·实验研究·

香兰素衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性

包　亚[1,2,3],焦民茹[2,3],李建其[2,3],张庆伟[2,3]

(1 上海工程技术大学化学化工学院,上海 201620;2 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院化学制药新技术中心,上海 201203;3 上海药物合成工艺过程工程技术研究中心,上海 201203)

[**摘要**] **目的**:设计合成系列香兰素衍生物,并测试化合物体外抗 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)增殖活性。**方法**:以香草素衍生物 SBE-13 为先导,采用电子等排、骨架迁越等方法引入 2-氯喹啉片段设计新结构类型化合物。以 2-氯-3-氯甲基喹啉与香兰素为原料,经醚化、还原胺化合成目标化合物 **4a**~**4k**。**结果**:共合成 11 个未见文献报道的香兰素衍生物,结构经 ^{1}H-NMR 和 MS 确证,体外抗 HeLa 细胞增殖活性实验显示大部分化合物具有较好的抗肿瘤细胞增殖活性,其中化合物 **4b** 的活性相比 SBE-13 提高 10 倍。**结论**:香兰素衍生物 4b 具有较好的抗 HeLa 细胞增殖活性,值得进一步深入研究。

[**关键词**] 香兰素;衍生物;抗肿瘤;合成

[**中图分类号**] R914.5　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003-3734(2021)11-1017-05

Design, synthesis and antitumor activity of vanillin derivatives

BAO Ya[1,2,3], JIAO Min-ru[2,3], LI Jian-qi[2,3], ZHANG Qing-wei[2,3]

(1 *School of Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering and Technology, Shanghai* 201620, *China*; 2 *Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai* 201203, *China*; 3 *Shanghai Engineering Research Center of Pharmaceutical Process, Shanghai* 201203, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To design and synthesize novel vanillin derivatives and evaluate their anti-proliferation effect against HeLa cells. **Methods**: Taking vanillin derivative SBE-13 as lead, 2-chloroquinoline fragment were introduced into the new compounds by the methods of electronic isosteric and skeleton transition. 2-Chloro-3-chloromethylquinoline and vanillin were used as raw materials to obtain the target compounds **4a**~**4k** by etherification and reductive amination. **Results**: A total of 11 novel vanillin derivatives were designed and synthesized, and their structures were confirmed by ^{1}H NMR and ESI-MS. Most of the compounds exhibited good antiproliferative activities against HeLa cells. Notably, compound **4b** potently inhibited HeLa cells with an IC_{50} = 9.79 μmol·L^{-1}, a 10-fold improvement over SBE-13 (IC_{50} = 78.30 μmol·L^{-1}). **Conclusion**: Compound **4b** displayed significant antiproliferative effect *in vitro*, which is worthy of further study.

[**Key words**] vanillin; derivatives; antitumor; synthesis

在天然产物中寻找新型抗肿瘤活性成分是抗癌药物发现的重要途径,已批准上市的小分子抗肿瘤新药中与天然产物相关的药物占 70% 以上[1]。迄今为止,已有多个天然小分子抗肿瘤药物成功上市,并成为相应领域的明星治疗药物,如紫杉醇、长春新碱和鬼臼毒素等[2-4]。然而,天然产物活性成分多存在抗肿瘤活性不高、理化性质不稳定等缺点,往往

[**基金项目**] 上海市科技创新行动计划资助项目(17431903900)

[**作者简介**] 包亚,女,硕士研究生,主要从事抗肿瘤新化合物设计与合成研究。联系电话:(021)20572000-5060,E-mail:baoyaar@163.com。

[**通讯作者**] 张庆伟,男,副研究员,主要从事抗肿瘤、中枢神经新药设计与合成研究。联系电话:(021)20572000-5061,E-mail:sip-iqingwei@163.com。

需对其结构进行进一步修饰或优化,才能最终获得安全、有效、质量可控的抗肿瘤新药。

香兰素(又名香草醛,化学名为 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛)是天然香草的主要成分,为目前全球使用最多的食品赋香剂之一[5],还可用作植物生长促进剂、杀菌剂、润滑油消泡剂等[6-7],同时是合成药物和其他香料的重要中间体[8]。有研究表明香兰素可通过影响细胞氧化还原和 DNA 修复途径发挥抗肿瘤活性[9-10]。

Keppner 课题组经虚拟筛选发现香兰素衍生物 SBE-13 对 Hela 肿瘤细胞具有一定抗增殖活性,EC_{50} 为 18 μmol·L^{-1},可使细胞周期停滞于 G_2/M 期,诱导肿瘤细胞凋亡[11]。为进一步提高 SBE-13 抗肿瘤细胞增殖活性,我们以 SBE-13 为先导结构,保持母核 A 片段不变,采用电子等排、骨架迁越手段,以抗肿瘤活性片段 2-氯喹啉[12]替换其 B 片段中 2-氯吡啶,同时对 C 片段进行结构改造,设计合成香兰素衍生物 11 个,测试化合物体外抗 Hela 细胞(人宫颈癌细胞)增殖活性,讨论初步构效关系,期望获得体外抗肿瘤活性更优的香兰素衍生物。

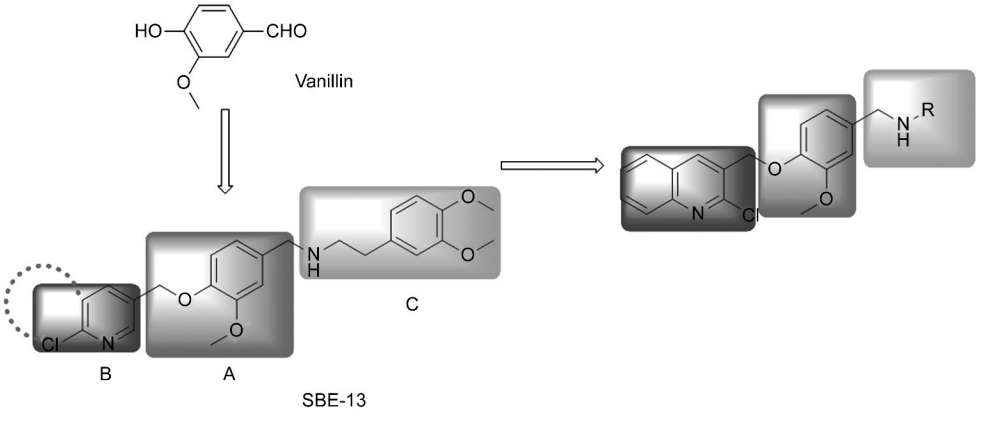


图 1 目标化合物的设计

采用图 2 所示路线,以 2-氯-3-氯甲基喹啉和香兰素为原料,经醚化、还原胺化反应制备目标化合物 **4a ~ 4k**。

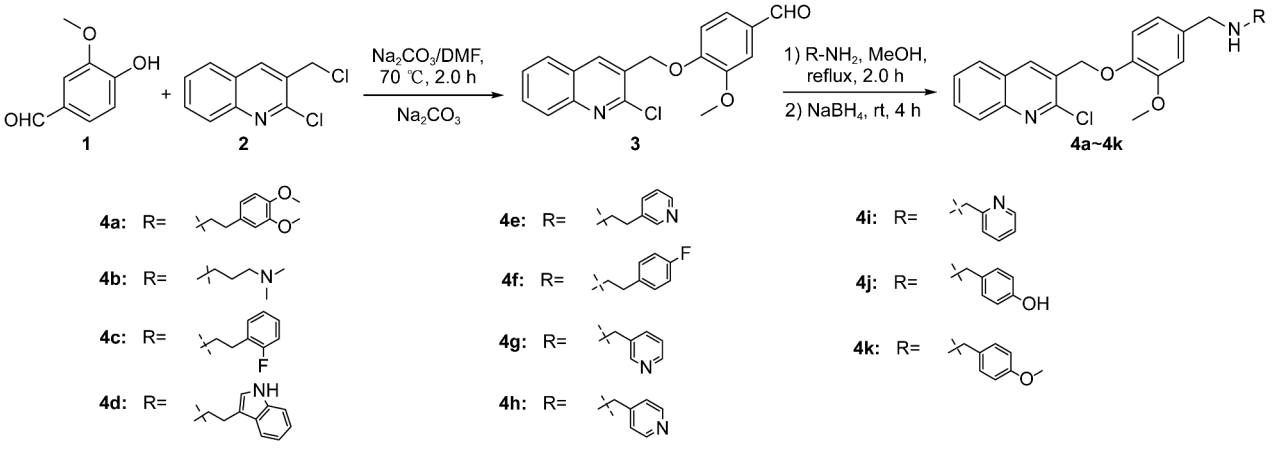


图 2 新化合物合成路线

材　　料

1　试药和试剂

合成所用试剂均为市售分析纯或化学纯,未经纯化直接使用。体外活性测试所用的 Hela 细胞来自中科院细胞生物研究所。原料 4-羟基-3-甲氧基苯甲醛(麦克林公司,纯度:98%);2-氯-3-氯甲基喹啉(安耐吉公司,纯度:98%);取代氨基等均为市售

试剂,纯度为 97% ~99%。

2 仪器

VarianINOVA－600 型核磁共振仪(TMS 内标,美国瓦里安公司);温度控制仪 ZNHW 型(上海予华仪器有限公司);WRS－2C 熔点仪(上海精密科学仪器有限公司,温度未经校正);Finnign－MAT212 型质谱仪(美国赛默飞世尔公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);硅胶 HSGF254 薄层层析预制板(烟台芝罘黄务硅胶开发试验厂);倒置相差显微镜(Metrio 公司)。

方法与结果

1 4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苯甲醛(中间体 3)的合成

2-氯-3-氯甲基喹啉(4.7 g,30.89 mmol)、香草醛(6.55 g,30.89 mmol)和 Na_2CO_3(9.86 g,92.67 mmol)溶于 DMF 100 mL 中,70 ℃反应 2.0 h。反应完全后,过滤,乙醇洗涤滤饼,浓缩滤液,残留物中缓慢加入 200 mL 水,析出固体,过滤,乙醚重结晶,得灰白色中间体 **3**,收率 79.2%,mp:197.2 ~ 199.1 ℃,ESI-MS(*m/z*):328.10[M + H]$^+$。

2 目标化合物 4a ~4k 的合成

2.1 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-2-(3,4-二甲氧基苯基)乙-1-胺(4a)的合成 取中间体 **3**(1.8 g,5.49 mmol)、3,4-二甲氧基-苯乙基胺(1 g,5.49 mmol)溶于 20 mL 甲醇中,回流反应 2 h 后自然降至室温,缓慢加入 $NaBH_4$(0.23 g,6.04 mmol),室温反应过夜,浓缩,缓慢加入水 50 mL,析出固体,过滤,水洗涤滤饼,异丙醇重结晶得白色固体 **4a**,收率:91.0%,mp:211.4 ~212.8 ℃。ESI-MS(*m/z*):493.19[M + H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm:8.56(s,1H),8.08(d,*J* = 8.0 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* =8.4 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H),6.99(d,*J* = 1.6 Hz,1H),6.83(d,*J* = 8.0 Hz, 2H),6.80(d,*J* = 1.6 Hz,1H),6.70(dd,*J* = 8.0 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.71 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 3.66 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.71 ~2.64 (m, 4H), 1.92 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H)。

2.2 N^1-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-N^3,N^3-二甲基丙烷-1,3-二胺(4b)的合成 白色固体,收率:91.4%,mp:176.2 ~178.4 ℃。ESI-MS(*m/z*):414.25[M + H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 8.59(s,1H),8.09(d,*J* = 8.0 Hz, 1H),8.00(d,*J* = 8.4 Hz,1H),7.86(t, *J* = 7.2 Hz, 1H),7.70(t,*J* =7.6 Hz,1H),7.47(s,1H),7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.31 (s, 2H),4.08(s,2H),3.85(s,3H),3.18(s,2H), 2.99(s,2H),2.74(s,6H),2.51(s,2H),2.19 ~ 2.12(m,2H)。

2.3 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3 甲氧基苄基)-2-(2-氟苯基)乙-1-胺(4c)的合成 白色固体,收率:93.7%,mp:217.0 ~218.7 ℃。ESI-MS(*m/z*):451.22[M + H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 8.56(s,1H),8.08(d,*J* = 8.0 Hz,1H), 8.00 (d, *J* =8.4 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.32 ~7.21 (m, 2H), 7.14 ~7.09 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.66 (s, 2H),2.73(dt,*J* = 23.6 Hz,6.4 Hz,4H), 2.51 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 2.11 (s, 1H)。

2.4 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-2-(1*H*-吲哚-3-基)乙-1-胺(4d) 白色固体,收率:88.6%,mp: >250 ℃。ESI-MS(*m/z*):471.54[M + H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 10.78(s,1H),8.55(s,1H),8.06(d,*J* = 8.0 Hz, 1H),7.99(d,*J* = 8.4 Hz,1H),7.84(t,*J* = 7.2 Hz, 1H),7.67(t,*J* = 7.6 Hz,1H),7.50(d,*J* = 8.0 Hz, 1H),7.33(d,*J* = 8.0 Hz,1H),7.13(d,*J* = 8.4 Hz, 1H),7.04(q,*J* = 7.2 Hz,3H),6.95(t,*J* = 7.2 Hz, 1H),6.83(d,*J* =7.6 Hz,1H), 5.24 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 2.84 (dt, *J* = 25.2 Hz, 6.4 Hz, 4H), 1.96 (s, 1H)。

2.5 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-2-(吡啶-3-基)乙-1-胺(4e)的合成 白色固体,收率:92.4%,mp:232.1 ~233.3 ℃。ESI-MS(*m/z*):433.62[M + H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm: 8.56(s,1H),8.44(d,*J* = 1.6 Hz,1H),8.39 (dd,*J* =4.8 Hz,1.2 Hz,1H),8.07(d,*J* = 8.0 Hz, 1H),7.99(d,*J* = 8.4 Hz,1H),7.84(t,*J* = 6.8 Hz, 1H),7.68(t,*J* = 7.6 Hz,1H),7.63(d,*J* = 7.6 Hz, 1H),7.29(q,*J* = 4.8 Hz,1H),7.03(d,*J* = 8.4 Hz, 1H),6.98(d,*J* = 1.2 Hz,1H),6.81(dd,*J* = 8.0 Hz, 0.8 Hz,1H),5.25(s,2H),3.76(s,3H),3.66(s, 2H), 2.73 (s, 4H), 2.18 (s, 1H)。

2.6 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-2-(4-氟苯基)乙-1-胺(4f)的合成 白色固体，收率：95.7%，mp：183.3～185.7 ℃。ESI-MS(*m/z*)：451.10[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.56(s,1H)，8.08(d,*J*=7.6 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.85(t,*J*=8.0 Hz,1H)，7.68(t,*J*=7.2 Hz,1H)，7.25～7.22(m,2H)，7.10～6.98(m,4H)，6.81(dd,*J*=8.0 Hz,1.6 Hz,1H)，5.25(s,2H)，3.77(s,3H)，3.65(s,2H)，2.70(s,4H)，2.01(s,1H)。

2.7 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-1-(吡啶-3-基)甲胺(4g)的合成 白色固体，收率：92.8%，mp：222.2～223.4 ℃。ESI-MS(*m/z*)：419.63[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.57(s,1H)，8.52(d,*J*=1.6 Hz,1H)，8.44(dd,*J*=4.8 Hz,1.6 Hz,1H)，8.09(d,*J*=7.6 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.85(t,*J*=6.8 Hz,1H)，7.75(d,*J*=7.6 Hz,1H)，7.69(t,*J*=6.8 Hz,1H)，7.34(q,*J*=4.8 Hz,1H)，7.05(d,*J*=8.4 Hz,2H)，6.85(dd,*J*=8.0 Hz,1.6 Hz,1H)，5.26(s,2H)，3.80(s,3H)，3.69(s,2H)，3.63(s,2H)，2.70(s,1H)。

2.8 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-1-(吡啶-4-基)甲胺(4h)的合成 白色固体，收率：89.7%，mp：199.0～201.5 ℃。ESI-MS(*m/z*)：419.63[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.57(s,1H)，8.49(d,*J*=5.6 Hz,2H)，8.08(d,*J*=8.0 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.85(t,*J*=6.8 Hz,1H)，7.69(t,*J*=7.2 Hz,1H)，7.36(d,*J*=5.6 Hz,2H)，7.05(d,*J*=8.0 Hz,2H)，6.85(dd,*J*=8.0 Hz,1.2 Hz,1H)，5.26(s,2H)，3.80(s,3H)，3.69(s,2H)，3.63(s,2H)，2.77(s,1H)。

2.9 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-1-(吡啶-2-基)甲胺(4i)的合成 白色固体，收率：84.4%，mp：>250 ℃。ESI-MS(*m/z*)：419.62[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.58(s,1H)，8.48(d,*J*=5.8 Hz,2H)，8.09(d,*J*=8.2 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.86(t,*J*=6.8 Hz,1H)，7.68(t,*J*=7.6 Hz,1H)，7.37(d,*J*=5.6 Hz,2H)，7.05(d,*J*=8.0 Hz,2H)，6.86(dd,*J*=8.0 Hz,1.2 Hz,1H)，5.26(s,2H)，3.80(s,3H)，3.69(s,2H)，3.63(s,2H)，2.71(s,1H)。

2.10 4-((4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)氨基甲基)苯酚(4g)的合成 白色固体，收率：81.2%，mp：209.8 ℃～210.7 ℃。ESI-MS(*m/z*)：434.72[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.57(s,1H)，8.34(d,*J*=5.4 Hz,2H)，8.07(d,*J*=7.6 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.85(t,*J*=6.6 Hz,1H)，7.68(t,*J*=7.6 Hz,1H)，7.35(d,*J*=5.6 Hz,2H)，7.05(d,*J*=8.4 Hz,2H)，6.87(dd,*J*=8.0 Hz,1.2 Hz,1H)，6.46(s,1H)，5.26(s,2H)，3.80(s,3H)，3.69(s,2H)，3.63(s,2H)，2.74(s,1H)。

2.11 *N*-(4-((2-氯喹啉-3-基)甲氧基)-3-甲氧基苄基)-1-(4-甲氧基苯基)甲胺(4k)的合成 白色固体，收率：93.6%，mp：186.5～188.0 ℃。ESI-MS(*m/z*)：449.21[M+H]$^+$。^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm：8.57(s,1H)，8.08(d,*J*=8.0 Hz,1H)，7.99(d,*J*=8.4 Hz,1H)，7.85(t,*J*=6.8 Hz,1H)，7.69(t,*J*=8.0 Hz,1H)，7.24(d,*J*=8.8 Hz,2H)，7.06～7.03(m,2H)，6.87(d,*J*=8.4 Hz,2H)，6.83(dd,*J*=8.4 Hz,1.6 Hz,1H)，5.26(s,2H)，3.79(s,3H)，3.73(s,3H)，3.59(s,4H)，2.46(s,1H)。

3 化合物体外抗 Hela 细胞增殖活性

采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法[13]测定 11 个化合物对 Hela 细胞的抗增殖活性，以 SBE-13 为阳性对照，实验结果如表 1 所示。

表 1 化合物抗 Hela 细胞增殖活性

化合物	IC_{50}/μmol·L^{-1}	化合物	IC_{50}/μmol·L^{-1}
SBE-13	78.30	4f	20.37
4a	9.79	4g	59.76
4b	7.50	4h	42.97
4c	20.32	4i	64.21
4d	14.28	4j	13.57
4e	29.82	4k	25.85

讨 论

本文共设计合成 11 个含 2-氯喹啉结构的香兰素衍生物，化合物结构均经^{1}H-NMR 和 ESI-MS 确证，纯度均>95%(HPLC 面积归一化法)。体外对 Hela 肿瘤细胞抗增殖活性测试结果显示：11 个目标化合物抗肿瘤细胞增殖活性均优于阳性对照化合物 SBE-13；引入 2-氯喹啉基团后，化合物抗肿瘤细胞增殖活性明显提高，如 **4a** > SBE-13；取代基 R 片段

中含有芳环时，吲哚活性 > 苯环 > 吡啶，如 **4d** > **4c**（或 **4f**）> **4e**，其中含苯环结构时 F 取代位置对化合物活性没有显著影响（**4c**≈**4f**），含吡啶结构时，对位活性 > 间位 > 邻位（**4h** > **4g** > **4i**），且吡啶环与 NH 之间距离 2 个碳原子活性 > 1 个碳原子（**4e** > **4g**）；R 取代基中引入羟基、氨基、甲氧基等给电子基团时，活性较高，如 **4a**，**4b** 和 **4j**，其中化合物 **4b** 的抗增殖活性相比 SBE-13 提高 10 倍，其抗肿瘤作用机制及作用靶点值得进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770 - 803.

[2] HUANG GC, CHEN LB. Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(8): 1201 - 1211.

[3] ALLEN TM, NEWMAN MS, WOODLE MC, *et al*. Pharmacokinetics and anti-tumor activity of vincristine encapsulated in sterically stabilized liposomes[J]. *Int J Cancer*, 1995, 62(2): 199 - 204.

[4] IMBERT TF. Discovery of podophyllotoxins[J]. *Biochimie*, 1998, 80(3): 207 - 222.

[5] 杨文文，吴秋林，唐鸿志，等. “香料皇后”：天然香兰素生物合成的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 1087 - 1095.

[6] BEZERRA CF, CAMILO CJ, DO NASCIMENTO SILVA MK, *et al*. Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria[J]. *Microb Pathog*, 2017, 113: 265 - 268.

[7] SUN J, LI M, WANG X, *et al*. Vanillin derivatives as the selective small molecule inhibitors of FtsZ[J]. *Mel Chem Res*, 2014, 23(6): 2985 - 2994.

[8] FACHE M, DARROMAN E, BESSE V, *et al*. Vanillin, a promising biobased building-block for monomer synthesis[J]. *Green Chem*, 2014, 16(4): 1987 - 1998.

[9] BURRI J, GRAF M, LAMBELET P, *et al*. Vanillin: More than a flavouring agent: a potent antioxidant[J]. *J Sci Food Agric*, 1989, 48(1): 49 - 56.

[10] BEZERRA DP, SOARES AKN, DE SOUSA DP. Overview of the role of vanillin on redox status and cancer development[J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1 - 9.

[11] CARRASCO-GOMEZ R, KEPPNER-WITTER S, HIEKE M, *et al*. Vanillin-derived antiproliferative compounds influence Plk1 activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(21): 5063 - 5069.

[12] RAMESH V, ANANDA RAO B, SHARMA P, *et al*. Synthesis and biological evaluation of new rhodanine analogues bearing 2-chloroquinoline and benzo[h]quinoline scaffolds as anticancer agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 83: 569 - 580.

[13] MA J, GUAN R, SHEN H, *et al*. Comparison of anticancer activity between lactoferrin nanoliposome and lactoferrin in Caco-2 cells *in vitro*[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 72 - 77.

编辑：刘卓越/接受日期：2020 - 07 - 07