

靛红衍生物类棕榈酰基转移酶抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究

余伟¹, 董金娇¹, 朱昕悦¹, 杨侃¹, 刘振明², 乔晓强^{1,3}, 宋亚丽^{1*}

(1. 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; 2. 北京大学, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 3. 河北大学, 药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北保定 071002)

摘要: 基于已知化合物的化学结构, 利用生物电子等排体原理, 结合分子对接技术设计合成了 12 个靛红衍生物类棕榈酰基转移酶抑制剂, 测定了其体外抗肿瘤活性并进行了分子对接研究。目标化合物结构均已由核磁共振氢谱 (¹H NMR)、核磁共振碳谱 (¹³C NMR) 和高分辨质谱 (HR-MS) 进行了确证。体外抗肿瘤实验结果表明, 化合物 **5b** 对棕榈酰基转移酶高表达的 MCF-7 细胞表现出的抑制活性与对照药 (IC₅₀ = 8.4 μmol·L⁻¹) 相当, IC₅₀ 为 12.0 μmol·L⁻¹。化合物 **4b** 对 HeLa 细胞 (IC₅₀ = 8.1 μmol·L⁻¹) 的抑制活性优于顺铂 (IC₅₀ = 40.1 μmol·L⁻¹)。同时分子对接结果表明, 化合物均能完全进入 3'-磷酸腺苷-5'-二磷酸 (PAP) 活性口袋内, 且 **5b** 打分值最好, 具有进一步的研究价值。

关键词: 靛红衍生物; 棕榈酰基转移酶; 合成; 分子对接; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-1073-07

Design, synthesis and antitumor activity of isatin derivatives as palmitoyl transferase inhibitors

YU Wei¹, DONG Jin-jiao¹, ZHU Xin-yue¹, YANG Kan¹, LIU Zhen-ming²,
QIAO Xiao-qiang^{1,3}, SONG Ya-li^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Control of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China; 3. Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Based on the chemical structure of known compound, 12 isatin derivatives palmitoyl transferase inhibitors are designed and synthesized using bioisosterism and molecular docking, while their anti-tumor activities *in vitro* are determined. The structures of the target compounds are confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HR-MS. *In vitro* anti-tumor assay illustrates that compound **5b** exhibits similar anti-tumor activity to the control (IC₅₀ = 8.4 μmol·L⁻¹), with IC₅₀ value of 12.0 μmol·L⁻¹ against MCF-7 in which palmitoyl transferase is highly expressed. Compound **4b** shows higher inhibitory activity against HeLa (IC₅₀ = 8.1 μmol·L⁻¹) than cisplatin (IC₅₀ = 40.1 μmol·L⁻¹). The molecular docking demonstrates that all compounds could completely enter the site of 3'-adenosine monophosphate-5'-diphosphate (PAP). Taken together, isatin derivatives represent promising compounds for the discovery of novel anti-tumor agents.

Key words: isatin derivative; palmitoyl transferase; synthesis; molecular docking; anti-tumor activity

收稿日期: 2021-09-22; 修回日期: 2021-10-13.

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019060); 国家自然科学基金资助项目 (82003597); 河北省自然科学基金资助项目 (B2019201359); 河北省青年拔尖人才、河北大学自然科学多学科交叉研究计划资助项目 (DXK201912); 河北省硕士研究生创新资助项目 (CXZZSS2021012); 大学生创新创业训练项目 (20211193).

*通讯作者 E-mail: yalisong@hbu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1389

靛红即二氢吲哚-2,3-二酮,在多种植物中广泛分布,是一类重要的氮杂环化合物^[1]。其衍生物具有多种生物活性,在抗肿瘤、抗病毒、神经保护等方面具有重要的意义,其中最突出的作用是抗肿瘤活性^[2,3]。最近几年研究表明,靛红衍生物在体内体外均具有良好的抗肿瘤活性,Fares等^[4]将靛红与喹唑啉结构进行杂合,制备了一系列新颖的靛红衍生物,实验结果表明化合物**1**具有较强的体外抗肿瘤活性。Solomon等^[5]将靛红与苯并噻唑进行缀合,合成了新型的希夫碱类衍生物**2**,对人体的乳腺癌细胞具有一定程度的抑制活性。Eldehna等^[6]利用药效团杂合的原理,将靛红与吡啶基团进行杂合得到化合物**3**,对肿瘤细胞也有一定的细胞毒活性。有些靛红衍生物已经用于临床,例如辉瑞制药研发的多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼(sunitinib)于2006年被FDA批准上市,用于治疗晚期肾细胞癌等疾病;勃林格殷格翰公司研发的三联血管生成抑制剂尼达尼布(nintedanib)于2014年11月在德国获批上市,用于治疗特定类型的晚期肺癌。因此,设计以不同片段修饰的靛红衍生物,合成了具有代表性的抗肿瘤化合物,具体结构如图1所示^[7]。

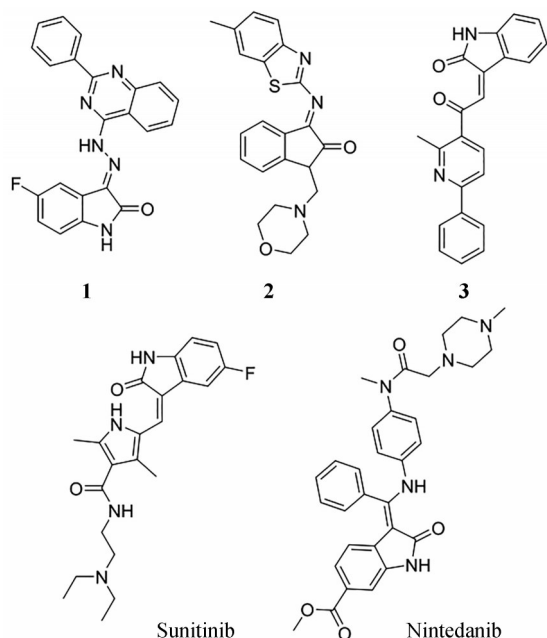


Figure 1 Reported some anticancer isatin derivatives

棕榈酰化修饰是一种广泛存在并且可逆的蛋白质翻译后脂质修饰,对蛋白质的定位、扩散和稳定性的动态调控至关重要。多种癌细胞的增殖、迁移和侵袭都依赖于癌症相关蛋白的棕榈酰化,大量数据证明,与正常细胞比较,在卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌和前列腺癌中DHHC20表达水平平均上调^[8]。人类棕榈酰基转移

酶家族的23个成员多数都参与肿瘤的调节,使得靶向棕榈酰基转移酶成为潜在的肿瘤治疗策略。Ducker等^[9]发现了5个棕榈酰基转移酶抑制剂,其结构如图2所示。Jennings等^[10]对5个化合物进行的棕榈酰基转移酶抑制活性实验显示,所有化合物对棕榈酰基转移酶均有不同程度的抑制作用,其中化合物V的抑制作用最强。进一步的作用机制研究显示,化合物V对酶的抑制作用是可逆的,且安全性更高。分子对接分析其与棕榈酰基转移酶的作用方式,发现这5个化合物均可进入3'-磷酸腺苷-5'-二磷酸(PAP)结合位点,I、III仅与His155有氢键作用;II仅与Ser143有氢键作用;IV仅与His154有 π - π 共轭作用;V与Lys135、His140、His141、Ser143有氢键作用且打分值最高,同时也与PAP作用方式更为接近,因此,以化合物V的结构为基础,通过生物电子等排的方法将苯并噻吩酮骨架替换成靛红结构,并围绕此结构进行修饰,有可能寻找到特异性更好、抑制作用可逆的棕榈酰基转移酶抑制剂。

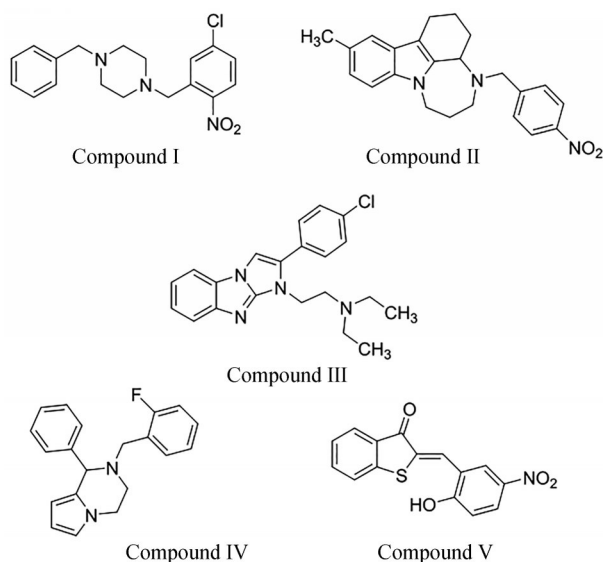


Figure 2 Representative palmitoyl transferase inhibitors

结果与讨论

1 化合物的设计

2018年Rana等^[11]报道了棕榈酰基转移酶的结构,其蛋白晶体结构(PDB ID: 6BML)中的配体小分子PAP所处的活性口袋是棕榈酰CoA的结合位点。本项目以配体小分子PAP所处的口袋作为活性位点,利用生物电子等排理论,将化合物V的苯并噻吩酮骨架替换为生物电子等排体靛红,根据PAP的结构及其与氨基酸残基的相互作用特点,在靛红的1位引入碱性基团二级胺结构;PAP所在口袋含有多种极性氨基酸(如组氨酸、丝氨酸、精氨酸等),氨基硫脲带有1个

硫原子和3个氮原子,可以与周围的氨基酸残基形成良好的相互作用,如氢键、 ρ - π 共轭等,分子对接结果也进一步验证了这一猜想:3位引入氨基硫脲结构可以增加与PAP结合位点Ser143、His141等极性氨基酸的相互作用。再在此结构基础上利用分子对接对其进行结构优化,将3位氨基硫脲的部分结构环化形成噻唑烷酮,增加的羰基氧原子还可以和PAP结合位点的氨基酸残基形成氢键,增强与靶蛋白的相互作用,设计了靛红衍生物类棕榈酰基转移酶抑制剂。结构如图3所示。

2 化合物的合成

目标化合物4a~4h、5a~5d的合成路线如图4所示。中间体2、3的合成采用文献报道的方法进行^[12,13]。以靛红为原料,在碱性条件下,分别与1,2-二溴乙烷、

1,3-二溴丙烷或1,4-二溴丁烷发生取代反应,得到中间产物2;再在碱性条件下引入吗啉环等二级胺得到中间产物3;中间产物3与氨基硫脲经过缩合反应得到目标化合物4;化合物4与2-溴乙酸乙酯在碱性条件下环合生成化合物5。目标化合物4a~4h、5a~5d的结构经¹H NMR、¹³C NMR和HR-MS进行了确证,其收率、性状、熔点及波谱数据见表1。

3 活性评价

3.1 体外抗增殖活性实验 本部分实验以顺铂为阳性对照药物,选取MGC-803、HeLa、MCF-7、RBL-2H3和L-929细胞对目标化合物进行细胞毒性实验,结果见表2。抗增殖结果表明,目标化合物对所测试的细胞具有不同程度的抑制活性,其中化合物5a、5b对MCF-7细胞表现出较好的抗增殖活性,IC₅₀值分别为

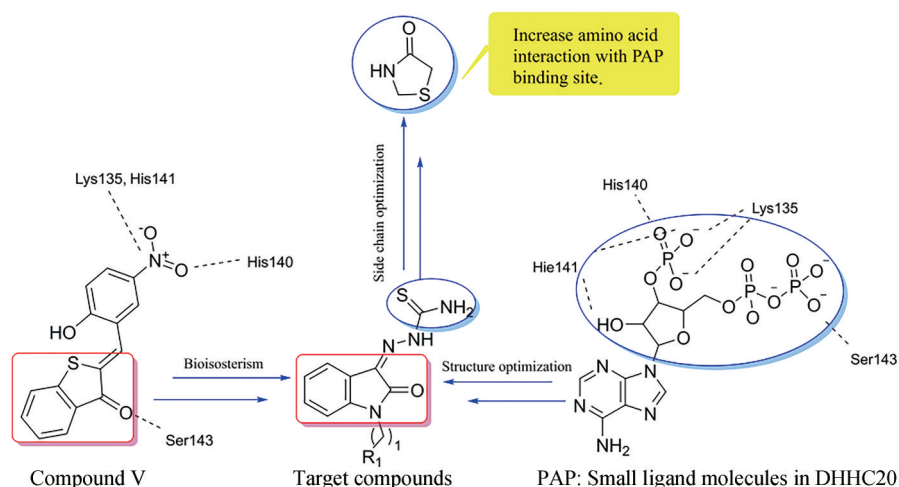


Figure 3 Design of palmitoyl transferase inhibitors

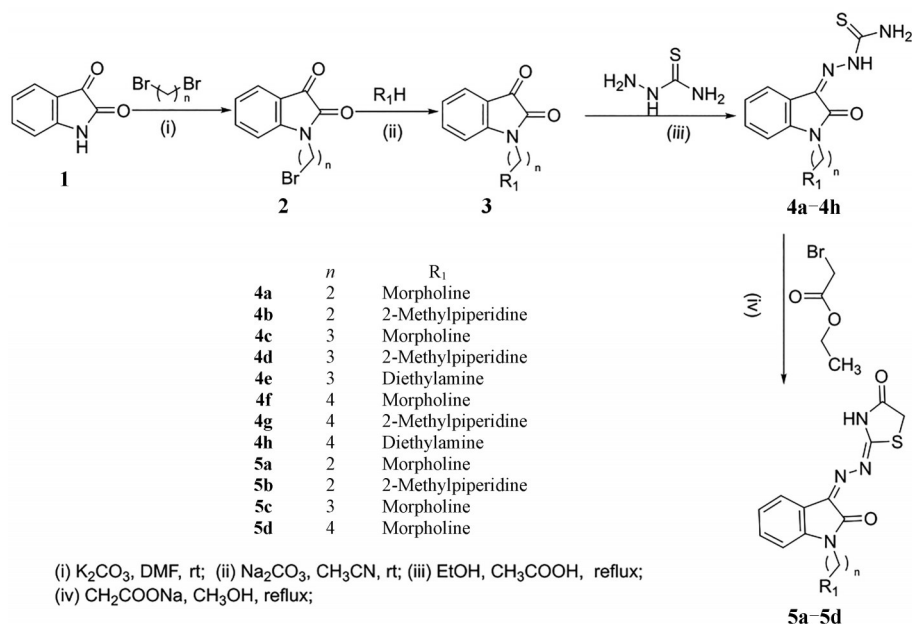


Figure 4 Synthetic route of target compounds of 4a-4h and 5a-5d

Table 1 Physical properties and spectra data of the target compounds **4a–4h** and **5a–5d**

Compd.	Yield /%	Property	mp/°C	¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	¹³ C NMR (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	ESI ⁺ -MS (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺
4a	83	Yellow powder	212.0–213.1	12.41 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.43 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.15 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.87 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 3.51 (t, <i>J</i> = 4.5 Hz, 4H), 2.57 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 2.44 (t, <i>J</i> = 4.5 Hz, 4H).	178.8, 160.8, 142.9, 131.1, 131.0, 122.7, 120.7, 119.3, 110.1, 66.1, 54.9, 53.1, 36.6.	334.133 2
4b	70	Yellow powder	232.3–233.5	12.36 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.25 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.16 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.98 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 3.19 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.73 (m, 1H), 1.62 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.07 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 3H).	178.7, 160.9, 142.0, 131.5, 131.1, 123.1, 120.8, 119.7, 110.0, 59.2, 50.9, 48.1, 33.6, 30.7, 22.3, 21.5, 17.1.	346.169 6
4c	80	Yellow powder	230.0–231.5	12.41 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.82 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 3.62 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 4H), 2.80 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 2.72 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 4H), 1.91 (m, 2H).	178.7, 160.9, 142.8, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 109.9, 64.7, 54.5, 52.2, 37.1, 22.6.	348.148 9
4d	87	Yellow powder	217.3–218.9	12.37 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.29 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.85 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 3.40 (m, 1H), 3.18 (m, 2H), 2.97 (t, <i>J</i> = 6.3 Hz, 2H), 2.03 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 1.82 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.25 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 3H).	178.7, 160.9, 142.6, 131.2, 131.1, 122.9, 120.8, 119.5, 109.9, 58.3, 51.1, 49.5, 36.7, 31.1, 30.7, 22.5, 21.0, 17.3.	360.185 8
4e	76	Yellow powder	231.2–232.5	12.38 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.26 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.17 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.84 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 3.09 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 3.04 (m, 4H), 1.98 (m, 2H), 1.14 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 6H).	178.7, 160.8, 142.8, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 109.9, 49.1, 46.2, 37.1, 23.2, 9.9.	334.170 2
4f	87	Yellow powder	225.8–226.5	12.42 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.15 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.77 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 3.66 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 4H), 2.74 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 4H), 2.69 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.57 (m, 2H).	178.7, 160.8, 142.7, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 110.0, 64.7, 56.6, 56.0, 52.2, 24.4, 21.7.	362.165 1
4g	84	Yellow powder	217.3–218.9	12.42 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.70 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.14 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.76 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 3.43 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 3.02 (m, 1H), 2.87 (m, 2H), 1.67 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 1.11 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 3H).	178.6, 160.7, 142.7, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.3, 110.0, 56.4, 56.0, 51.6, 50.4, 48.5, 31.8, 24.5, 23.71, 21.4, 18.5.	374.201 5
4h	64	Yellow powder	297.5–298.5	12.42 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.71 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.21 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.16 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.77 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 2.73 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 2.64 (m, 4H), 1.66 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.01 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H).	178.7, 160.7, 142.7, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 110.0, 51.1, 48.5, 46.33, 38.8, 24.5, 10.1.	347.178 0
5a	77	Yellow powder	216.1–217.9	12.43 (s, 1H), 7.54 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.16 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.03 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 3.94 (s, 2H, S-CH ₂), 3.82 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 3.51 (t, <i>J</i> = 4.6 Hz, 4H), 2.55 (t, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 2.45 (t, <i>J</i> = 4.8 Hz, 4H).	184.3, 175.1, 157.2, 143.7, 143.5, 132.0, 122.3, 120.8, 120.1, 109.4, 66.0, 54.9, 53.1, 36.4, 33.4.	372.112 5
5b	70	Yellow powder	265.0–266.3	11.52 (s, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.44 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.25 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H), 7.10 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H), 4.02 (s, 2H, S-CH ₂), 3.96 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 3.26 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 3.12 (m, 1H), 2.93 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.17 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 3H).	186.2, 178.7, 160.9, 142.5, 131.1, 131.0, 122.9, 120.7, 119.5, 110.1, 56.3, 50.6, 50.4, 48.9, 35.1, 31.8, 24.3, 22.2, 17.2.	384.148 9
5c	76	Yellow powder	210.5–211.4	12.44 (s, 1H), 7.54 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.42 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.07 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 3.93 (s, 2H, S-CH ₂), 3.74 (t, <i>J</i> = 6.7 Hz, 2H), 3.49 (t, <i>J</i> = 4.7 Hz, 4H), 2.34 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 2.30 (t, <i>J</i> = 4.9 Hz, 4H), 1.76 (m, 2H).	186.8, 178.7, 160.9, 142.8, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 109.9, 64.7, 54.5, 52.2, 37.1, 27.4, 22.6.	386.128 7
5d	72	Yellow powder	200.2–203.0	12.42 (s, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 1H), 7.40 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.06 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 3.91 (s, 2H, S-CH ₂), 3.70 (t, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 3.55 (t, <i>J</i> = 4.1 Hz, 4H), 2.37 (t, <i>J</i> = 4.3 Hz, 4H), 2.33 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.46 (m, 2H).	187.5, 178.7, 160.7, 142.7, 131.2, 131.1, 122.8, 120.7, 119.4, 110.0, 64.7, 56.5, 52.2, 38.8, 24.4, 21.7, 18.5.	402.160 0

15.2 和 12.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 化合物 **4b**、**4d**、**5b** 对 HeLa 细胞表现出较好的抑制活性, IC_{50} 值分别为 8.1、14.7 和 12.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 化合物 **4f** 对 L-929 细胞体现出一定程度的毒性, 其 IC_{50} 值为 11.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 遗憾的是目标化合物对 RBL-2H3 细胞的抑制活性都比较差。目标化合物中 **5b** 对 MCF-7 细胞抑制活性最好, 其 IC_{50} 为 12.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与阳性对照相当。它对棕榈酰基转移酶高表达的癌细胞具有较好的活性, 因此具有成为棕榈酰基转移酶抑制剂先导化合物的潜质。

Table 2 Anti-proliferative activity of compounds **4a-4h** and **5a-5d**

Compd.	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	HeLa	MGC-803	MCF-7	RBL-2H3	L-929
4a	38.7 ± 1.4	49.6 ± 8.6	82.6 ± 1.9	54.2 ± 1.2	39.7 ± 2.0
4b	8.1 ± 2.0	47.6 ± 5.1	24.5 ± 4.6	58.5 ± 7.8	53.2 ± 5.9
4c	22.6 ± 1.3	62.7 ± 2.4	41.3 ± 5.2	47.2 ± 1.1	46.4 ± 3.2
4d	14.7 ± 5.2	39.4 ± 3.4	28.0 ± 1.2	31.4 ± 5.6	61.6 ± 2.4
4e	49.6 ± 1.1	50.9 ± 1.0	35.6 ± 3.4	39.9 ± 5.1	82.1 ± 2.1
4f	72.3 ± 1.3	50.7 ± 8.7	45.5 ± 1.2	69.3 ± 7.2	11.5 ± 1.1
4g	44.0 ± 2.2	76.7 ± 1.2	81.4 ± 5.9	59.2 ± 8.1	54.6 ± 4.2
4h	83.7 ± 1.9	63.1 ± 9.4	67.2 ± 2.6	81.6 ± 3.4	45.0 ± 1.1
5a	33.0 ± 4.0	49.9 ± 6.6	15.2 ± 3.6	51.6 ± 7.2	39.7 ± 6.3
5b	12.6 ± 2.9	16.4 ± 1.8	12.0 ± 1.3	36.8 ± 1.9	74.4 ± 1.6
5c	43.4 ± 1.6	44.7 ± 6.7	44.9 ± 5.0	70.9 ± 1.5	79.2 ± 1.2
5d	82.4 ± 1.9	62.6 ± 1.0	81.3 ± 1.9	82.3 ± 3.0	47.4 ± 1.7
Cisplatin	40.1 ± 4.1	66.6 ± 6.8	8.4 ± 2.0	49.8 ± 6.7	52.0 ± 8.7

3.2 AO/EB 染色实验 本实验选择化合物 **5b** 来评估它对 MCF-7 癌细胞的影响, 如图 5 所示。由图可知, 在 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物 **5b** 能明显引起视野内 MCF-7 癌细胞的减少, 一定程度上促进其凋亡, 且化合物 **5b** 的对 MCF-7 细胞的 IC_{50} 为 12.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其结果与抗增殖活性结果一致。

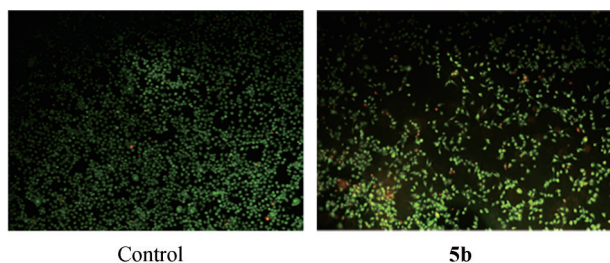


Figure 5 AO/EB staining experiment of compound **5b**

3.3 划痕实验 在抗增殖活性实验中, 化合物 **5b** 表现出较好的抗癌活性, 故本实验选择化合物 **5b** 来评估其对 MCF-7 癌细胞迁移的影响, 如图 6 所示。与阴性对照相比, 化合物 **5b** 在 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能明显抑制 MCF-7 癌细胞的迁移, 并且相同浓度下化合物 **5b** 对 MCF-7 细胞的抑制作用比顺铂效果好, 与实验预期的结果一致。

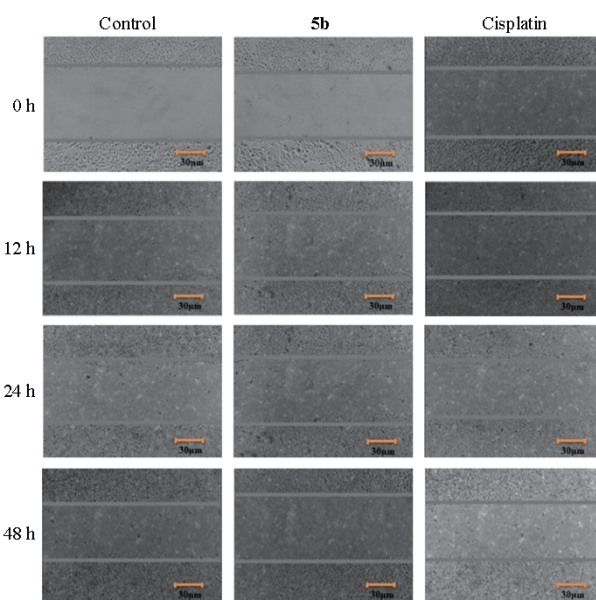


Figure 6 Inhibition of migration of MCF-7 with control, compound **5b** and cisplatin

4 分子对接实验

目标化合物的分子对接结果如表 3、图 7 所示。由表中数据可知, 化合物均能进入 PAP 活性口袋内, 并且能与周围氨基酸残基产生相互作用力。从图 7 可知, 化合物 **4b** 靛红结构上的羰基、侧链取代基上的两个氨基都可与氨基酸残基 Ser143 形成氢键, 将其线性结构进一步改造成环时, 化合物 **5b** 母核结构上的羰基保持着与氨基酸残基 Ser143 的氢键作用, 并且其噻唑烷酮结构上的硫原子可与氨基酸残基 His141 形成氢键, 羰基可与 Lys135 形成氢键。与化合物 **4b** 相比, 化合物 **5b** 与 6BML 的相互作用和 PAP 与 6BML 的相互作用 (PAP 与氨基酸残基 His141、Lys135、Ser143 等形成氢键) 更加吻合, 这可能是化合物 **5b** 对 MCF-7 细胞的抗增殖活性强于化合物 **4b** 的原因。

5 小结

基于化合物 V 的化学结构, 利用生物电子等排体原理, 结合分子对接技术设计合成了 12 个靛红衍生物类棕榈酰基转移酶抑制剂, 测定了其体外抗肿瘤活性并进行了分子对接研究。采用 MTT 法对该类化合物进行抗肿瘤活性测试, 结果表明, 大部分化合物具有中等的抗肿瘤活性, 其中化合物 **5b** 对 MCF-7 的 IC_{50} 值小于 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 和顺铂抑制活性相当。细胞划痕实验表明, 在 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 化合物 **5b** 能明显抑制 MCF-7 癌细胞的迁移。AO/EB 染色实验表明, 化合物 **5b** 的浓度为 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能显著引起 MCF-7 癌细胞的凋亡。分子对接结果表明, 化合物均能完全进入 PAP 活性口袋内, 且生物活性结果越好的化合物, 其作用方式与配

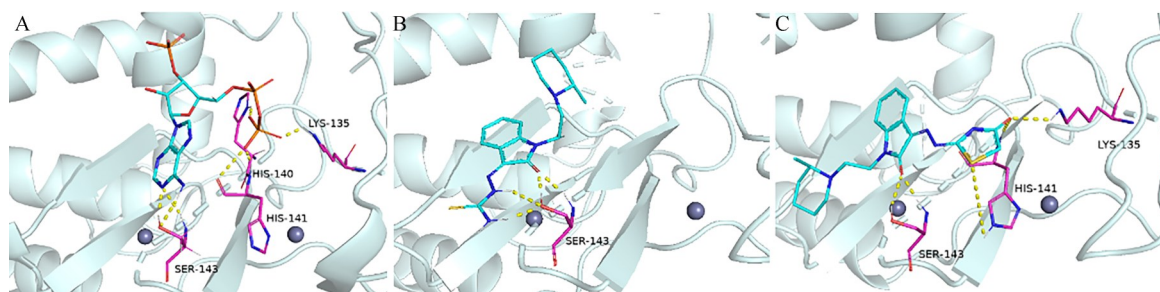


Figure 7 The results of molecular docking (PDB ID: 6BML). A: PAP; B: **4b**; C: **5b**

Table 3 Molecular docking of compounds **4a–4h** and **5a–5d**

Compd.	H-Bonds interaction	p- π conjugation
4a	Ser143; His155	–
4b	Ser143	–
4c	Ser143; His155	–
4d	Ser143; Arg246	–
4e	Ser143; His141	–
4f	Ser143; His154; His155	–
4g	Ser143; His154	–
4h	His155; His141	–
5a	Lys130; His140	Lys135
5b	Ser143; His141; Lys135	–
5c	Lys130; Lys135; Ser143	–
5d	Ser143; His155	–
PAP	His141; His140; Ser143; Lys135	–

体 PAP 与棕榈酰基转移酶的相互作用方式越吻合, 这为后续研究设计更高效的棕榈酰基转移酶抑制剂提供了思路。

实验部分

SGW X-4 显微熔点仪 (上海精密仪器科技有限公司, 未校正); Bruker AVIII-600 MHz 核磁共振波谱仪 (Bruker); QEXACTIVE 高分辨质谱分析仪 (Thermo Fisher Scientific); LDZX-30KBS 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); W-CJ-ZDF 型超净台 (上海贺德实验设备厂); 其他试剂和溶剂未经特别说明均为国产或进口分析纯与生物级, 无水试剂均按常规方法处理。

1 化合物合成

1.1 N-(2-溴乙基) 靛红 (2) 向 250 mL 圆底烧瓶中加入 7.36 g (50 mmol) 化合物 **1**, 用 50 mL 的 *N,N*-二甲基甲酰胺溶解后, 加入 8.29 g (60 mmol) K_2CO_3 , 室温搅拌 10 min, 再加入 60 mmol 1,2-二溴乙烷 (1,3-二溴丙烷或 1,4-二溴丁烷), 室温反应, TLC 监测反应进程^[12]。反应完全后向反应液里倒入 100 mL 水, 静置过夜, 析出沉淀, 抽滤得粗品。粗品用 200 目硅胶色谱 [*V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚) = 1:5] 纯化得化合物 **2**。收率 54%~75%。

1.2 N-(4-吗啉乙基) 靛红 (3) 将 5 mmol 化合物 **2**、6 mmol Na_2CO_3 和 6 mmol 二级胺置于 50 mL 圆底烧瓶

中, 加入 10 mL 无水乙腈, 室温反应, TLC 监测反应进程^[13]。反应完全后抽滤除去固体, 滤液减压蒸馏, 除去溶剂得粗品。粗品用 200 目硅胶色谱 [*V*(乙酸乙酯):*V*(石油醚) = 1:2] 纯化得化合物 **3**。产率 60%~65%。

1.3 N-(4-吗啉乙基) 靛红-3-缩氨基硫脲 (4a) 将 1 mmol 化合物 **3**、1 mmol 氨基硫脲置于 25 mL 圆底烧瓶中, 加入 5 mL 无水乙醇溶解, 搅拌下滴加 5 滴冰醋酸, 滴加完毕后升温至 80 °C 反应, TLC 监测反应进程。反应完全后趁热过滤, 热乙醇洗涤, 得粗品。粗品用 200 目硅胶色谱 [*V*(二氯甲烷):*V*(甲醇) = 100:1] 纯化得化合物 **4a**。化合物 **4b**~**4h** 参照此法合成, 收率 60%~90%。

1.4 2-(N-(4-吗啉乙基) 靛红-3-二甲氨基胍) 噻唑烷-4-酮 (5a) 向 25 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 mmol 化合物 **4**、0.5 mmol 无水乙酸钠、5 mL 甲醇, 搅拌下滴加 0.6 mmol 溴乙酸乙酯, 室温反应, TLC 监测反应进程, 反应结束后将反应体系倒入冰水中, 二氯甲烷萃取 3 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥后回收溶剂, 经 200 目硅胶色谱 [*V*(二氯甲烷):*V*(甲醇) = 100:1] 纯化得化合物 **5a**。化合物 **5b**~**5d** 参照此法合成, 收率 60%~80%。

2 化合物活性评价

2.1 体外抗增殖活性 采用 MTT 法进行体外抗增殖活性研究^[14,15]。选取人胃癌细胞 (MGC-803)、人宫颈癌细胞 (HeLa)、人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和 大鼠嗜碱性白血细胞 (RBL-2H3) 4 种肿瘤细胞进行抗肿瘤活性实验和小鼠成纤维细胞 (L-929) 对目标化合物进行细胞毒性实验。将细胞悬液 (每毫升 4×10^4 个) 接种到 96 孔板中, 每孔 90 μ L。在 37 °C、 CO_2 相对浓度为 5%、相对湿度为 95% 的培养箱中培养, 当显微镜观察到细胞单层铺满 96 孔板底部时, 每孔加入 10 μ L 的不同浓度的化合物。将 96 孔板放置于培养箱中, 显微镜观察细胞形态, 培养 48 h 后, 每孔加入 10 μ L 浓度为 5 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 的 PBS 溶液 (现配现用, 避光), 继续培养 4 h。4 h 后, 弃掉 96 孔板内的培养基, 每孔加入 100 μ L 的 DMSO 后, 置于摇床轻摇 20 min 使结晶充分溶解。待结晶溶解, 把 96 孔板放置在酶标仪上, 设置波长为 490 nm, 测

定吸光度, 重复测定4次。使用软件GraphPad Prism 8.3计算每个化合物的IC₅₀值。

2.2 AO/EB 染色实验 将细胞悬液接种到12孔板中, 每孔900 μL。将12孔板置于CO₂恒温培养箱中, 37 °C、CO₂相对浓度为5%、相对湿度为95%的条件下培养细胞。12 h后每孔加入100 μL不同浓度的化合物, 孵育48 h。弃掉上层培养基, PBS清洗细胞2次, 使用1×Buffer重悬细胞。避光, 加入等量混合均匀的AO/EB染色液, 轻轻混合均匀后室温孵育5 min, 使用荧光倒置显微镜观察拍照^[16]。

2.3 划痕实验 将6孔板置于CO₂恒温培养箱中, 37 °C、CO₂相对浓度为5%、相对湿度为95%的条件下培养细胞。直至观察细胞密度达到90%左右后。事先用Marker笔在6孔板底部均匀的划3条平行直线, 用200 μL枪头在与标记线垂直的地方划3条平行线, 划后除去培养基, 用PBS清洗3次, 加入无血清培养基和药物(空白组加入DMSO)。将其放入37 °C、CO₂相对浓度为5%、相对湿度为95%的培养箱中, 按0、12、24、48 h观察结果并拍照。

3 分子对接研究

分子对接使用Maestro 11.9版本的Schrödinger Suite软件。选取DHHC20晶体结构(Protein Data Bank, ID: 6BML)作为受体, 与目标化合物进行分子对接研究。首先利用Schrödinger Suite软件中的LigPrep模块对目标化合物进行准备优化; 然后, 利用Schrödinger Suite软件中的Protein Preparation Wizard模块对受体蛋白进行能量优化、修复丢失的氨基酸残基和loop区、加氢、删除水分子; 再利用Schrödinger Suite软件中的Glide模块进行受体格点设置; 最后, 利用Glide模块中的Ligand Docking工具进行Glide-XP模式的分子对接。选取打分值最高的构象用PyMol软件(<http://www.pymol.org/>)进行作图^[17]。

作者贡献: 余伟、董金娇、朱昕悦、宋亚丽负责化合物的设计合成、活性研究及稿件撰写与修改, 杨侃、刘振明和乔晓强参与化合物的合成及分子对接分析。

利益冲突: 本文作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Pakravan P, Kashanian S, Khodaei MM, et al. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65: 313-335.
- [2] Vine KL, Matesic L, Locke JM, et al. Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008 [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009, 9: 397-414.
- [3] Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P. Sunitinib maleate [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 279-280.
- [4] Fares M, Eldehna WM, Abou-Seri SM, et al. Design, synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of novel isatin-quinazoline hybrids [J]. *Archiv Der Pharm*, 2015, 348: 144-154.
- [5] Solomon VR, Hu C, Lee H. Hybrid pharmacophore design and synthesis of isatin-benzothiazole analogs for their anti-breast cancer activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 7585-7592.
- [6] Eldehna WM, Altoukhy A, Mahrous H, et al. Design, synthesis and QSAR study of certain isatin-pyridine hybrids as potential anti-proliferative agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 90: 684-694.
- [7] Wang J, Zhu CY, Guo JY, et al. Research progress on antitumor activity of isatin derivatives [J]. *Guangdong Chem Ind (广东化工)*, 2015, 42: 106-113.
- [8] Wu PF, Zhang NN, Zhang YJ, et al. Research progress of palmitoylation of protein in cancer [J]. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报)*, 2020, 42: 2059-2065.
- [9] Ducker CE, Griffel LK, Smith RA, et al. Discovery and characterization of inhibitors of human palmitoyl acyltransferases [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1647-1659.
- [10] Jennings BC, Nadolski MJ, Ling Y, et al. 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation *in vitro* [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50: 233-242.
- [11] Rana MS, Kumar P, Lee CJ, et al. Fatty acyl recognition and transfer by an integral membrane S-acyltransferase [J]. *Science*, 2018, 359: eaao6326.
- [12] Gao F, Ye L, Wang YB, et al. Benzofuran-isatin hybrids and their *in vitro* anti-mycobacterial activities against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 183: 111678-111684.
- [13] Kim JC, Lim YG, Min BT, et al. Preparation of N'-substituted anilino-N-methyl-N-nitrosoureas as candidate antitumor agents [J]. *Arch Pharmacol Res*, 1994, 17: 420-423.
- [14] Zhang HL, Jiang YL. Design, synthesis and antitumor activity of 3-arylbzylidene-fluoroquinoline-4-one derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2170-2175.
- [15] Huang T, Lai HF, Lin RK, et al. Synthesis and antitumor activity of PI3K inhibitors based on quinoxaline as parent nucleus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 96-105.
- [16] Liu K, Liu PC, Liu R, et al. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in osteosarcoma cells compared with flow cytometry [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 15-20.
- [17] Dong JJ, Zhu XY, Feng SR, et al. Synthesis and antifungal activity of 7-phenyl-6H, 7H-1, 3, 4-thiadiazole [3, 2-a]-thiolenoleno [4, 3-d] pyrimidine compounds [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2021, 41: 2467-2475.