作用机制研究表明化合物**4e**可以升高MDA-MB-231细胞内钙离子水平, 从而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。进一步通过分子对接和分子动力学模拟研究, 发现化合物**4e**与ACLY具有良好的相互结合作用。以上结果表明化合物**4e**具备深入研究的潜力, 为开发新型ACLY抑制剂治疗三阴乳腺癌奠定理论基础。

实验部分

1 主要仪器与试剂

DCV原料利用真菌 *Aspergillus* sp. WG4通过大米

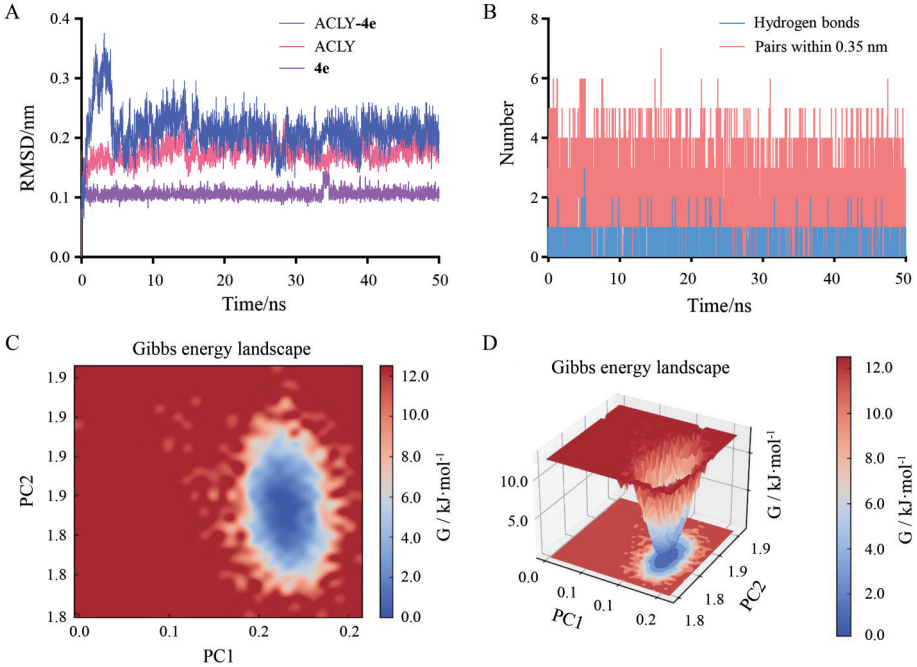


Figure 4 Molecular dynamics simulation analysis. A: Molecular dynamics simulation results of target compound **4e** and ACLY, RMSD in 50 ns analysis for predicted ACLY complexes with **4e**; B: Hydrogen bonds analysis for predicted ACLY complexes with **4e**; C, D: The predominant two- and three-dimensional conformations were identified through free energy landscape (FEL) analysis

固体发酵所得; 所有实验试剂均从商业试剂购买得到, 化学合成使用有机溶剂参照实验室手册的沸点重新蒸馏; 所有衍生物的核磁氢谱和碳谱均在Bruker核磁共振仪上测定, 质谱数据由LTQ Orbitrap质谱仪采集; 熔点使用X-4熔点显微仪测试; ZF-1三用紫外分析仪购自上海金鹏分析仪器; GF254薄层硅胶板从青岛海洋有限公司采购。

2　化学合成

2.1　化合物1a的合成

将DCV (1.0 mmol, 20 mg) 溶解于2 mL甲醇溶液中, 在搅拌下缓慢滴加37%的多聚甲醛溶液 (1.0 mmol, 3 mL), 室温反应30 min, 随后滴加正丁胺甲醇溶液 (2.0 mol), 反应体系缓慢加热至40 ℃, 继续搅拌反应10 h; 通过薄层色谱监测, 待反应结束, 加入饱和食盐水淬灭反应, 乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 最后经柱层析分离纯化, 得化合物**1a**, 收率42%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 6.71 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 15.4, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.89～4.78 (m, 1H), 4.19～3.97 (m, 3H), 3.52 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.48 (t, J = 10.3 Hz, 1H), 2.40～2.32 (m, 2H), 2.01～1.87 (m, 3H), 1.64 (m, 5H), 1.34 (d, J = 7.5 Hz, 5H), 0.90 (d, J = 6.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.20, 170.80, 169.91, 162.85, 153.98, 151.27, 136.80, 131.32, 119.53, 117.37, 110.21, 72.90, 42.95, 34.67, 33.17, 33.02, 28.23, 25.76, 24.48, 20.29; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{22}H_{31}NO_5$ $[M+H]^+$ 390.228 0, found 390.227 2。

2.2　化合物2a的合成

将DCV (1.0 mmol, 25 mg) 溶解于2 mL乙腈溶液中, 加入碳酸铯 (1.0 mmol, 28 mg), 室温反应30 min, 随后缓慢滴加溴化苄乙腈溶液 (1.0 mol, 14 mg), 室温下继续反应1 h后, 加入饱和食盐水淬灭反应, 乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 最后经柱层析分离纯化, 得化合物**2a**, 收率68%。^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.48 (s, 1H), 8.02～7.94 (m, 2H), 7.68～7.61 (m, 1H), 7.53 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 6.66 (dd, J = 6.4, 2.5 Hz, 2H), 6.46 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.89～4.80 (m, 1H), 4.33 (s, 2H), 4.06 (d, J = 17.8 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 17.9 Hz, 1H), 2.54～2.44 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.07～1.84 (m, 2H), 1.72～1.65 (m, 2H), 1.26 (d, J = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 196.30, 192.98, 171.07, 166.23, 162.37, 148.69, 137.78, 134.24, 134.15, 131.29, 128.98, 128.06, 114.93, 113.63, 101.22, 72.60, 70.25, 43.96, 34.07, 32.71, 24.16, 19.99; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{24}O_5$ $[M+H]^+$ 387.170 2, found 387.170 1。

2.3　化合物2b、2c、3a、3b、4a～4j的合成

将不同羧酸 (1.0 mmol) 溶于二氯甲烷中 (4 mL) 中, 依次加入催化剂EDCI (1.4 mmol) 和DMAP (0.1 mmol), 常温搅拌反应0.5 h, 随后加入DCV (25 mg, 1.0 mmol)。继续反应6～8 h, 通过薄层色谱监测, 待反应结束, 加入饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 粗产物经柱层析纯化, 得到目标终产物, 衍生物结构表征如下。

2.3.1　(*R*)-7-羟基-8-氧代-11-甲基-1-氧杂环十四碳-6,9-二烯-10-基 2-(3-((二茂铁甲酰)氧基)-5-羟基-4-苯甲酰基)乙酸酯 (2b)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.49 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.85 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.66 (td, J = 9.6, 6.0 Hz, 1H), 4.93～4.86 (m, 2H), 4.58～4.51 (m, 4H), 4.32 (s, 2H), 4.09～3.91 (m, 2H), 3.70～3.47 (m, 2H), 2.62～2.43 (m, 1H), 2.42～2.29 (m, 1H), 2.08～1.97 (m, 1H), 1.95～1.81 (m, 1H), 1.67 (d, J = 12.2 Hz, 4H), 1.31～1.25 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.19, 170.97, 169.63, 163.41, 154.84, 150.76, 136.83, 131.38, 129.87, 118.90, 117.86, 110.40, 77.25, 72.83, 72.24, 70.73, 70.70, 70.06, 69.39, 43.28, 34.61, 33.12, 29.60, 24.52, 20.29, 13.79; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{26}FeO_6$ $[M+H]^+$ 503.115 7, found 503.114 9。

2.3.2　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基丙酸酯 (2c)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.29 (s, 1H), 6.74 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.68 (ddd, J = 15.6, 8.5, 4.2 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 6.59 (dd, J = 4.9, 1.8 Hz, 1H), 4.92～4.83 (m, 1H), 3.98 (d, J = 17.4 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 2.56 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.51～2.41 (m, 1H), 2.38～2.30 (m, 1H), 2.05～1.97 (m, 1H), 1.92～1.84 (m, 1H), 1.78～1.73 (m, 2H), 1.69～1.65 (m, 2H), 1.44～1.37 (m, 3H), 1.29 (s, 26H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.18, 171.40, 170.79, 163.00, 154.54, 150.86, 136.66, 131.35, 119.20, 117.61, 110.31, 72.76, 43.01, 34.66, 34.42, 33.10, 31.92, 29.69, 29.65, 29.60, 29.44, 29.35, 29.24, 29.06, 24.83, 24.45, 22.68, 20.25, 14.10; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{32}H_{48}O_6$ $[M+H]^+$ 529.352 9, found 529.352 6。

2.3.3　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基(*E*)-3-(呋喃-3-基)丙烯酸酯 (3a)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.39 (s, 1H), 7.76 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.58～7.49 (m, 1H), 6.82 (t, J = 2.8 Hz, 1H), 6.75～6.61 (m, 4H), 6.52

(d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.93～4.85 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 3.60 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.51 (dd, *J* = 13.5, 7.6 Hz, 1H), 2.39～2.32 (m, 1H), 1.90～1.83 (m, 2H), 1.51 (dd, *J* = 5.4, 2.3 Hz, 1H), 1.27 (d, *J* = 2.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.17, 163.24, 150.87, 145.35, 144.74, 136.76, 135.42, 135.21, 132.30, 131.35, 130.75, 119.11, 117.72, 116.42, 110.40, 107.42, 74.21, 37.60, 35.39, 32.14, 23.40, 19.97; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{22}O_7$ $[M+H]^+$ 411.144 4, found 411.144 1。

2.3.4 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二烷-13-基(*E*)-3-(噻吩-3-基)丙烯酸酯 (3b) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.39 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 3.0, 1.3 Hz, 1H), 7.40 (m, 2H), 6.83 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.76～6.58 (m, 3H), 6.43 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.96～4.84 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 2.56～2.46 (m, 1H), 2.39～2.31 (m, 1H), 2.06～1.97 (m, 2H), 1.64～1.58 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.16, 170.88, 164.76, 163.25, 154.66, 150.84, 140.69, 137.24, 136.77, 131.35, 129.40, 127.33, 125.17, 119.11, 117.72, 116.31, 110.41, 72.80, 43.19, 34.62, 33.10, 29.72, 24.51, 20.29; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{23}H_{22}O_6S$ $[M+H]^+$ 427.121 5, found 427.121 2。

2.3.5 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二烷-13-基(*E*)-肉桂酸酯 (4a) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.40 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 6.8, 2.9 Hz, 2H), 7.46 (dd, *J* = 4.9, 2.0 Hz, 3H), 6.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.73～6.59 (m, 4H), 4.94～4.85 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.57～2.47 (m, 1H), 2.39～2.34 (m, 1H), 2.07～1.90 (m, 2H), 1.69～1.65 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.17, 170.89, 164.51, 163.25, 154.63, 150.88, 147.40, 136.79, 133.98, 131.35, 130.97, 129.06, 128.43, 119.15, 117.72, 116.73, 110.43, 72.82, 43.19, 34.62, 33.11, 29.73, 24.51, 20.29; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{24}O_6$ $[M+H]^+$ 421.165 1, found 421.165 3。

2.3.6 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二烷-13-基(E)-3-(4-溴苯基)丙烯酸酯 (4b) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.37 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.60 (q, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.48 (dt, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.45～7.36 (m, 2H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.75～6.66 (m, 2H), 6.66～6.59 (m, 2H), 4.94～4.86 (m, 1H), 4.07～3.97 (m, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.56～2.47 (m, 1H), 2.42～2.29 (m, 1H), 2.06～1.90 (m, 2H), 1.70～1.65 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.16, 170.86, 164.09, 163.21, 154.45, 150.96, 145.67, 136.83, 135.76, 135.10, 131.33, 130.79, 130.31, 128.10, 126.58, 118.25, 117.61, 110.37, 72.84, 43.17, 34.64, 33.13, 29.73, 24.51, 20.30; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{23}BrO_6$ $[M+H]^+$ 499.075 6, found 499.075 9。

2.3.7 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基(*E*)-3-(3-氯苯基)丙烯酸酯 (4c) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.38 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.48 (dt, *J* = 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.44～7.36 (m, 2H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.77～6.67 (m, 2H), 6.66～6.58 (m, 2H), 4.96～4.85 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 2.57～2.47 (m, 1H), 2.41～2.30 (m, 1H), 2.09～1.86 (m, 2H), 1.74～1.60 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.16, 170.86, 164.07, 163.23, 154.46, 150.94, 145.67, 136.84, 135.76, 135.10, 131.33, 130.79, 130.31, 128.10, 126.58, 118.26, 117.61, 110.37, 72.83, 43.17, 34.64, 33.12, 29.72, 24.51, 20.30; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{25}H_{23}ClO_6$ $[M+H]^+$ 455.126 1, found 455.126 3。

2.3.8 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基(*E*)-3-(3-甲基苯基)丙烯酸酯 (4d) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.37 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.45～7.38 (m, 2H), 7.38～7.30 (m, 1H), 7.27 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.76～6.55 (m, 4H), 4.91 (s, 1H), 4.02 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.57～2.46 (m, 1H), 2.44～2.28 (m, 4H), 2.15～1.86 (m, 2H), 1.70～1.64 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.19, 170.87, 164.55, 163.18, 154.67, 150.85, 147.58, 138.75, 136.74, 133.96, 131.80, 131.37, 129.06, 128.93, 125.63, 119.18, 117.71, 116.50, 110.39, 72.79, 43.14, 34.64, 33.10, 24.49, 21.33, 20.28; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{26}O_6$ $[M+H]^+$ 434.172 9, found 434.172 6。

2.3.9 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2H-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基(*E*)-3-(邻甲苯基)丙烯酸酯 (4e) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.42 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.68～7.62 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.28～7.25 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.75～6.66 (m, 2H), 6.64 (dd, *J* =

15.6, 1.2 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 4.96～4.85 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.50 (s, 4H), 2.41～2.31 (m, 1H), 2.06～1.87 (m, 2H), 1.72～1.63 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.18, 170.89, 164.55, 163.32, 154.69, 150.80, 145.00, 138.12, 136.80, 132.93, 131.36, 130.99, 130.69, 126.65, 126.50, 119.08, 117.77, 110.46, 72.81, 43.20, 34.63, 33.12, 29.72, 24.51, 20.29, 19.86; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{26}O_6$ $[M+H]^+$ 435.180 8, found 435.181 1。

2.3.10　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基(*E*)-3-(对甲苯基)丙烯酸酯 (4f)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.39 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.75～6.60 (m, 3H), 6.57 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.95～4.84 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.60～2.46 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.39～2.24 (m, 1H), 2.05～1.86 (m, 2H), 1.74～1.65 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.18, 170.85, 164.65, 163.22, 154.73, 150.77, 147.39, 141.52, 136.74, 131.36, 131.30, 129.78, 128.43, 119.12, 117.73, 115.61, 110.40, 72.77, 43.15, 34.64, 33.09, 29.70, 24.48, 21.55, 20.27; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{26}O_6$ $[M+H]^+$ 435.180 8, found 435.181 2。

2.3.11　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基(*E*)-3-(2,4-二甲基苯基)丙烯酸酯 (4g)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.38 (s, 1H), 8.16 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.59～7.48 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.76～6.59 (m, 3H), 6.51 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 4.95～4.85 (m, 1H), 4.02 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.56～2.49 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.36～2.30 (m, 1H), 2.05～1.85 (m, 2H), 1.71～1.66 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.20, 170.87, 164.74, 163.20, 154.75, 150.80, 144.93, 141.16, 138.12, 136.71, 131.76, 131.38, 130.11, 127.32, 126.66, 119.12, 117.76, 116.46, 110.42, 72.79, 43.13, 34.64, 33.10, 24.48, 21.39, 20.27, 19.74; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{27}H_{28}O_6$ $[M+H]^+$ 449.196 4, found 449.195 9。

2.3.12　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2H-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基(*E*)-3-(3-(三氟甲氧基)苯基)丙烯酸酯 (4h)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.36 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.56～7.48 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.34～7.29 (m, 1H), 6.84 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.77～6.59 (m, 4H), 4.96～4.85 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 17.5 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 2.57～2.47 (m, 1H), 2.41～2.32 (m, 1H), 2.05～1.89 (m, 2H), 1.73～1.66 (m, 2H), 1.27 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.17, 170.85, 164.00, 163.19, 154.41, 150.99, 149.75, 145.47, 136.85, 136.03, 131.33, 130.52, 126.75, 123.07, 120.40, 119.28, 118.64, 117.58, 110.36, 72.85, 43.15, 34.64, 33.13, 29.72, 24.51, 20.29; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{23}F_3O_7$ $[M+H]^+$ 505.147 4, found 505.147 1。

2.3.13　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳-13-基(*E*)-3-(2-甲氧基苯基)丙烯酸酯 (4i)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.44 (s, 1H), 8.19 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.42 (ddd, *J* = 8.8, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.05～6.94 (m, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.70 (s, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.95～4.86 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 17.8 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.61 (d, *J* = 17.7 Hz, 1H), 2.59～2.45 (m, 1H), 2.42～2.29 (m, 1H), 2.07～2.00 (m, 2H), 1.52～1.49 (m, 2H), 1.26 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 202.03, 173.25, 165.72, 162.18, 159.96, 155.90, 151.92, 135.42, 135.21, 133.84, 132.30, 130.75, 129.47, 123.74, 121.57, 117.87, 116.35, 111.92, 109.70, 73.69, 56.17, 40.63, 32.59, 29.34, 23.40, 19.66; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{26}H_{26}O_7$ $[M+H]^+$ 451.175 7, found 451.175 9。

2.3.14　(*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基(*E*)-3-(3,4,5-三甲氧基苯基)丙烯酸酯 (4j)　^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.38 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 6.74～6.60 (m, 3H), 6.52 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 28.6, 2.5 Hz, 1H), 4.89 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.93 (d, *J* = 3.4 Hz, 9H), 3.61 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 2.52 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 2.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 2.03～1.91 (m, 2H), 1.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 1.27 (d, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.18, 170.90, 164.50, 163.22, 154.63, 153.53, 150.90, 148.31, 147.36, 136.77, 131.46, 131.34, 129.44, 117.69, 115.88, 113.43, 110.39, 105.61, 103.20, 72.84, 61.03, 56.23, 43.17, 34.64, 33.11, 29.70, 24.49, 20.28; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{28}H_{30}O_9$ $[M+H]^+$ 511.196 8, found 511.196 6。

2.4　化合物4k、4l的合成

将4-((叔丁氧羰基)氨基)丁酸 (1.0 mmol) 溶解于

二氯甲烷 (4 mL) 中, 依次加入催化剂EDCI (1.3 mmol) 和DMAP (0.1 mmol), 常温下搅拌反应30 min, 随后再加入DCV (25 mg, 1.0 mmol), 继续室温反应8 h, 通过薄层色谱监测反应, 反应结束后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 粗产物经柱层析纯化, 得中间体; 将中间体溶解于体积比为TFA∶DCM = 1∶2的体系中脱保护基, 常温搅拌反应1 h, 通过薄层色谱板监测反应, 待反应结束后, 经减压浓缩和重结晶得白色固体粉末; 随后将白色固体粉末 (1.2 mmol) 溶解于DMF (4 mL) 中, 依次加入HATU (1.5 mmol) 和DIPEA (3.0 mmol) 常温搅拌反应30 min, 再加入氨基中间体, 继续常温反应8 h, 通过薄层色谱监测反应, 反应结束后, 加入饱和碳酸氢钠水溶液淬灭反应, 乙酸乙酯萃取3次, 合并有机相, 以无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 粗产物经柱层析纯化 (石油醚∶乙酸乙酯 = 3∶1), 得化合物**4k**、**4l**, 核磁表征结果如下所示。

2.4.1 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基4-((*E*)-3-(2-甲基苯基)丙烯酰胺基)丁酸酯 (4k) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.12 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 7.27～7.23 (m, 1H), 7.22～7.16 (m, 2H), 6.76～6.61 (m, 2H), 6.60～6.51 (m, 2H), 6.32 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.10 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.92～4.82 (m, 1H), 3.87 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 3.56～3.48 (m, 3H), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.52～2.46 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.36～2.27 (m, 1H), 1.99～1.87 (m, 2H), 1.78 (s, 2H), 1.67～1.61 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.26, 171.32, 170.81, 166.37, 162.32, 154.01, 151.57, 139.14, 137.60, 136.43, 133.77, 131.43, 130.76, 129.52, 126.21, 126.10, 121.55, 119.88, 117.26, 110.15, 72.85, 42.66, 39.05, 34.59, 33.18, 31.90, 24.65, 24.45, 20.26, 19.82; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{30}H_{33}NO_7$ $[M+H]^+$ 520.233 5, found 520.234 2。

2.4.2 (*S*,*E*)-11-羟基-4-甲基-2,10-二氧代-1,4,5,6,7,10-六氢-2*H*-苯并[*d*][1]氧杂环十二碳素-13-基4-((*E*)-3-(3-氯苯基)丙烯酰胺基)丁酸酯 (4l) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 11.16 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.40～7.29 (m, 3H), 6.81～6.61 (m, 2H), 6.61～6.52 (m, 2H), 6.41 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.91～4.84 (m, 1H), 3.91 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H), 3.58～3.49 (m, 3H), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.52～2.45 (m, 1H), 2.32 (dt, *J* = 13.1, 8.3 Hz, 1H), 1.99～1.83 (m, 2H), 1.72～1.60 (m, 4H), 1.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 197.21, 171.31, 170.81, 165.76, 162.54, 154.07, 151.40, 139.83, 136.63, 136.55, 134.81, 131.38, 130.09, 129.62, 127.44, 126.20, 121.87, 119.71, 117.33, 110.20, 72.87, 42.78, 39.11, 34.62, 33.16, 31.90, 24.57, 24.45, 20.26; HRMS (ESI) *m*/*z* Calcd. for $C_{29}H_{30}ClNO_7$ $[M+H]^+$ 539.171 1, found 539.171 4。

3 生物活性测试

3.1 细胞培养

本研究选用的人三阴乳腺癌细胞MDA-MB-231和人胰腺癌细胞系PANC-1均购自中国科学院上海细胞库。所有细胞在含5% CO_2、37 ℃恒温培养箱中常规培养。MDA-MB-231和PANC-1细胞采用DMEM培养基, 并补充10%胎牛血清及1%青霉素−链霉素双抗溶液。所有实验均在细胞生长至对数期时进行药物干预处理。

3.2 化合物的抗增殖活性评价

取对数生长期细胞, 将待测化合物配制成10 mmol·L^{-1}的母液。MDA-MB-231和PANC-1细胞分别以每孔4 000～5 000个的密度接种, 96孔板边缘使用PBS溶液进行液封, 置于含5% CO_2的培养箱中贴壁培养24 h。随后, 将化合物按倍半稀释法加入孔板, 每个浓度设3个复孔, 继续培养48 h。培养结束后, 每孔加入CCK-8试剂, 避光条件下继续培养4 h。使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度, 所得数据通过SPSS软件进行拟合, 计算IC_{50}值。

3.3 MDA-MB-231细胞钙离子检测

将对数生长期的MDA-MB-231细胞以适宜密度接种于六孔板中, 置于37 ℃恒温培养箱中培养24 h。随后加入指定浓度的化合物**4e**, 继续培养24 h。采用胰酶消化法收集细胞, 使用PBS洗涤两次, 离心后弃上清。加入1 mL Fluo-4 AM染色工作液, 轻柔吹打重悬为单细胞悬液。将细胞悬液置于37 ℃条件下避光孵育30 min, 经细胞筛过滤后上机检测。使用流式细胞仪在激发波长490 nm、发射波长525 nm条件下检测Fluo-4 AM的绿色荧光信号。

3.4 分子对接

ACLY蛋白晶体结构源至RCSB数据库 (PDB: 6O0H), 使用AutoDock Tools软件包对小分子和蛋白的结构进行删除水分子、加氢、加电荷、质子化状态等预处理。分子对接采用AutoDock Vina进行, 根据对接得分选择代表性的构象作为目标化合物的预测结合模式, 图片使用Pymol生成, 2D结合模式图采用LigPlus软件生成。

3.5 分子动力学模拟

采用GROMACS 2023对化合物**4e**和ACLY对接的最佳构象复合物进行分子动力学模拟, 以分子对接

生成的复合物作为起始结构进行50 ns的分子动力学模拟。选用CHARMM力场, TIP3P水模型, 添加盒子、水模型、电荷平衡、能量最小化、NVT及NPT平衡等操作。分子动力学模拟的结果使用DuIvyTools工具处理, 分析蛋白和配体的RMSD、氢键、蛋白回转半径和自由能形貌图的变化等。

3.6　统计学方法

衍生物体外抗肿瘤活性结果的IC_{50}通过GraphPad Prism 8软件拟合, 数据以均值 ± 标准差表示, 组间比较采用双尾student's *t*检验, $P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

作者贡献: 邓张双对本文提供指导性支持, 设计论文总纲, 终审论文; 梁坚家负责设计研究方案, 指导研究开展, 对文章进行修改; 王程负责提供化合物设计, 进行结构确证; 陈贤飞负责生物评价、计算机模拟和, 初稿撰写; 常煦负责生物评价、计算机模拟和统计分析; 周向锋负责化学合成。

利益冲突: 本文不存在任何利益相关问题。

References

[1] Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM, et al. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21: 141-162.

[2] Batchuluun B, Pinkosky SL, Steinberg GR. Lipogenesis inhibitors: Therapeutic opportunities and challenges [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21: 283-305.

[3] Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, et al. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation [J]. Science, 2009, 324: 1076-1080.

[4] Zhao S, Torres A, Henry RA, et al. ATP-citrate lyase controls a glucose-to-acetate metabolic switch [J]. Cell Rep, 2016, 17: 1037-1052.

[5] Zhang YF, Shen X, Shen Y, et al. Cytosolic acetyl-coenzyme A is a signalling metabolite to control mitophagy [J]. Nature, 2025. DOI:10.1038/s41586-025-09745-x.

[6] Lu RS, Ren LK, Fei XB, et al. PSMD14-mediated LDHA deubiquitination upregulates ACLY expression *via* H3K18 lactylation to promote lipid synthesis and pancreatic cancer progression [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e05762.

[7] Yang YR, Zhai JM, Wang F, et al. Discovery of novel tridentate alkenyl diacid derivatives as potent ATP citrate lyase inhibitors for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. J Med Chem, 2025, 68: 15598-15616.

[8] Saudou F. ACLY links mutant *α*-synuclein to metabolism, autophagy and neurodegeneration [J]. Neuron, 2025, 113: 1847-1849.

[9] Xiang W, Lv HW, Xing FX, et al. Inhibition of ACLY overcomes cancer immunotherapy resistance *via* polyunsaturated fatty acids peroxidation and cGAS-STING activation [J]. Sci Adv, 2023, 9: eadi2465.

[10] Gautam J, Wu JH, Lally JSV, et al. ACLY inhibition promotes tumour immunity and suppresses liver cancer [J]. Nature, 2025, 645: 507-517.

[11] Supplee JG, Marmorstein R, Wellen KE. Molecular targets of bempedoic acid and related decoy fatty acids [J]. Trends Endocrinol Metab, 2025, 36: 917-928.

[12] Liang JJ, Zhou XF, Long H, et al. Recent advance of ATP citrate lyase inhibitors for the treatment of cancer and related diseases [J]. Bioorg Chem, 2024, 142: 106933.

[13] Zhang L, Hu WJ, Qiu ZX, et al. Opportunities and challenges for inhibitors targeting citrate transport and metabolism in drug discovery [J]. J Med Chem, 2023, 66: 9229-9250.

[14] Zhou FG, Zhou YQ, Guo ZY, et al. Review of 10,11-dehydrocurvularin: Synthesis, structural diversity, bioactivities and mechanisms [J]. Mini Rev Med Chem, 2022, 22: 836-847.

[15] Zhao Q, Bi Y, Zhong J, et al. 10, 11-Dehydrocurvularin exerts antitumor effect against human breast cancer by suppressing STAT3 activation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42: 791-800.

[16] Deng ZS, Wong NK, Guo ZY, et al. Dehydrocurvularin is a potent antineoplastic agent irreversibly blocking ATP-citrate lyase: Evidence from chemoproteomics [J]. Chem Commun (Camb), 2019, 55: 4194-4197.

[17] Cheng TT, Song GL, Cheng L, et al. Discovery of alkyl conjugated diene diacids as novel ACLY inhibitors [J]. Chin J Org Chem (有机化学), 2024, 44: 3476-3489.

[18] Zheng YH, Zhou QQ, Zhao C, et al. ATP citrate lyase inhibitor triggers endoplasmic reticulum stress to induce hepatocellular carcinoma cell apoptosis *via* p-eIF2*α*/ATF4/CHOP axis [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25: 1468-1479.