

3,6-二酰氨基吨酮衍生物的设计、合成及生物活性研究

李子谦, 冯腾垒, 曹婷婷, 赵 泷, 周增辉, 申 蕊*, 马正月*

(河北大学药学院, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要: 本文报道了一类以 G-四联体为靶点的新型 3,6-二酰氨基吨酮衍生物的设计、合成及活性研究。分子对接显示该系列化合物均以 π - π 堆积和沟槽插入相结合的方式作用于人端粒 G-四联体, 且这一结合方式经荧光光谱与紫外光谱证实, 并在荧光滴定中发现化合物 **10c** 和 **10d** 对于四联体 DNA 具有较强的亲和力和选择性。随后经 MTT 法测试了筛选的化合物对三种人癌细胞株的体外抗增殖活性, 其半数抑制率达到了微摩尔级。另外, PCR stop 实验表明化合物 **10c** 和 **10d** 能够有效抑制端粒酶的扩增能力。

关键词: 吨酮; G-四联体; 分子对接; 荧光光谱; 细胞毒性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1133-07

Design, synthesis and biological activities of novel 3,6-diamide xanthenes

LI Zi-qian, FENG Teng-lei, CAO Ting-ting, ZHAO Long, ZHOU Zeng-hui, SHEN Rui*, MA Zheng-yue*

(Key Laboratory of Drug Quality Control of Hebei Province, College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: A series of novel xanthenes with terminal amine substituents at xanthone's C3 and C6 positions were designed and synthesized as potential ligands for telomeric G-quadruplex DNA. All the compounds in this series were bound to telomeric G-quadruplex in a “thread intercalation” manner that illustrated both in molecular docking and spectrometric studies. Among them, **10c** and **10d** showed better binding abilities and specific affinity toward G-quadruplex DNA HTG21 over ctDNA in the fluorescence assay. The antiproliferative activities of four screened compounds were examined in three cancer cells by MTT *in vitro*, and their inhibitory effects were observed at low micromolar ranges. In addition, the PCR stop assay demonstrated that **10c** and **10d** effectively inhibited the amplification ability of telomerase.

Key words: xanthone; G-quadruplex DNA; molecular docking; fluorescence spectroscopy; cytotoxicity

端粒长度的维持是肿瘤细胞得以永生的一个至关重要的原因^[1]。在大多数人类癌细胞株中, 因细胞分裂而损失的碱基数量可以通过高活性的端粒酶或其他替代途径得到补充^[2], 因而肿瘤细胞得以无限增殖, 而其他正常体细胞则不能^[3]。在人端粒末端存在着

大量串联重复的 DNA 序列: (TTAGGG)_n。这一序列很容易在一价或二价阳离子的诱导下以 Hoogsteen 氢键形成一种叫做 G-四联体的特殊 DNA 二级结构^[4]。越来越多的研究指出, 促进 G-四联体的形成能够抑制端粒酶的活性, 从而阻止端粒 DNA 的复制和延长, 能够达到诱导肿瘤细胞衰老和凋亡的目的^[5]。作为潜在的抗癌药物治疗靶点, G-四联体在近十几年内吸引了大量研究者的关注^[6]。构效关系研究表明, 适宜的芳香平面对于在小分子和四分体之间形成 π - π 堆积是很有用的^[7]。对于含有芳杂环的新型药效团的研究一直是新型 G-四联体配体开发中的一个重要领域^[8]。

收稿日期: 2017-01-16; 修回日期: 2017-02-12.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2012ZX09103-101-057); 河北省科技厅重点基础研究专项 (11966411D); 河北大学基金 (2014-06, 2014-07).

*通讯作者 Tel: 8613931346641, E-mail: mazhengy@126.com;

Tel: 8615128262896, E-mail: shenr05@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0056

天然吨酮衍生物主要存在于植物与真菌类中, 其优异的抗癌活性激励了很多研究者以不同的取代基对母核进行合成修饰^[9]。本实验室之前的研究表明二取代吨酮具有很好的 G-四联体结合能力^[10]。在本课题的研究中, 继续选用吨酮母核作为具有芳香性的近平面结构的药效团, 并在其 3,6 位以可质子化的末端氨基侧链修饰以增强与靶点的亲和力。运用分子对接来辅助该系列化合物的合理化设计^[11]。对接结果显示该系列化合物的母核部分能够与四分体表面产生 π - π 堆积作用, 而末端氨基能够与 HTG21 的磷酸骨架产生静电作用。这一假设与荧光发射和紫外吸收实验相一致, 并且结合常数与猝灭常数的大小次序间存在着一定关联。化合物 **10c** 和 **10d** 被确定为该系列最强效的 G-四联体结合剂, 并具有高选择性。随后的 MTT、AO/EB 染色和 PCR stop 实验表明这些化合物具有良好的生物效应, 特别是 **10c** 和 **10d** 的 MTT IC_{50} 值低于对照品顺铂, 具有作为强效的抗癌先导物进一步开发的潜力。目标化合物的合成如合成路线 1 所示。

结果与讨论

1 化合物的合成

目标化合物的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS 和元素分析等表征数据列于表 1。

2 分子对接

分子对接研究中的结合能数据列于表 2, 其中代

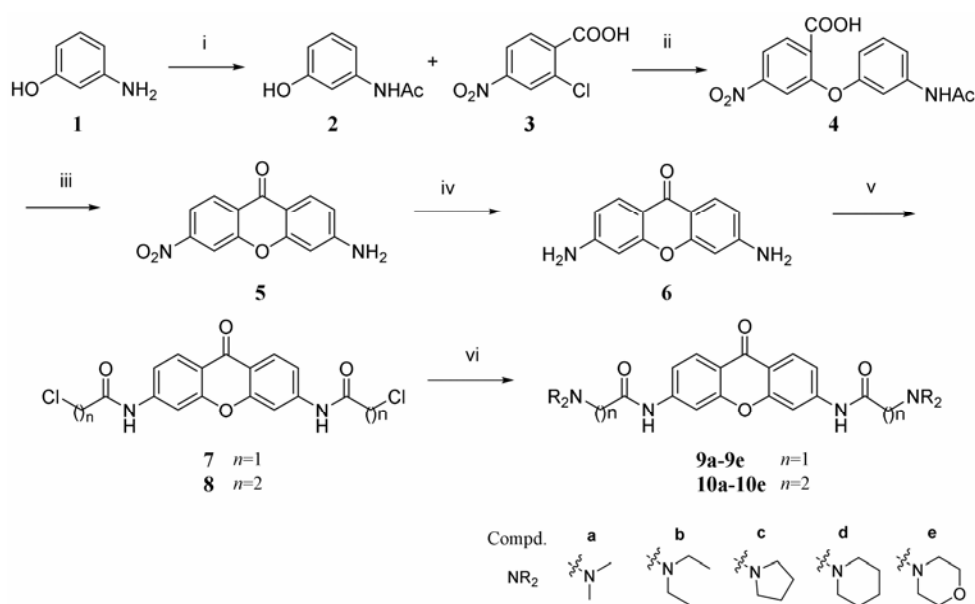
表性化合物 **10c** 的结合构象列于图 1a (受体表面红色表明电负性区域)。研究中发现, 每个化合物的母核部分都可以对接到四分体表面上类似于 **10c** 的位置, 并且侧链都伸向 1KF1 的负电区。在图 1c 中可以看到 **10a**~**10e** 的母核对接位置相同, 只是侧链上末端氨基位置略有不同。这一结合方式与文献中所报道的“线型插入”方式相一致^[12]。数据显示, **10a**~**10e** 比 **9a**~**9e** 有更低的静电能与总结合能。在图 1b 中可以看到, **10c** 比 **9c** 的末端氨基更深入于 1KF1 沟槽中的负电区, 因此导致了更强的静电作用。

3 光谱实验

荧光滴定的第一个阶段是用 HTG21 滴定该系列 10 个化合物。滴定过程中, 大多数化合物的荧光发射光谱表现出了明显的下降趋势, 只有 **9e** 呈现出轻微的上升趋势 (图 2)。显然是由于化合物的末端氨基与 HTG21 的磷酸骨架间产生的静电作用导致了发射光谱的下降^[13]。吗啉的碱性相对于其他胺较弱, 因此 **9e** 不能与受体间形成有效的静电作用。对于 **10e** 来说, 由于碳链加长使吗啉基处于易于形成静电的位置, 所以其光谱又呈现出了下降的趋势。这也反映出了对接计算上的一些缺陷, 因为所计算的结合能是基于化合物的最佳结合状态, 但某些情况下不具有代表性。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (1)$$

以谱图中的最大发射波长 λ_{\max} 根据方程 (1) 来绘制 Stern-Volmer 动态猝灭曲线。 K_q 是生物分子的



Scheme 1 Synthesis of target compounds. Reagents and conditions: (i) Acetic anhydride/ H_2O , 80 °C; (ii) Cu, K_2CO_3 , DMF, 130 °C; (iii) Concd. H_2SO_4 , 70 °C; (iv) $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 70 °C; (v) $\text{Cl}(\text{CH}_2)_n\text{COCl}$, CH_2Cl_2 , rt; (vi) Corresponding secondary amine, NaI, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, reflux

Table 1 The characterization data of **9a–9e**, **10a–10e**

Compd.	¹ H NMR, ¹³ C NMR, MS and elemental analysis
9a	Light yellow solid. Yield 83%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 9.48 (s, 2H), 8.27 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.09 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 2H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.4 Hz, 2H), 3.14 (s, 4H), 2.42 (s, 12H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.47, 169.38, 157.38, 143.21, 127.60, 118.01, 115.37, 107.00, 63.69, 46.04. MS (ESI): <i>m/z</i> 397.2 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₁ H ₂₄ N ₄ O ₄ : C, 63.62; H, 6.10; N, 14.13. Found: C, 63.22; H, 6.33; N, 14.26.
9b	Yellow solid. Yield 81%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 9.80 (s, 2H), 8.27 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.07 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 2H), 7.31 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.3 Hz, 2H), 3.22 (s, 4H), 2.70 (dd, <i>J</i> = 13.9, 6.9 Hz, 8H), 1.13 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 12H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.49, 170.67, 157.43, 143.16, 127.65, 117.98, 115.26, 106.86, 58.13, 48.94, 12.40. MS (ESI): <i>m/z</i> 453.2 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₅ H ₃₂ N ₄ O ₄ : C, 66.35; H, 7.13; N, 12.38. Found: C, 66.11; H, 7.19; N, 12.52.
9c	Yellow solid. Yield 80%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 9.49 (s, 2H), 8.26 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.08 (s, 2H), 7.32 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 3.34 (s, 4H), 2.73 (s, 8H), 1.90 (s, 8H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.50, 169.75, 157.39, 143.26, 127.58, 117.99, 115.41, 107.01, 59.82, 54.69, 24.14. MS (ESI): <i>m/z</i> 449.2 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₄ : C, 66.95; H, 6.29; N, 12.49. Found: C, 66.71; H, 6.33; N, 12.62.
9d	White yellow solid. Yield 78%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 9.67 (s, 2H), 8.27 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.07 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 2H), 7.30 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.8 Hz, 2H), 3.14 (s, 4H), 2.58 (s, 8H), 1.72–1.66 (m, 8H), 1.52 (s, 4H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.48, 168.22, 157.40, 143.22, 127.63, 117.98, 115.33, 106.91, 62.78, 54.97, 26.30, 23.54. MS (ESI): <i>m/z</i> 477.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄ : C, 68.05; H, 6.77; N, 11.76. Found: C, 68.31; H, 6.63; N, 11.98.
9e	White yellow solid. Yield 75%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 9.42 (s, 2H), 8.27 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.08 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 2H), 7.29 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.7 Hz, 2H), 3.84–3.80 (m, 8H), 3.21 (s, 4H), 2.69–2.65 (m, 8H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.39, 168.52, 157.36, 142.95, 127.70, 118.13, 115.34, 107.08, 67.02, 62.51, 53.84. MS (ESI): <i>m/z</i> 481.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₆ : C, 62.49; H, 5.87; N, 11.66. Found: C, 62.22; H, 5.83; N, 11.87.
10a	Light yellow solid. Yield 78%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.61 (s, 2H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 7.98 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 2H), 7.22 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.9 Hz, 2H), 2.70–2.68 (m, 4H), 2.57–2.54 (m, 4H), 2.43 (s, 12H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.59, 171.26, 157.42, 144.34, 127.36, 117.63, 115.77, 107.16, 54.94, 44.42, 33.45. MS (ESI): <i>m/z</i> 425.4 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₃ H ₂₈ N ₄ O ₄ : C, 65.08; H, 6.65; N, 13.20. Found: C, 65.23; H, 6.76; N, 13.52.
10b	Yellow solid. Yield 82%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.84 (s, 2H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.00 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 2H), 7.24 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.6 Hz, 2H), 3.48 (q, <i>J</i> = 7.0 Hz, 1H), 2.89–2.82 (m, 4H), 2.75 (q, <i>J</i> = 7.1 Hz, 8H), 2.62–2.56 (m, 4H), 1.19 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 12H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.54, 171.45, 157.47, 144.37, 127.46, 117.58, 115.37, 106.92, 48.77, 45.95, 33.17, 11.50. MS (ESI): <i>m/z</i> 481.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₄ : C, 67.48; H, 7.55; N, 11.66. Found: C, 67.15; H, 7.33; N, 11.85.
10c	Redish solid. Yield 79%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.79 (s, 2H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 7.99 (s, 2H), 7.18 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 2H), 2.98–2.91 (m, 4H), 2.77 (s, 8H), 2.65–2.61 (m, 4H), 1.96 (s, 8H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.59, 171.44, 157.46, 144.49, 127.41, 117.58, 115.60, 107.06, 53.11, 51.16, 34.68, 23.78. MS (ESI): <i>m/z</i> 477.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₄ : C, 68.05; H, 6.77; N, 11.76. Found: C, 68.19; H, 6.87; N, 11.66.
10d	Light yellow solid. Yield 77%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.97 (s, 2H), 8.23 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.03 (d, <i>J</i> = 1.7 Hz, 2H), 7.25 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.8 Hz, 2H), 2.65 (dt, <i>J</i> = 11.5, 5.5 Hz, 16H), 1.81–1.72 (m, 8H), 1.61 (s, 4H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.55, 171.35, 157.46, 144.50, 127.45, 117.59, 115.41, 106.98, 54.12, 53.63, 32.59, 26.29, 24.14. MS (ESI): <i>m/z</i> 505.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₉ H ₃₆ N ₄ O ₄ : C, 69.02; H, 7.19; N, 11.10. Found: C, 69.25; H, 7.23; N, 11.38.
10e	Light yellow solid. Yield 76%. ¹ H NMR (600 MHz, CDCl ₃) δ 11.37 (s, 2H), 8.24 (d, <i>J</i> = 8.6 Hz, 2H), 8.02 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 2H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 8.6, 1.8 Hz, 2H), 3.88 (s, 8H), 2.83–2.76 (m, 4H), 2.68 (s, 8H), 2.63–2.58 (m, 4H). ¹³ C NMR (151 MHz, CDCl ₃) δ 175.28, 170.79, 157.42, 144.18, 127.56, 117.74, 115.38, 107.08, 67.09, 54.01, 52.82, 32.30. MS (ESI): <i>m/z</i> 509.3 [M+H] ⁺ . Anal. Calcd. for C ₂₇ H ₃₂ N ₄ O ₆ : C, 63.77; H, 6.34; N, 11.02. Found: C, 63.57; H, 6.18; N, 11.35.

Table 2 The binding energy data and K_{sv} values of the ten compounds in the series. a: Binding energy = Vdw-hb-desolv energy + Electrostatic energy + Torsional energy

Compd.	Electrostatic energy	Binding energy/ Kcal·mol ⁻¹ ^a	$K_{sv}(\text{HTG21})$ /10 ⁵ mol ⁻¹	$K_{sv}(\text{ctDNA})$ /10 ⁵ mol ⁻¹
9a	-1.4	-5.1	0.68	-
9b	-1.2	-4.6	0.57	-
9c	-1.1	-5.8	1.12	0.20
9d	-0.8	-6.3	1.13	0.27
9e	-1.1	-5.1	-	-
10a	-2.1	-5.7	1.08	-
10b	-1.8	-4.9	1.36	-
10c	-1.4	-6.0	1.86	0.21
10d	-1.0	-6.7	1.98	0.21
10e	-1.7	-5.6	0.29	-

猝灭常数, τ_0 是不存在猝灭剂时荧光体的荧光寿命, 约为 10 ns, $[Q]$ 是猝灭剂浓度, K_{sv} 是动态猝灭常数。 K_{sv} 值列于表 2。由于 K_{sv} 值反映了静电力大小, 可见丙酰氨基化合物形成静电的能力优于乙酰氨基化合物, 吡咯基或哌啶基化合物形成静电能力优于其他氨基化合物。

随后用 ctDNA 对化合物 (**9c**、**9d**、**10c**、**10d**) 进行荧光滴定, 以考察这几个化合物对 G-四联体和双螺旋 DNA 之间的选择性。如图 3 所示, 这些化合物的荧光发射谱图只是随着滴定剂的加入出现了轻微减弱的趋势, 可能只是发生了较弱的表面结合。由于在两种滴定中, 所有的 K_q 值均远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 因此所有的荧光猝灭类型均被认为是静态猝灭。再将

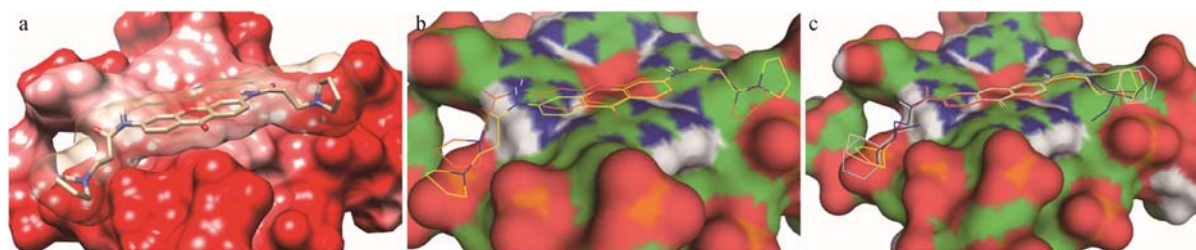


Figure 1 a: The putative binding conformation of **10c**, the acceptor surface was colored by coulombic electrostatic potential (the surface with red color indicated electronegative region). b: The superimposed poses of **9c** (orange) and **10c** (yellow). c: The superimposed poses of **10a** (red), **10b** (blue), **10c** (yellow), **10d** (cyan) and **10e** (wheat)

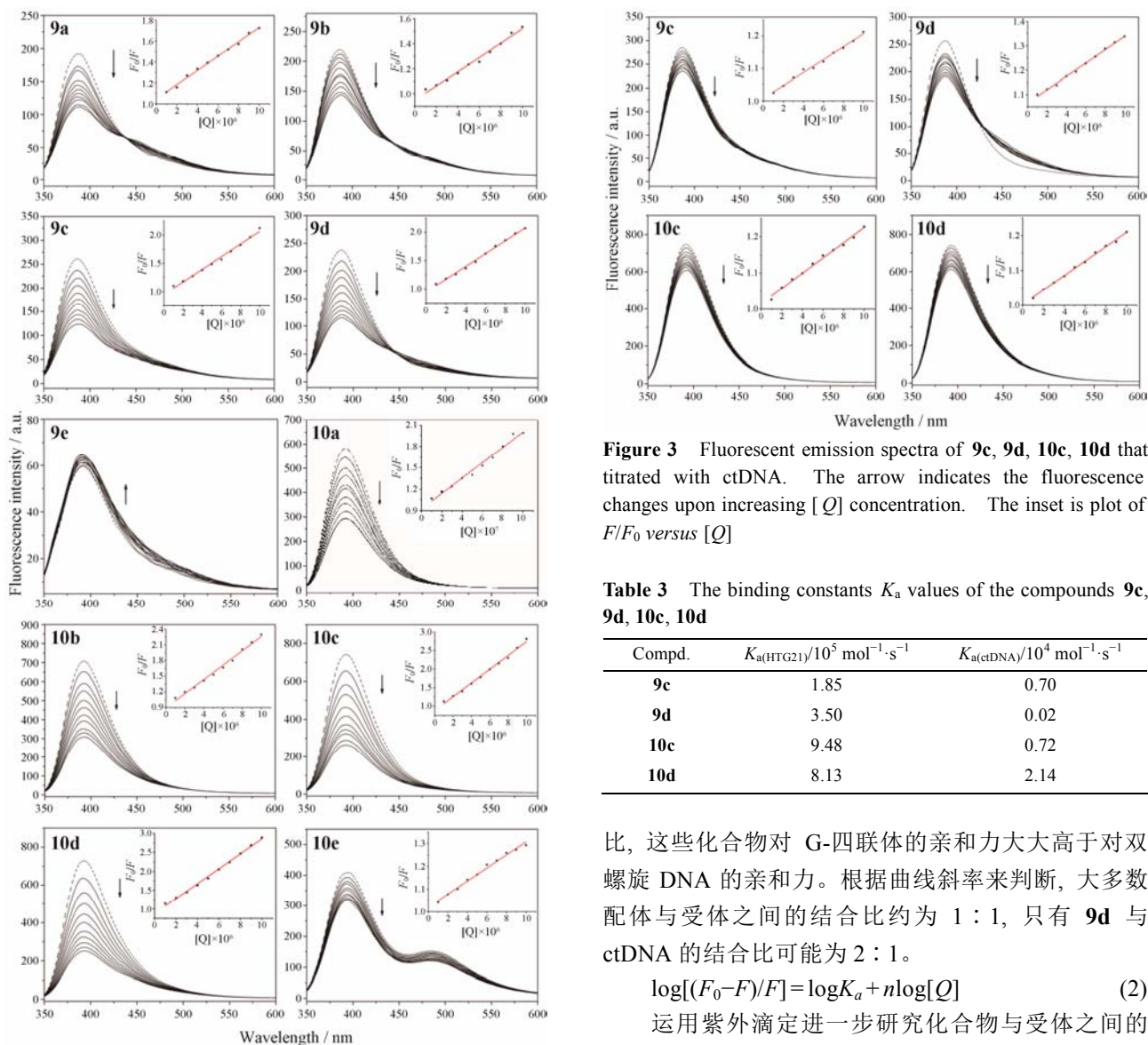


Figure 2 Fluorescent emission spectra of the ten compounds that titrated with HTG21. The arrow indicates the fluorescence changes upon increasing $[Q]$ concentration. The inset is plot of F/F_0 versus $[Q]$

Figure 3 Fluorescent emission spectra of **9c**, **9d**, **10c**, **10d** that titrated with ctDNA. The arrow indicates the fluorescence changes upon increasing $[Q]$ concentration. The inset is plot of F/F_0 versus $[Q]$

Table 3 The binding constants K_a values of the compounds **9c**, **9d**, **10c**, **10d**

Compd.	$K_{a(HTG21)}/10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{a(ctDNA)}/10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
9c	1.85	0.70
9d	3.50	0.02
10c	9.48	0.72
10d	8.13	2.14

这些谱图数据根据方程 (2) 进行线性拟合以得到结合常数 K_a 和结合位点数 (n)^[14]。这 4 个化合物的拟合曲线数据在图 4 和图 5 中, K_a 值列于表 3。通过对

比, 这些化合物对 G-四联体的亲和力大大高于对双螺旋 DNA 的亲和力。根据曲线斜率来判断, 大多数配体与受体之间的结合比约为 1 : 1, 只有 **9d** 与 ctDNA 的结合比可能为 2 : 1。

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

运用紫外滴定进一步研究化合物与受体之间的作用。用 HTG21 对化合物 **10c**~**10d** 进行紫外滴定, 化合物的紫外吸收峰在 208 nm 处表现出了明显的减色效应 (图 6)。这通常是由于芳香发色团与 DNA 碱基之间的堆积作用引起的。说明吨酮母核可以和四分体表面形成较强的 π - π 堆积作用^[15-18]。

4 MTT 实验

将化合物 (**9c**、**9d**、**10c**、**10d**) 进行 MTT 实验。

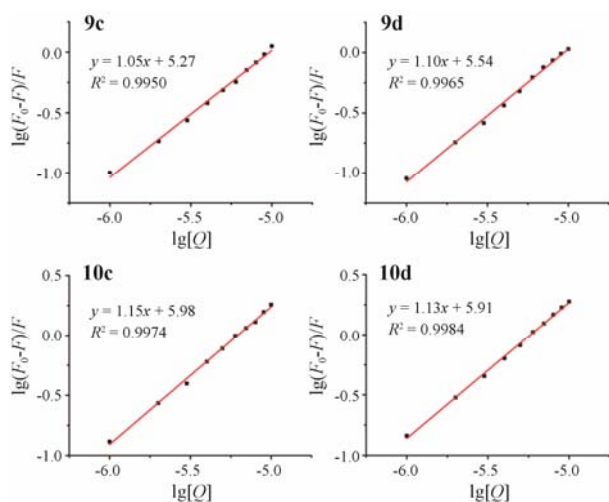


Figure 4 The linear fitting plots of $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[Q]$ of **9c**, **9d**, **10c**, **10d** that titrated with HTG21

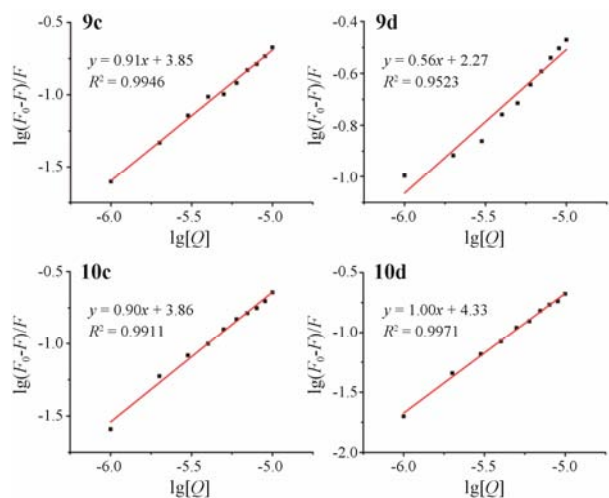


Figure 5 The linear fitting plots of $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log[Q]$ of **9c**, **9d**, **10c**, **10d** that titrated with ctDNA

短期细胞毒性的 IC_{50} 值列于表 4。相比较而言, **10c** 和 **10d** 的细胞毒性优于 **9c** 和 **9d**, 并且优于对照品顺铂。

5 AO/EB 染色实验

采用 AO/EB 双染法对化合物 (**9c**、**9d**、**10c**、**10d**) 进行测试。如图 7 所示, 随化合物浓度增大, 逐渐发生了核固缩、核破裂、过度膨胀和细胞变形等明显的细胞形态变化。这些现象说明这些化合物可以有效抑

Table 4 The IC_{50} values of compounds **9c**, **9d**, **10c**, **10d** against several human cancer cell lines

Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	MGC803	HeLa	A549
9c	9.7	14.1	24.0
9d	8.0	11.6	19.9
10c	3.3	4.0	10.5
10d	5.1	6.1	6.3
Cisplatin	9.2	10.5	12.6

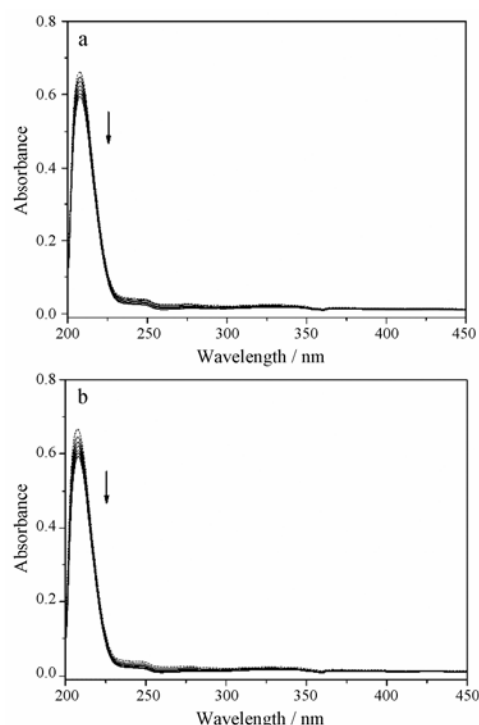


Figure 6 Electronic absorption spectra of **10c** (a) and **10d** (b) that titrated with HTG21

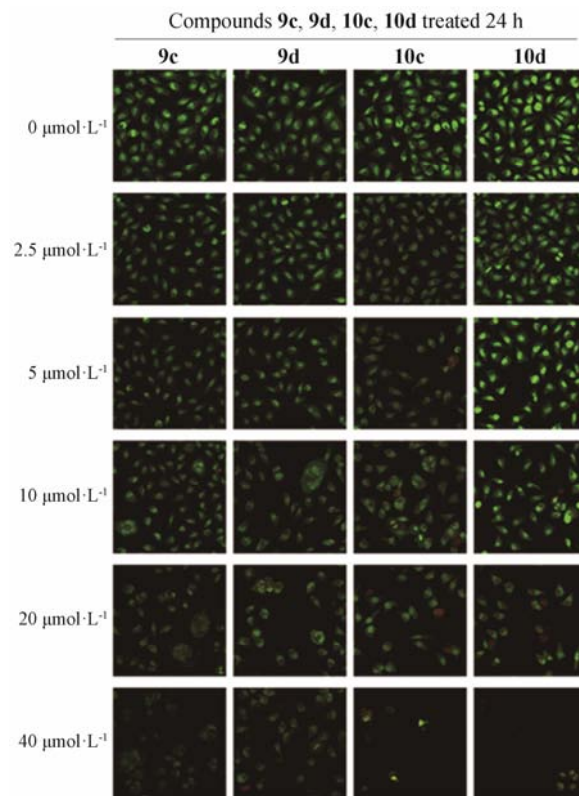


Figure 7 The fluorescent microscopic observation of MGC803 cells treated with **9c**, **9d**, **10c**, **10d** ($0-40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

制细胞增殖。当 **10c** 和 **10d** 的浓度达到 $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 几乎已观察不到活细胞。

6 PCR stop 实验

采用 PCR stop 实验以研究化合物 **10c** 和 **10d** 对端粒酶的抑制作用。银染的照片显示于图 8 中。随化合物浓度增加, 条带颜色明显变淡, 这说明化合物在稳定了 G-四联体结构后, 能有效抑制端粒酶的扩增能力。

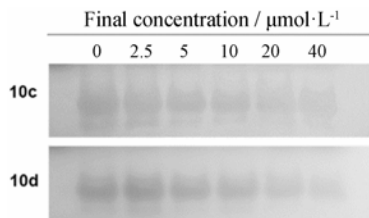


Figure 8 The amplification inhibition effects of **10c**, **10d** (0–40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on HTG21 in PCR stop assays

7 小结

本课题合成了一系列新型吨酮衍生物, 运用分子对接和荧光滴定相结合的方法对该系列化合物进行了活性筛选。这一方法具有操作的简便性以及预测结果的可靠性。化合物 **10c** 和 **10d** 表现出较强的 G-四联体稳定作用以及抗癌活性, 具备进一步研究的价值。

实验部分

实验中所用化学品均为 AR 以上纯度, 购自天津市科密欧化学试剂有限公司和西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。Taq DNA 聚合酶购自纽英伦生物技术 (北京) 有限公司。所用寡核苷酸、引物和脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。荧光光谱由 F97 Pro 型光谱仪测定。紫外光谱由 UV-8500 型光谱仪测定。 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 由 Bruker AVANCE 600 核磁共振仪 (TMS 为内标) 测定。质谱由 Bruker apex ultra (7.0T) 傅立叶变换质谱仪测定。元素分析由 Vario EL 元素分析仪测定。MTT 吸光度由 Bio-Tek 酶标仪测定。细胞形态观察通过 Olympus 荧光显微镜。聚合酶链反应 (PCR) 通过 L96G/Y 热循环仪进行。

1 化合物合成

1.1 化合物 5 的合成 按照文献^[19]方法, 以原料 **2**、**3** 合成。产物粗品经硅胶柱色谱 (洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯: 三乙胺) 分离。干燥后得橙黄色固体, 两步总收率 45%。

1.2 化合物 6 的合成 取 6.7 mmol 化合物 **5**、8.04 mmol $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和纯化水 50 mL 加入到 100 mL 圆底烧瓶中。70 $^\circ\text{C}$ 反应 5 h。冷却至室温, 减压抽滤, 用纯化水将滤饼冲洗至中性, 以 TLC 检测无杂点, 干

燥后得到淡黄色固体, 收率 89%。

1.3 化合物 7、8 的合成^[20] 取 6.4 mmol 化合物 **6** 于 50 mL 圆底烧瓶中, 分别加入氯乙酰氯或氯丙酰氯 128 mmol, 二氯甲烷 12 mL。室温反应 3 天。反应液倒入冰的 5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠溶液中, 调节 pH 至 8。抽滤, TLC 检测无杂点, 干燥后得淡黄色固体, 收率 95%。

1.4 化合物 9、10 的合成 取 0.4 mmol 化合物 **7** 或 **8**、无水碘化钠 0.15 g 和无水乙醇 10 mL。加热搅拌至回流, 缓慢滴加含 1 mL 相应二级胺的 10 mL 乙醇溶液。回流 2 h。过滤后, 减压蒸干溶剂。剩余物经硅胶柱色谱 (洗脱剂为石油醚: 乙酸乙酯: 三乙胺, 体积比 25:75:1) 分离。 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS 和元素分析等化合物表征数据列于表 1。

2 分子对接

分子建模中使用了从人端粒 DNA 中得到的平行型 G-四联体晶体结构 (PDB NO. 1KF1)。受体和配体文件均通过 AutoDock Tools 1.5.6 来准备。对接计算是通过 AutoDock 4.2.6 来进行的, 所采用遗传算法的参数为: 结合能评估最大次数 25 000 000; GA 运行最大次数 100。选择对接结果中的最低结合能构象作为结合方式^[21]。使用 PyMOL 和 Chimera 软件对结果作图。

3 光谱实验

荧光滴定实验是在 25 $^\circ\text{C}$ 下操作的。光程 1 cm, 狭缝宽度 10 nm。待测溶液为含有 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配体和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4), 将预成型的 G-四联体储液 HTG21 或 ctDNA 储液分别滴加入比色皿中, 使两种 DNA 的终浓度从 0 上升至 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[22]。荧光实验的激发波长为 320 nm, 发射波长为 350~600 nm。

紫外滴定的波长范围是 200~450 nm。样品池中的待测溶液含有 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 配体, 参比池中不含有配体, 缓冲体系与荧光滴定相同。分别滴加两种 DNA, 使终浓度从 0 上升至 1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。测定值为样品值减去参比值。通过 Origin 9.0 来分析谱图数据。

4 MTT 实验

按照文献方法使用标准 MTT 测试法^[23]。将 3 种人癌细胞株 MGC803、HeLa 和 A549 以每孔 5×10^3 个的密度接种到 96 孔板中。过夜培养后, 将待测化合物与阳性对照顺铂加入到培养基中, 使终浓度分别为 1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养 44 h 后, 加入 MTT 再培养 4 h。在 490 nm 下测定吸光度。每个实验以 3 个副孔重复 3 次。抑制率 (%) = $(1 - A_{\text{样品}} / A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

5 AO/EB 染色实验

将 MGC803 细胞以每毫升 5×10^4 个的密度接种到 24 孔板中。过夜培养后, 将待测化合物分别以 $1.25 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的终浓度加入到培养基中。培养 24 h 后, 加入 AO/EB 双染液 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ AO 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ EB)。通过荧光显微镜观察并照相。

6 PCR stop 实验

用于扩增的引物为: HTG21 (5'-GGGTTAGGGT TAGGGTTAGGG-3') 和 RevHTG21 (5'-ATCGCTTCT CGTCCCTAACC-3')。反应体系中含有待测化合物 ($0 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、HTG21 ($0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、RevHTG21 ($0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、Taq 酶 (1.25 U)、dNTPs ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 $1 \times$ Thermopol 缓冲液。扩增条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 然后以 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 进行 30 个循环。对扩增产物进行银染后照相^[24]。

References

- [1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266: 2011–2015.
- [2] Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 522–531.
- [3] Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11: 318–324.
- [4] Huppert JL. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes [J]. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1375–1384.
- [5] Arora A, Kumar N, Agarwal T, et al. Human telomeric G-quadruplex: targeting with small molecules [J]. *FEBS J*, 2010, 277: 1345–1360.
- [6] Ait-Aissa K, Ebben JD, Kadlec AO, et al. Friend or foe? Telomerase as a pharmacological target in cancer and cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 422–433.
- [7] Yan YY, Tan JH, Ou TM, et al. DNA G-quadruplex binders: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Patents*, 2013, 23: 1495–1509.
- [8] Xiong YX, Huang ZS, Tan JH. Targeting G-quadruplex nucleic acids with heterocyclic alkaloids and their derivatives [J]. *Eur J Med. Chem*, 2015, 97: 538–551.
- [9] Na Y. Recent cancer drug development with xanthone structures [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61: 707–712.
- [10] Shen R, Chen YJ, Li ZQ, et al. Synthesis and biological evaluation of disubstituted amidoxanthenes as potential telomeric G-quadruplex DNA-binding and apoptosis-inducing agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24: 619–626.
- [11] Artese A, Costa G, Distinto S, et al. Toward the design of new DNA G-quadruplex ligands through rational analysis of polymorphism and binding data [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 68: 139–149.
- [12] Fedoroff OY, Salazar M, Han H, et al. NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA [J]. *Biochemistry*, 1998, 37: 12367–12374.
- [13] Shen R, Wang WH, Yang GL. DNA binding property and antitumor evaluation of xanthone with dimethylamine side chain [J]. *J Fluorescence*, 2014, 24: 959–966.
- [14] Ni YN, Wang SS, Kokot S. Spectrometric study of the interaction between alpinetin and bovine serum albumin using chemometrics approaches [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 663: 139–146.
- [15] Shen R, Wang P, Tang N. Cytotoxic activity and DNA-binding properties of xanthone derivatives [J]. *J Fluorescence*, 2010, 20: 1287–1297.
- [16] Shen R, Wang P, Tang N. Synthesis, crystal structure, DNA-binding properties and cytotoxic activity of the copper (II) complex involving xanthone [J]. *J Fluorescence*, 2009, 19: 1073–1082.
- [17] Wang HF, Shen R, Jia L, et al. Cytotoxic activity and DNA-binding investigations of two benzoxanthone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57: 808–813.
- [18] Wang HF, Shen R, Wu JC, et al. Antitumor activity and DNA-binding investigations of the Zn(II) and Cu(II) complexes with isoeuxanthone [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57: 814–818.
- [19] Cui J, Jin J, Hsieh YH, et al. Design, synthesis and biological evaluation of rose bengal analogues as SecA Inhibitors [J]. *ChemMedChem*, 2013, 8: 1384–1393.
- [20] He JH, Liu HY, Li Z, et al. New quinazoline derivatives for telomeric G-quadruplex DNA: effects of an added phenyl group on quadruplex binding ability [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 63: 1–13.
- [21] Altieri A, Alvino A, Ohnmacht S, et al. Xanthene and xanthone derivatives as G-quadruplex stabilizing ligands [J]. *Molecules*, 2013, 18: 13446–18470.
- [22] Tan JH, Ou TM, Hou JQ, et al. Isaindigotone derivatives: a new class of highly selective ligands for telomeric G-quadruplex DNA [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2825–2835.
- [23] Wang HZ, Chang CH, Lin CP, et al. Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2009, 12: 35–43.
- [24] Chen WJ, Zhou CX, Yao PF, et al. Disubstituted 1,8-dipyrazolcarbazole derivatives as a new type of *c-myc* G-quadruplex binding ligands [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 2829–2836.