

新型三氟甲氧查尔酮类衍生物的设计合成及体外抗宫颈癌活性研究

阿力米拉·阿布都卡地尔, 玉苏普瓦吉木·阿力木江, 阿合买提江·吐尔逊*, 木合布力·阿布力孜*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 以天然甘草查尔酮母核为先导化合物骨架,设计、合成三氟甲氧基查尔酮类衍生物,并对其进行体外抗宫颈癌活性研究。方法 通过 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应,合成全新三氟甲氧基查尔酮类衍生物,结构经¹H-NMR、¹³C-NMR 及 HR-ESI-MS 进行确证。四唑盐(MTT)法测定目标化合物对 HeLa、SiHa、C-33A 三种宫颈癌细胞及正常宫颈上皮永生 H8 细胞的毒性,并做构效关系分析,选定候选化合物。Transwell 法和流式细胞仪技术测定候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞的侵袭迁移,促凋亡及对细胞周期的影响;分子对接法将候选化合物与鼠双微粒 2(MDM2) 蛋白靶点进行分子对接,测定化合物 **3o** 与靶蛋白分子的结合能力及结合特点;Western blot 法测定候选化合物 **3o** 对 MDM2 和 p53 蛋白的调控作用。结果 合成 20 个全新三氟甲氧基查尔酮类目标化合物,候选化合物 **3o** 对宫颈癌细胞的毒性最强($IC_{50} = 4.60 \pm 0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),明显优于阳性药顺铂($IC_{50} = 17.16 \pm 0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);候选化合物 **3o** 可有效抑制 HeLa 细胞的侵袭迁移,对 HeLa 细胞有显著的促凋亡作用并让细胞周期停留在 G₀/G₁ 期;候选化合物 **3o** 与 MDM2 蛋白 p53 结合口袋的关键氨基酸有效结合(结合能 $-37.62 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$);候选化合物 **3o** 对 MDM2 蛋白有明显下调作用,对 p53 蛋白有明显上调作用。结论 本研究结果为筛选有效低毒的新型靶向查尔酮类抗肿瘤候选药物提供一定实验基础。

关键词:查尔酮类衍生物;MDM2-p53;子宫颈癌;抗肿瘤活性

doi:10.11669/cpj.2024.11.004 中图分类号:R284 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)11-0974-10

Design Synthesis and *in Vitro* Anti-cervical Cancer Activity of New Trifluoromethoxy Chalcone Derivatives

ALIMILA Abudukadier, YUSUPUWAJIMU Alimujiang, AHEMAITIJIANG Tuerxun*, MOURBOUL Ablise*
(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesize trifluoromethoxy chalcone derivatives based on the natural licorice chalcone parent as the lead compound backbone, and to study their anti-cervical cancer activity *in vitro*. **METHODS** New trifluoromethoxy chalcone derivatives were synthesized by Claisen-Schmidt aldol condensation. The structures were confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and HR-ESI-MS. The cytotoxic activity of the target compounds on cervical cancer cell lines HeLa, SiHa, C-33A and normal cervical epithelial immortalized H8 cells were determined by MTT assay, and the structure activity relationship (SAR) was analyzed and the candidate compounds were selected. The effects of candidate compound **3o** on invasion, migration, apoptosis and cell cycle of HeLa cells were determined by Transwell and flow cytometry. The candidate compound **3o** was docked to the MDM2 and protein target by molecular docking method, and the binding ability and binding characteristics of the compound to the target protein molecules were determined. The regulatory effects of the candidate compounds on MDM2 and p53 proteins were assessed using Western Blot analysis. **RESULTS** Twenty new trifluoromethoxy chalcones were synthesized. Candidate compound **3o** showed the strongest inhibitory activity against cervical cancer cells ($IC_{50} = 4.60 \pm 0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), which was significantly better than that of positive drug cisplatin ($IC_{50} = 17.16 \pm 0.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The candidate compound **3o** could effectively inhibit the invasion and migration of HeLa cells, induce apoptosis and arrest the cell cycle at G₀/G₁ phase. Candidate compound **3o** binds to key amino acids in p53 binding pocket of MDM2 protein (binding energy $-37.62 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). The compounds significantly downregulated MDM2 protein expression while upregulating p53 protein levels. **CONCLUSION** The research results provide experimental evidence for screening new chalcone derivatives as targeted, effective, and low-toxicity anti-tumor candidates against cervical cancer.

KEY WORDS: chalcone derivatives; MDM2-p53; cervical cancer; antitumor activity

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81960625);新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目资助(XJDX1713)

作者简介:阿力米拉·阿布都卡地尔,女,硕士研究生 研究方向:药物分析 * **通讯作者:**阿合买提江·吐尔逊,男,硕士生导师
研究方向:药物分析 Tel:(0991)6280980;木合布力·阿布力孜,男,教授,博士生导师 研究方向:天然药活性成分的药用研究
Tel:(0991)2110355

宫颈癌是妇科肿瘤,其发病率和死亡率均较高^[1]。目前化疗仍然是治疗宫颈癌的一个重要手段。然而化疗药物的毒性及癌症的复发和耐药问题仍为临床上的疑难问题^[2]。开发新型抗肿瘤药物及新的抗肿瘤靶点具有重要的意义。

p53 是肿瘤抑制因子,参与调节细胞周期和细胞凋亡,当细胞发生突变或损伤时,p53 蛋白迅速大量聚集,清除突变细胞,保护机体,是肿瘤出现及生长的主要调控蛋白之一^[3-5]。鼠双微粒体 2(murine double minute 2, MDM2)蛋白是 p53 基因的负调控因子,MDM2 通过不断地泛素化 p53 蛋白使其形成 MDM2-p53 复合物,从而使 p53 失去促凋亡活性,形成相互影响的自动调节反馈回路^[6-9]。若能阻断 MDM2-p53 蛋白之间的相互作用,下调 MDM2 基因的表达,减少复合物形成,则可以使 p53 从 MDM2 上游离出来,恢复和激活 p53 的抑癌功能,这是通过促进癌细胞凋亡来增强抗癌作用的一种重要途径^[10-12]。

天然植物中的查尔酮(chalcone,图 1)化学名为 1,3-二苯基-2-丙烯-1-酮,是一类抗癌谱较广的天然活性物质,因分子具有较大的可塑性,能与不同靶点结合^[13-14]。研究显示,某些查尔酮类化合物能与 MDM2 结合,竞争性抑制 MDM2 与 p53 的结合,从而激活 p53 的抑癌功能^[15-17]。然而植物中的查尔酮含量极低,富集制备成本高,活性较弱,限制了其研究和开发应用。有学者通过 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成了查尔酮类衍生物^[18],并在骨架结构中引入不同官能团,不仅能降低制备成本,还能提高其抗肿瘤活性。

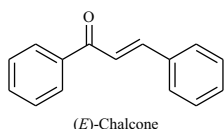


图 1 查尔酮母核结构
Fig. 1 Chalcone structure

本课题组在前期研究中,对查尔酮骨架通过氯代、甲氧基化、 α -甲基化及引入杂环等途径得到抗肿瘤活性较高的抗肿瘤化合物^[19-21]。查尔酮结构上引入含有 N、O、F 等元素的官能团可提高其与靶点形成氢键的能力,增强抗癌活性潜力^[22-23]。

本研究在前期结构修饰经验基础上,以 MDM2-p53 靶点作为靶标蛋白,通过分子对接技术设计并用 Claisen-Schmidt 反应合成了 20 个全新三氟甲氧基查尔酮类化合物;以三种宫颈癌细胞做体外药理

实验模型,筛选出对宫颈癌具有显著细胞毒性、促进凋亡、抑制肿瘤迁移侵袭特点的候选药物,并用 H8 正常细胞模型初步评估细胞毒性;对候选化合物与 MDM2 进行分子对接,测定与靶蛋白的结合能力及结合特点,通过 Western blot 法测定了对 MDM2 和 p53 调控作用,进一步验证候选化合物可通过结合 MDM2,抑制 MDM2-p53 复合物形成发挥抗癌作用。

1 实验方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 药品与试剂 顺铂对照品(美国 AbMole 公司);胎牛血清(美国 Sigma 公司)、胰酶、DMEM 培养基(美国 HyClone 公司)、抗体(Affinity Biosciences 公司)。人宫颈癌细胞 HeLa、SiHa、C-33A、人宫颈上皮永生细胞 H8,均由新疆医科大学中心实验室惠赠。

1.1.2 仪器 WRX-4 型显微熔点仪(宁波科诚仪器有限公司);LTQ-Orbitrap XL 型赛默飞组合式高分辨质谱仪,37°C 5% CO₂ 培养箱,Her-safe KS18II 级生物安全柜(美国 Thermo Fisher 公司);ZF-7 型暗箱三用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);SOPTOP 型倒置显微镜(宁波舜宇仪器公司);Victor nivo 多功能酶标仪(珀金埃尔默有限公司);BD 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 合成实验

在反应瓶中加入 5 mmol 化合物 1,5 mmol 化合物 2,加入 20 mL 无水乙醇(或 20 mL 甲醇)超声使其完全溶解,加入 1.25 g 氢氧化钾固体(或 1 g 氢氧化钠固体),搅拌,室温反应。硅胶薄层板检测过程和结果,反应完成后,有固体吸出过滤,收集滤饼,滤液用稀盐酸调节 pH 值至 1.0~2.0,冰箱过夜,析出沉淀收集,若没有固体析出,油状物和溶液层分开,油状物挥干后用少量无水乙醇加热重结晶,放入冰箱析晶,抽滤,收集晶体得到化合物 3a。化合物 3b~3t 的合成与 3a 类似,见图 2。

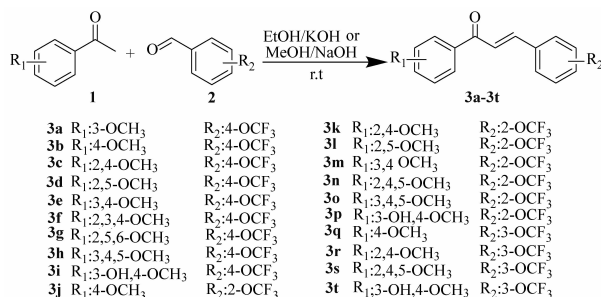


图 2 三氟甲氧基查尔酮衍生物 3a~3t 的合成路线
Fig. 2 The synthetic route to target compounds 3a~3t

1.3 化合物的抗癌活性

1.3.1 MTT 检测 以顺铂作为阳性对照,采用 MTT 法测定目标化合物 **3a** ~ **3t** 对 HeLa、SiHa、C-33A 以及 H8 细胞的毒性。分别将处于对数生长期的细胞以每孔 7 000 个细胞接种在 96 孔板上。在 37 °C 体积浓度 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 12 h 后,弃去培养基,将不同浓度(0、6.25、12.5、25、50、100 μmol · L⁻¹)的化合物加入 96 孔板中,每个浓度设 6 个复孔。药物干预 48 h 后,每孔加 5 mg · mL⁻¹ 的 MTT 溶液 20 μL,在 37 °C,体积浓度 5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 4 h,移除培养基和 MTT,每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶液以溶解甲臞,振荡均匀。使用多功能酶标仪在 490 nm 波长下测量吸收度。通过吸收度计算出细胞毒性。化合物活性以对 50% 细胞有毒性所需的浓度 IC₅₀ 表达。实验结果为 3 次实验平均值。

1.3.2 Transwell 迁移侵袭实验 取对数生长期的 HeLa 细胞,制成每毫升 2 × 10⁵ 个的细胞悬液,分别给予阳性药顺铂(20 μmol · L⁻¹),空白、低、中、高浓度(0、1、2、4 μmol · L⁻¹)的候选化合物 **3o** 干预细胞活动,每个浓度设置 3 个平行组。分别取上述给药后的细胞悬液 200 μL 加入到 Transwell 小室上层,下层中加入含 20% 胎牛血清的培养基 600 μL。将小室置于培养箱中培养 24h,上室用 PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,1% 结晶紫染色 30 min,晾干,于倒置显微镜下观察穿过基底膜的细胞数。每个样本计数 3 个视野,取平均值作为检测结果。实验重复 3 次。侵袭实验:Transwell 上室先用 50 μL 基质胶(体积比为 1:8)铺胶,将小室置于培养箱中,烘干,后续实验步骤同细胞迁移实验。

1.3.3 细胞凋亡实验 使用 6 孔板进行铺板,将细胞密度配制为每毫升 1 × 10⁶ 细胞悬液,每孔 2 mL,置入 37 °C 的 CO₂ 培养箱,24 h 后,弃上清液,每孔加入 2 mL 候选化合物 **3o** 的培养液,浓度依次为 2.5、5、10 μmol · L⁻¹,每个浓度设 3 个复孔。以只含细胞及完全培养基作为空白对照,以 20 μmol · L⁻¹ 的顺铂为阳性对照,培养 24 h 后收集,离心,磷酸缓冲液(PBS)洗涤,再次收集细胞。用碘化丙啶(PI)、带有荧光探针标记的膜联蛋白(Annexin V-FITC)各 5 μL 避光染色 20 min,尼龙布过滤,上流式细胞仪进行检测,实验重复三次。

1.3.4 细胞周期阻滞实验 每毫升 1 × 10⁶ 个的细胞悬液,以每孔 2 mL 接种到 6 孔板中,置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱,24 h 后弃上清液,每孔加入 2 mL 不同

浓度的候选化合物 **3o** 溶液,浓度依次为 2.5、5、7.5 μmol · L⁻¹,每个浓度设 3 个复孔。以只含细胞及完全培养基作为空白对照,以 20 μmol · L⁻¹ 的顺铂为阳性对照,培养 24 h 后收集,离心,PBS 洗,再次收集细胞后加入 75% 乙醇,在 -20 °C 下固定 24 h,再次离心,PBS 洗涤,收集细胞后,每管各加入 400 μL 的碘化丙啶/RNA 酶染色液(PI/RNase Staining Buffer),室温避光染色 20 min,尼龙布过滤,上流式细胞仪进行检测,实验重复 3 次。

1.4 分子对接研究

将候选化合物先用 ChemBio-Draw Ultra 14.0 软件画出三维结构,应用 Autodock Tools 1.5.6 软件进行加氢,计算并分配电荷,以候选化合物为配体,与 MDM2 蛋白(PDB 编号:5TRF)进行对接,用 pymol 2.3.0 和 discovery studios 进行作用力分析,初步推测候选化合物和 MDM2 结合模式。

1.5 Western blot 实验

1.5.1 蛋白样品的准备 用 6 cm 培养皿培养细胞,细胞养至培养皿 80% 用于干预,空白、低、中、高浓度(0、1、2、4 μmol · L⁻¹)的候选化合物和阳性药(4 μmol · L⁻¹)各 4 mL,24 h 后,每孔均匀加入 350 μL 的可溶性蛋白(RIPA)[裂解液 1 mL RIPA + 10 μL 苯甲基磺酰氟(PMSF)],冰上裂解 30 min 反复吹打,然后至 1.5 mL EP 管中,低温离心 20min(12 000 r · min⁻¹),取上清液立即采用 BCA 蛋白定量法对蛋白浓度进行测定。蛋白样品和 loading buffer 按说明书推荐比例配制成 2 μg · μL⁻¹ 的混合液,100 °C 条件下加热 10 min,冷却后,置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.5.2 蛋白样品上样 在电泳槽内加入一定体积的电泳缓冲液,用微量加样器将 2 μL 蛋白 Marker 加入对照孔内,然后依次加不同组的蛋白溶液,上样量为 20 μg 每孔。电压调至 80 V,电泳 30 min,再用 120 V 电泳 90 min,至溴酚蓝到达凝胶底部即可终止电泳。敷上甲醇中活化的大小与凝胶相符的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜制成三明治,电压调至最大 300 V 后,恒流 300 mA 的条件下转膜 120 min。结束后 PVDF 膜常温下用 5% 牛奶[2 g 奶粉 + 40 mL 三乙醇胺缓冲盐水溶液(TBST)]摇床封闭 2 h。弃去牛奶,加入 TBST 溶液冲洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜放置到孵育盒中,加入一抗稀释液(1:2 000),在 4 °C 摇床上孵育过夜。隔天,冲洗 PVDF 膜三次,每次 10 min,加入二抗稀释液(1:1 000),摇床孵育 1 h,冲洗 PVDF 膜 3 次,每次

10 min。在整片 PVDF 膜上均匀涂抹 A、B 溶液以 1:1 比例混匀的增强性化学发光试剂(ECL)显影液,采用凝胶成像仪曝光和采图,实验重复三次。

1.6 统计学方法

图片分析应用 Image 1.53 软件,数据分析应用 Graphpad prism 8.0.1 软件,组间比较用单因素方差分析,后用多重假设检验,分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,将 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。

2 实验结果

2.1 目标化合物合成结果

2.1.1 化合物的合成 用取代苯乙酮和不同位三氟甲氧基苯甲醛进行 Claisen-Schmidt 羟醛缩合得到 20 个全新三氟甲氧基查尔酮。化合物的结构 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 及 HR-ESI-MS 法确证,表征结果如下:

2.1.2 结构表征 化合物 **3a**:淡黄色固体,产率:32.7%,熔点:64.7 ~ 65.6 °C, HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{O}_3 + (\text{M} + \text{H}) + 323.0890$, found 323.0890。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.77 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, β -H), 7.69 ~ 7.63 (m, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.59 (dt, $J = 7.5, 1.28$ Hz, 1H, C_5 -H), 7.54 (dd, $J = 2.7, 1.60$ Hz, 1H, α -H), 7.48 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, C_6 -H), 7.41 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, C_2 -H), 7.28 ~ 7.23 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 7.14 (ddd, $J = 8.2, 2.7, 0.9$ Hz, 1H, C_4 -H), 3.88 (s, 3H, C_3 -OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 189.85, 159.98, 150.56, 142.94, 139.36, 133.50(2C), 129.88, 129.65, 122.86, 121.25, 121.19, 121.05, 119.54, 119.47, 112.91, 55.48。

化合物 **3b**:淡黄色固体,产率:80.6%,熔点:89.1 ~ 89.7 °C; HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{O}_3 + (\text{M} + \text{H}) + 323.0890$, found 323.0886。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.07 ~ 8.01 (m, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.76 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, β -H), 7.69 ~ 7.63 (m, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.52 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, α -H), 7.28 ~ 7.23 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 7.01-6.96 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 3.89 (s, 3H, C_4 -OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 188.30, 163.60, 150.40, 142.08, 133.73(2C), 130.85, 129.76(2C), 122.67, 121.26, 121.17, 119.54(2C), 113.93(2C), 55.50。

化合物 **3c**:淡黄色固体,产率:4.3%,熔点:98.6 ~ 99.1 °C; HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{O}_4 + (\text{M} + \text{H}) + 353.0995$, found 353.0993。 $^1\text{H-NMR}$

(600 MHz, CDCl_3) δ : 7.78 (dd, $J = 8.8, 3.8$ Hz, 1H, C_6 -H), 7.64 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, β -H), 7.64 ~ 7.59 (m, 2H, C_2 -H, C_3 -H), 7.51 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, α -H), 7.25 ~ 7.21 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 7.02 ~ 6.95 (m, 1H, C_3 -H), 6.57 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, C_5 -H), 3.91 (s, 3H, C_2 -OCH₃), 3.87 (s, 3H, C_4 -OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 190.01, 164.46, 160.56, 150.14, 147.32, 134.22 (2C), 129.65, 129.17, 128.04, 121.98, 119.57, 117.87(2C), 105.40, 55.79, 55.78。

化合物 **3d**:亮黄色晶体,产率:24%,熔点:55.6 ~ 56.3 °C; HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{O}_4 + (\text{M} + \text{H}) + 353.0995$, found 353.0992。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.63 (d, $J = 6.69$ Hz, 1H, β -H), 7.61 (d, $J = 2.30$ Hz, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.41 (d, $J = 15.92$ Hz, 1H, α -H), 7.28 ~ 7.22 (m, 2H, C_3 -H, C_4 -H), 7.21 (d, $J = 3.21$ Hz, 1H, C_6 -H), 6.08 ~ 6.92 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 3.87 (s, 3H, C_2 -OCH₃), 3.81 (s, 3H, C_5 -OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 191.92, 153.69, 152.73, 150.34, 141.10, 133.84 (2C), 129.79, 129.37, 127.68, 121.25, 121.14, 119.54 (2C), 114.46, 113.41, 56.48, 55.86。

化合物 **3e**:淡黄色固体,产率:15.2%,熔点:73.4 ~ 74.1 °C; HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{O}_4 + (\text{M} + \text{H}) + 353.0995$, found 353.0995。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.77 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, β -H), 7.70 ~ 7.68 (m, 1H, C_6 -H), 7.68 ~ 7.64 (m, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.62 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, α -H), 7.53 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, C_2 -H), 7.26 (dt, $J = 7.7, 1.08$ Hz, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 6.93 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C_5 -H), 3.97 (d, $J = 1.6$ Hz, 6H, C_3 -OCH₃, C_4 -OCH₃)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ : 188.18, 153.46, 150.40, 149.34, 142.08, 133.71 (2C), 131.09, 129.76, 123.10, 122.45, 121.24, 121.17, 119.53(2C), 110.75, 110.00, 56.10, 56.04。

化合物 **3f**:淡黄色固体,产率:46.4%,熔点:77.9 ~ 78.4 °C; HRMS (ESI) m/z : $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{O}_5 + (\text{M} + \text{H}) + 383.1101$, found 383.1101。 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.66 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, β -H), 7.64 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, C_6 -H), 7.64 (s, 1H, α -H), 7.54 ~ 7.47 (m, 2H, C_2 -H, C_6 -H), 7.27 ~ 7.22 (m, 2H, C_3 -H, C_5 -H), 6.77 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, C_5 -

H), 3.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 9H, C₂-OCH₃, C₃-OCH₃, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 190.35, 157.31, 153.89, 150.29, 142.17, 140.89, 133.89 (2C), 129.73, 127.40, 126.51, 125.95, 121.24, 119.54(2C), 107.45, 62.11, 61.06, 56.13。

化合物 **3g**: 亮黄色固体, 产率: 48.6%, 熔点: 88.1 ~ 89.2 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₉H₁₈F₃O₅ + (M + H) + 383.110 1, found 383.110 1。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.68 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, β -H), 7.64 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, C₂'-H, C₆'-H), 7.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, α -H), 7.40 (s, 1H, C₆-H), 7.26 ~ 7.21 (m, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 6.55 (s, 1H, C₃-H), 3.97 (s, 3H, C₂-OCH₃), 3.94 (s, 3H, C₅-OCH₃), 3.90 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 189.36, 155.03, 153.89, 150.09, 143.48, 139.84, 134.26 (2C), 129.62, 128.04, 121.12, 120.14, 119.55(2C), 113.16, 96.95, 56.75, 56.32, 56.15。

化合物 **3h**: 淡黄色固体, 产率: 32.2%, 熔点: 99.9 ~ 101.3 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₉H₁₈F₃O₅ + (M + H) + 383.110 1, found 383.110 2。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.79 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, β -H), 7.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, C₂'-H, C₆'-H), 7.46 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, C₂-H, C₆-H, C₃'-H, C₅'-H), 3.95 (s, 9H, C₃-OCH₃, C₄-OCH₃, C₅-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 188.84, 153.21 (2C), 150.55, 142.85, 142.72, 133.53, (2C) 133.24, 129.87, 122.54, 121.21, 119.53 (2C), 106.15 (2C), 61.00, 56.41 (2C)。

化合物 **3i**: 亮黄色固体, 产率: 62.1%, 熔点: 127.4 ~ 128.2 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₇H₁₄F₃O₄ + (M + H) + 339.083 9, found 339.083 9。¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) δ : 9.46 (s, 1H, C₃-OH), 8.06 ~ 8.00 (m, 2H, β -H, C₆-H), 7.96 ~ 7.76 (m, 2H, C₂'-HC₆'-H), 7.71 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, α -H), 7.57 (d, $J = 2.17$ Hz, 1H, C₂-H), 7.47 ~ 7.42 (m, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 1HC₅-H), 3.90 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, d₆-DMSO) δ : 187.84, 152.89, 149.85, 147.15, 141.49, 134.70 (2C), 131.11, 131.05, 123.75, 122.40, 121.71, 121.34, 119.64(2C), 115.33, 56.21。

化合物 **3j**: 淡黄色固体, 产率: 60.9%, 熔点:

88.3 ~ 89.7 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₇H₁₄F₃O₃ + (M + H) + 323.0890, found 323.088 6。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.06-8.01 (m, 2H, C₂-H, C₆-H), 8.03 ~ 7.95 (m, 1H, β -H), 7.77 (dd, $J = 7.8$, 1.67 Hz, 1H, C₆'-H), 7.58 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, α -H), 7.43 (ddd, $J = 8.2$, 7.39, 1.67 Hz, 1H, C₄'-H), 7.37 ~ 7.29 (m, 2H, C₃-H, C₅-H), 7.01 ~ 6.96 (m, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 3.88 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 188.47, 163.62, 147.90, 136.66, 131.20, 130.93 (2C), 130.79, 128.54, 128.51, 127.13, 124.98, 121.43, 121.40, 119.69, 113.93, 55.50。

化合物 **3k**: 淡黄色固体, 产率: 17.9%, 熔点: 62.9 ~ 63.1 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₈H₁₆F₃O₄ + (M + H) + 353.099 5, found 353.099 1。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.87 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, β -H), 7.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, C₆-H), 7.72 (dd, $J = 7.8$, 1.73 Hz, 1H, C₆'-H), 7.58 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, α -H), 7.39 (td, $J = 7.8$, 1.7 Hz, 1H, C₄'-H), 7.35 ~ 7.27 (m, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 6.57 (dd, $J = 8.6$, 2.27 Hz, 1H, C₅-H), 6.49 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, C₃-H), 3.88 (d, $J = 16.5$ Hz, 6H, C₂-OCH₃, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 190.07, 164.45, 160.57, 147.86, 134.60, 133.10, 130.78, 130.02, 128.91, 127.03, 123.13, 121.41, 121.32, 119.70, 117.99, 105.34, 55.68, 55.56。

化合物 **3l**: 亮黄色固体, 产率: 9.0%, 熔点: 50.2 ~ 51.2 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₈H₁₆F₃O₄ + (M + H) + 353.099 5, found 353.099 5。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 7.86 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, β -H), 7.73 (dd, $J = 7.8$, 1.72 Hz, 1H, C₆'-H), 7.48 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, α -H), 7.41 (td, $J = 7.8$, 1.7 Hz, 1H, C₆-H), 7.36 ~ 7.27 (m, 2H, C₃-H, C₄-H), 7.21 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, C₄'-H), 7.04 (dd, $J = 9.0$, 3.22 Hz, 1HC₃'-H), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, C₅-H), 3.85 (s, 3H, C₂-OCH₃), 3.81 (s, 3H, C₅-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ : 192.05, 153.66, 152.75, 147.90, 135.74, 131.11, 129.58, 129.19, 128.61, 128.49, 127.11, 121.37, 119.65 (2C), 114.46, 113.30, 56.33, 55.84。

化合物 **3m**: 淡黄色固体, 产率: 66.9%, 熔点: 89.2 ~ 90.1 °C; HRMS (ESI) m/z : C₁₈H₁₆F₃O₄ + (M + H) + 353.099 5, found 353.099 6。¹H-NMR

(600 MHz, CDCl₃) δ: 7.98 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, β-H), 7.77 (dd, *J* = 7.8, 1.72 Hz, 1H, C₆-H), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 2.01 Hz, 1H, C₆'-H), 7.63 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, α-H), 7.60 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, C₂-H), 7.43 (td, *J* = 7.8, 1.65 Hz, 1H, C₄'-H), 7.38 ~ 7.30 (m, 2H, C₃'-HC₅'-H), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, C₅-H), 3.97 (s, 6H, C₃-OCH₃, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 188.42, 153.47, 149.30, 147.90, 136.74, 131.20, 130.98, 128.69, 128.51, 123.21, 123.11, 121.42, 119.68, 117.97, 110.82, 110.05, 56.10, 56.00。

化合物 **3n**: 亮黄色固体, 产率: 49.4%, 熔点: 77.8 ~ 78.3 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₉H₁₈F₃O₅ + (M + H) + 383.110 08, found 383.110 1。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.90 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, β-H), 7.74 (dd, *J* = 7.8, 1.77 Hz, 1H, C₆'-H), 7.70 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, α-H), 7.41 (s, 1H, C₆-H), 7.40 (td, *J* = 7.7, 1.70 Hz, 1H, C₄'-H), 7.36 ~ 7.28 (m, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 6.54 (s, 1H, C₃-H), 3.97 (s, 3H, C₂-OCH₃), 3.91 (d, *J* = 14.1 Hz, 6H, C₄-OCH₃, C₅-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 189.44, 155.07, 153.90, 147.88, 143.43, 134.51, 130.77, 130.01, 128.95, 127.03, 121.33, 120.03, 119.70, 117.99, 113.20, 96.88, 56.63, 56.30, 56.14。

化合物 **3o**: 淡黄色固体, 产率: 14.9%, 熔点: 72.6 ~ 74.1 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₉H₁₈F₃O₅ + (M + H) + 383.110 1, found 383.110 1。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, β-H), 7.76 (dd, *J* = 7.8, 1.68 Hz, 1H, C₆'-H), 7.56 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, α-H), 7.48 ~ 7.42 (m, 1H, C₄'-H), 7.40 ~ 7.31 (m, 2H, C₂-H, C₆-H), 7.29 (s, 2H, C₃'-H, C₅'-H), 3.95 (s, 9H, C₃-OCH₃, C₄-OCH₃, C₅-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 189.13, 153.20, 147.93 (2C), 142.67, 137.55, 133.08, 131.37, 129.14, 128.28, 127.19, 125.09, 121.41, 119.68, 106.15(2C), 60.98, 56.29(2C)。

化合物 **3p**: 亮黄色固体, 产率: 9.42%, 熔点: 95.1 ~ 96.3 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₇H₁₄F₃O₄ + (M + H) + 339.083 9, found 339.083 9。¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) δ: 9.53 (s, 1H, C₃-OH), 8.30 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H, β-H), 8.02 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, C₆-H), 7.84 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, C₆'-H),

7.80 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H, α-H), 7.61 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.7 Hz, 1H, C₄'-H), 7.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, C₂-H), 7.56 ~ 7.50 (m, 1H, C₃'-H), 7.49 (dt, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, C₅'-H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, C₅-H), 3.91 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, d₆-DMSO) δ: 187.57, 153.08, 147.37, 147.23, 134.50, 132.48, 130.81, 128.48, 125.47, 123.16, 122.53, 121.46, 119.75, 118.05, 115.32, 111.67, 56.23。

化合物 **3q**: 淡黄色固体, 产率: 12.7%, 熔点: 69.8 ~ 70.4 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₇H₁₄F₃O₃ + (M + H) 323.089 0, found 323.088 8。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8.07 ~ 8.01 (m, 2H, C₂-H, C₆-H), 7.75 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β-H), 7.56 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, α-H), 7.54 ~ 7.52 (m, 1H, C₅'-H), 7.47 (dd, *J* = 2.3, 1.2 Hz, 1H, C₆'-H), 7.44 (t, *J* = 7.95 Hz, 1H, C₂-H), 7.28 ~ 7.22 (m, 1H, C₄'-H), 7.02 ~ 6.96 (m, 2H, C₃-H, C₅-H), 3.89 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 188.20, 163.67, 149.71, 142.01, 137.25, 130.91 (2C), 130.77, 126.84, 123.41, 122.38, 121.32, 120.22 (2C), 119.61, 113.95, 55.51。

化合物 **3r**: 淡黄色固体, 产率: 61.7%, 熔点: 81.3 ~ 82.3 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₈H₁₆F₃O₄ + (M + H) + 353.099 5, found 353.099 3。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, C₆-H), 7.63 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, β-H), 7.55 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, α-H), 7.50 (dt, *J* = 7.8, 1.36 Hz, 1H, C₅'-H), 7.45 ~ 7.41 (m, 1H, C₆'-H), 7.41 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, C₂-H), 7.21 (ddt, *J* = 8.1, 2.3, 1.1 Hz, 1H, C₄'-H), 6.57 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H, C₅-H), 6.50 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, C₃-H), 3.91 (s, 3H, C₂-OCH₃), 3.87 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 189.79, 164.55, 160.63, 149.66, 139.77, 137.73, 133.09, 130.22, 128.77, 126.74, 121.94, 121.33, 120.01, 119.62, 105.42, 98.61, 55.73, 55.57。

化合物 **3s**: 亮黄色固体, 产率: 5.6%, 熔点: 77.4 ~ 78.1 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₉H₁₈F₃O₅ + (M + H) + 383.110 1, found 383.110 0。¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.66 (s, 2H, β-H, C₅'-H), 7.51 (dt, *J* = 7.7, 1.27 Hz, 1H, α-H), 7.45 (dt, *J* = 2.4, 1.2 Hz, 1H, C₆-H), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, C₆'-H),

7.41 (s, 1H, C₂-H), 7.22 (ddt, *J* = 8.2, 2.2, 1.1 Hz, 1H, C_{4'}-H), 6.56 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, C₃-H), 3.96 (d, *J* = 17.7 Hz, 6H, C₂-OCH₃, C₅-OCH₃), 3.90 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 189.20, 155.14, 154.02, 153.51, 143.49, 142.62, 137.79, 130.22, 128.81, 121.93, 120.41, 119.62, 118.52, 117.91, 113.13, 96.88, 56.33, 56.15, 55.81。

化合物 **3t**: 亮黄色固体, 产率: 18.9%, 熔点: 95.5 ~ 96.4 °C; HRMS (ESI) *m/z*: C₁₇H₁₄F₃O₄ + (M + H) + 339.0839, found 339.0839。¹H-NMR (600 MHz, d₆-DMSO) δ: 9.50 (s, 1H, C₃-OH), 8.04 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, β-H), 8.00 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, C₆-H), 7.92 (dt, *J* = 7.9, 1.19 Hz, 1H, α-H), 7.84 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H, C_{5'}-H), 7.74 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, C₆-H), 7.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, C₂-H), 7.60 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, C₂-H), 7.44 (ddt, *J* = 8.2, 2.3, 1.2 Hz, 1H, C₅-H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, C_{4'}-H), 3.92 (s, 3H, C₄-OCH₃)。¹³C-NMR (151 MHz, d₆-DMSO) δ: 187.82, 152.95, 149.34, 147.16, 141.85, 137.89, 130.99, 130.73, 123.12, 122.82, 122.52, 121.41, 119.72, 118.02, 111.60, 56.19。

2.2 化合物的抗癌活性

2.2.1 三氟甲氧基查尔酮衍生物对宫颈癌细胞和正常细胞的毒性 以 HeLa, SiHa, C-33A 三种宫颈癌细胞和正常宫颈 H8 细胞作受试细胞, 对 20 个化合物的抗宫颈癌活性进行初步筛选, 顺铂作阳性对照, 结果见表 1。实验结果表明, 与阳性药相比, 目标化合物 **3o** 对 HeLa 细胞的毒性最强, ($IC_{50} = 4.60 \pm 0.40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对正常细胞毒性低。

2.2.2 构效关系分析 通过查尔酮衍生物抑制宫颈癌细胞增殖作用的初步分析中发现, 查尔酮骨架中 A、B 环上取代基的位置和数量特征对化合物的生物活性影响较大。本研究合成的化合物均为 A 环上有甲氧基、B 环有三氟甲氧基的衍生物, 氧基的位置和数量对 HeLa 细胞增殖的抑制活性有明显差别。

活性比较中发现, 随着环上甲氧基的数量增多, 活性有增强的趋势, 即: 三甲氧基 > 二甲氧基 > 单甲氧基。B 环不同部位取代的三氟甲氧基与活性的关系中发现, 对宫颈癌细胞增殖的抑制活性从强到弱依次为 2'-OCF₃ > 3'-OCF₃ > 4'-OCF₃。如候选化合物 **3o** 的活性最强, 其 $IC_{50} = (4.60 \pm 0.40) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 三氟甲氧基查尔酮衍生物对宫颈癌细胞和正常细胞的毒性. $n = 3, \bar{x} \pm s$

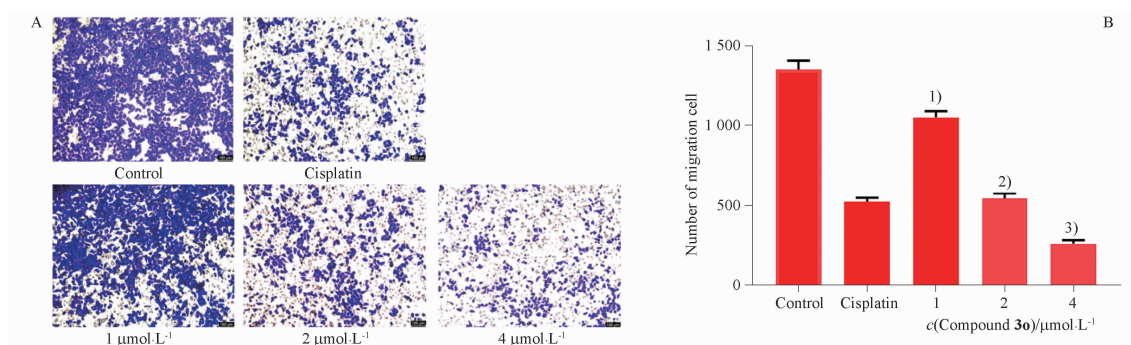
Tab. 1 Toxicity of trifluoromethoxy derivatives on cervical cancer cells and normal cells. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Compounds	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
	HeLa	SiHa	C-33A	H8
3a	21.8 ± 0.94	40.79 ± 0.66	16.37 ± 1.10	38.67 ± 0.65
3b	47.13 ± 8.34	91.48 ± 8.89	50.26 ± 0.59	40.7 ± 5.6.17
3c	49.4 ± 12.54	97.37 ± 6.37	42.26 ± 2.05	36.81 ± 3.80
3d	5.44 ± 1.68	18.10 ± 0.99	10.19 ± 0.45	6.84 ± 2.01
3e	12.51 ± 1.09	23.31 ± 1.42	22 ± 1.01	3.34 ± 1.53
3f	23.69 ± 1.94	32.82 ± 5.04	17.48 ± 1.07	25 ± 3.03
3g	22.25 ± 1.63	34.31 ± 0.49	31.51 ± 1.67	48.58 ± 8.79
3h	4.97 ± 0.67	7.435 ± 0.58	23.45 ± 1.85	16.65 ± 1.62
3i	17.9 ± 0.60	35.30 ± 3.03	13.71 ± 1.53	31.18 ± 2.06
3j	>100	>100	>100	>100
3k	52.28 ± 6.04	50 ± 0.87	37.41 ± 0.87	31.36 ± 1.59
3l	26.33 ± 0.34	30.61 ± 1.28	4.02 ± 0.32	18.5 ± 2.20
3m	86.24 ± 7.81	71.67 ± 7.09	2.3 ± 0.6	74.11 ± 9.28
3n	9.005 ± 1.37	19.58 ± 0.67	10.48 ± 2.04	43.67 ± 1.00
3o	4.60 ± 0.40	13.89 ± 0.74	0.89 ± 0.14	19.6 ± 1.47
3p	24.59 ± 5.71	18.55 ± 1.89	5.88 ± 0.65	5.72 ± 0.63
3q	28.43 ± 5.71	39.31 ± 1.89	13.37 ± 0.21	22.68 ± 3.90
3r	20.43 ± 0.97	23.42 ± 1.66	5.79 ± 0.16	56.72 ± 2.04
3s	12.02 ± 1.00	9.5 ± 0.26	5.46 ± 0.25	13.46 ± 2.36
3t	16.76 ± 0.78	27.68 ± 0.55	3.81 ± 0.19	34.51 ± 7.05
Cisplatin	17.16 ± 0.93	24.07 ± 1.77	11.61 ± 0.18	18.88 ± 1.34

2.2.3 候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞迁移侵袭能力的影响 细胞迁移侵袭是肿瘤细胞基础功能之一, 也是癌症发生和转移的原因之一。细胞迁移侵袭实验是评估肿瘤细胞在正常组织中转移的能力的常用方法。本实验通过 Transwell 法观察候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力的影响 (图 3 ~ 4), 结果表明, 候选化合物 **3o** 随着浓度提高对 HeLa 细胞迁移和侵袭抑制作用显著增加, 有统计学意义 ($P < 0.001$), 说明化合物 **3o** 可以通过抑制细胞迁移和侵袭来抑制肿瘤发生和转移。

2.2.4 候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞凋亡的影响 采用 AnnexinV-FITC/PI 双染法结合流式细胞仪检测候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞凋亡的影响 (图 5)。结果显示, 用 **3o** 干预 24 h 后, 低、中、高浓度凋亡率分别 (10.57 ± 0.85)%、(15.57 ± 1.58)%、(32.97 ± 2.48)%, 与空白组 (5.8 ± 0.95)% 相比, 随着浓度的增加, 促凋亡作用逐渐增强, 说明候选化合物 **3o** 可以通过促细胞凋亡起抗肿瘤作用。

2.2.5 候选化合物 **3o** 对 HeLa 细胞周期的影响 采用 PI 单染法结合流式细胞仪测试候选化合物 **3o** 对 HeLa 周期的影响 (图 6)。与空白组相比, 随着化合物 **3o** 的浓度增加, G₀/G₁ 期细胞逐渐增加, G₂/M 期明显减少并有浓度依赖性 ($P < 0.05$); 与同浓度

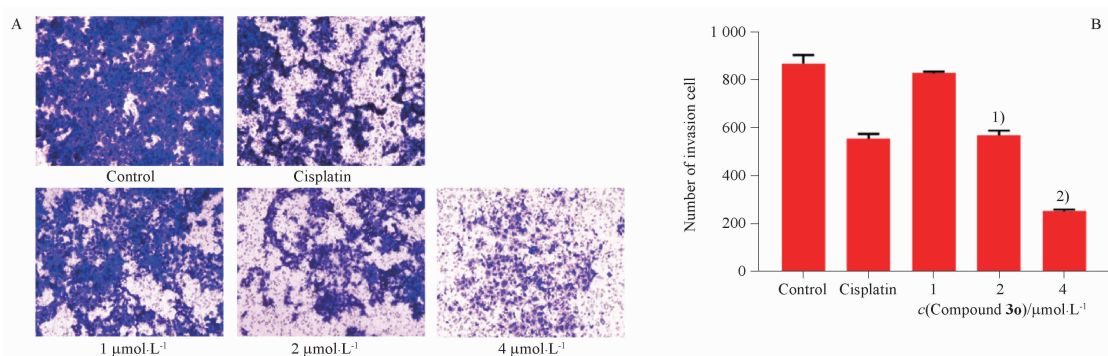


A - 不同浓度组细胞迁移染色结果 ($\times 100$); B - 不同组细胞迁移数量与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.0001$, ²⁾ $P < 0.0001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

A - results of cell migration staining in different concentration groups ($\times 100$); B - The number of cell migration in different groups was compared with that in blank control group, ¹⁾ $P < 0.0001$, ²⁾ $P < 0.0001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

图3 化合物30对HeLa细胞迁移的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig.3 Effect of compound 30 on cell migration. $n = 3, \bar{x} \pm s$

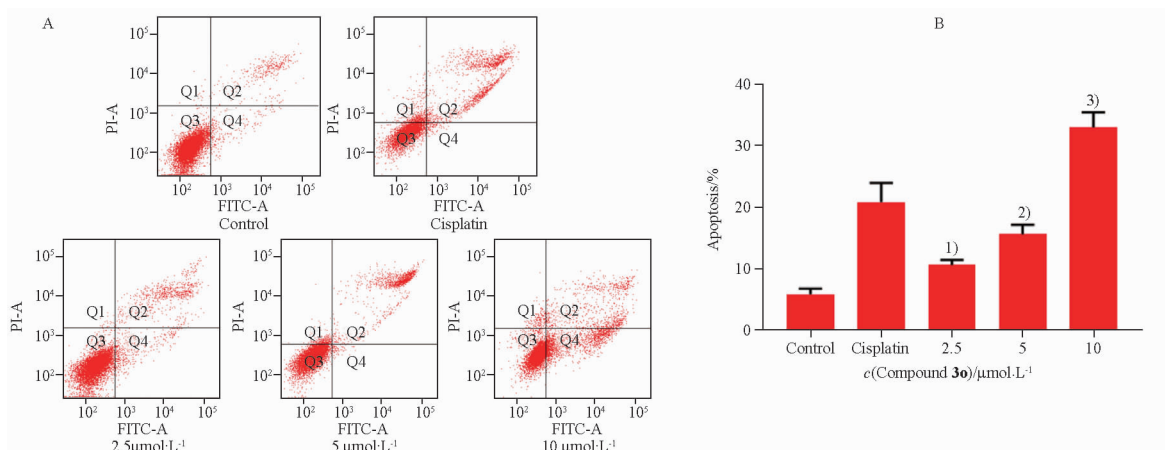


A - 不同浓度细胞侵袭染色结果 ($\times 100$); B - 不同组细胞迁移数量与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.0001$, ²⁾ $P < 0.0001$ 。

A - results of different concentration cell invasion staining ($\times 100$); B - The number of cell in invasion different groups was compared with that in blank control group, ¹⁾ $P < 0.0001$, ²⁾ $P < 0.0001$ 。

图4 化合物30对HeLa细胞侵袭的影响

Fig.4 Effect of compound 30 on cell invasion



A - 细胞凋亡结果; B - 不同浓度组与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

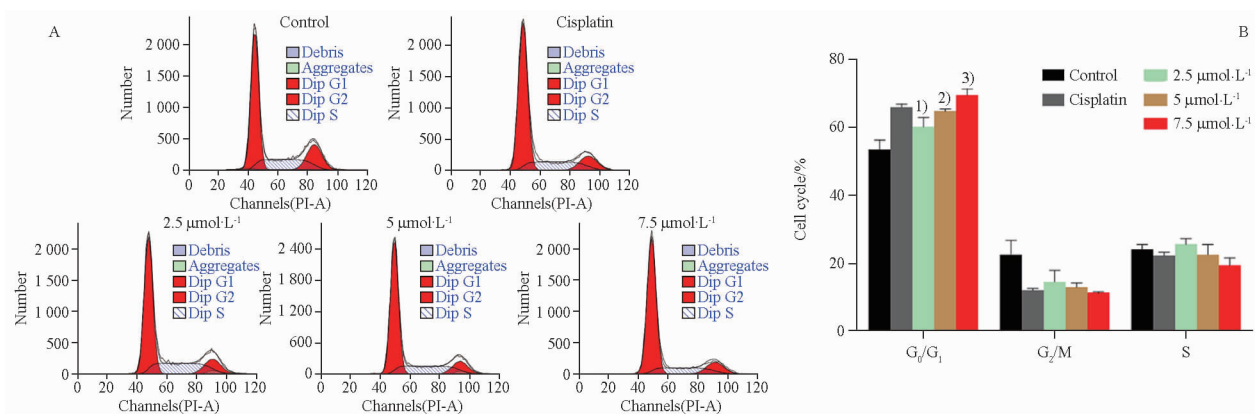
A - results of apoptotic; B - Comparison between different concentration groups and blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

图5 化合物30对HeLa细胞凋亡的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig.5 Effect of compound 30 on HeLa cell apoptosis rate. $n = 3, \bar{x} \pm s$

阳性药顺铂组相比,化合物30对HeLa细胞G₀/G₁期的阻滞作用更明显,说明该化合物能明显影响细

胞周期,使大部分细胞阻滞在G₀/G₁期,从而影响宫颈癌细胞增殖,发挥抗肿瘤作用。



A - 细胞周期阻滞结果; B - 不同浓度组与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.0001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

A - results of cell cycle arrest results; B - comparison between different concentration groups and blank control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.0001$, ³⁾ $P < 0.0001$ 。

图6 化合物30对HeLa细胞周期阻滞的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effect of compound 30 on HeLa cell cycle arresting rate. n = 3, $\bar{x} \pm s$

2.3 分子对接研究

从二维图(图7)可以看出,化合物30与MDM2(PDB ID = 5TRF)蛋白可形成2个至关重要的氢键。通过三维图可发现,候选化合物30的A环甲氧基部分C₄位的氧与受体蛋白亚基D链上第105位的氨基酸残基形成氢键,同时,B环上的三氟甲氧基的氟原子与蛋白A链上第109位的氨基酸残基形成氢键。化合物30与其他氨基酸残基如ARG-105

(A)、LYS-98(B)和ARG-97(B)等形成强烈的疏水性相互作用。化合物30与MDM2蛋白结合的最低能量为 $-37.62 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,比查尔酮($-33.44 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)和MDM2-p53分子抑制剂Nutlin-3a($-37.20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)均相当。以上数据显示,候选化合物能与MDM2蛋白稳定结合,可初步判断该化合物抗宫颈癌作用可能与MDM2结合,阻断MDM2-p53相互作用有关。

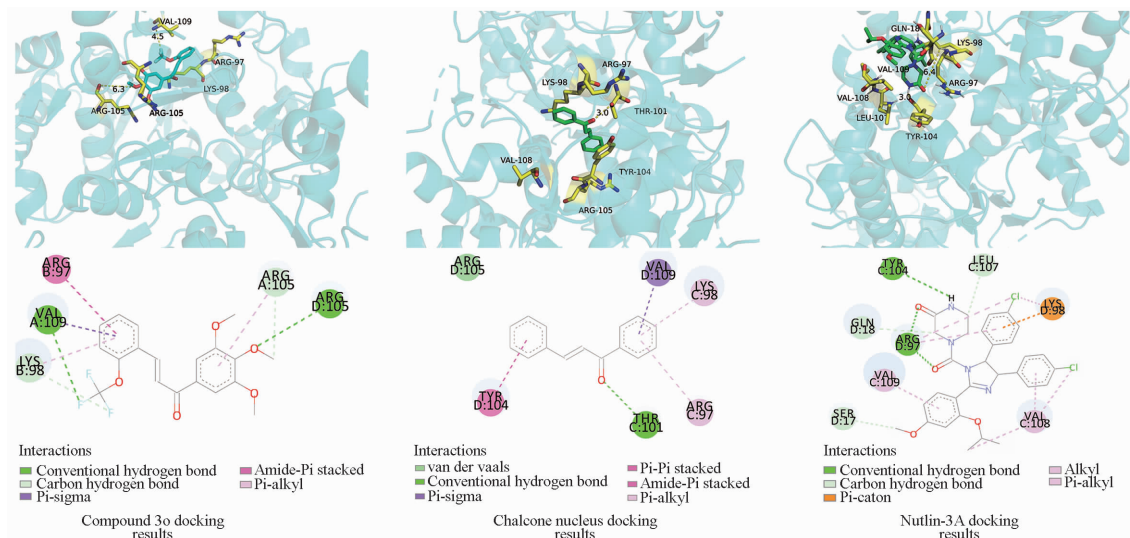


图7 候选化合物30、查尔酮母核和阳性药分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results of compound 30, chalcone parent nucleus and positive drug

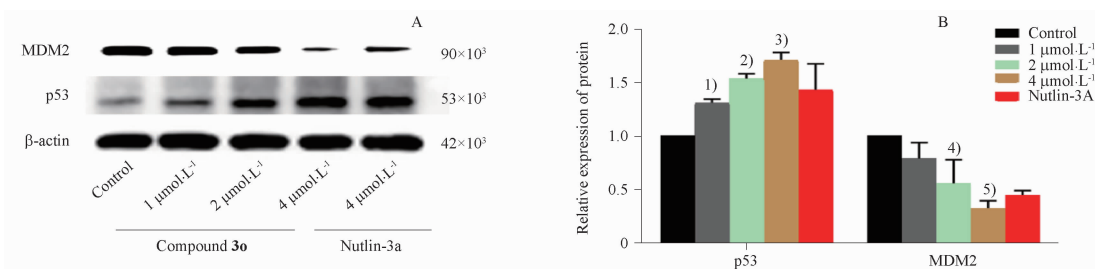
2.4 候选化合物30对HeLa细胞中p53和MDM2蛋白表达的影响

通过Western blot实验测定候选化合物30干预后的HeLa细胞中的p53和MDM2蛋白的表达(图8),结果显示与对照组相比p53蛋白表达水平明显上调,MDM2蛋白的表达水平明显下调,推测化

合物30能与MDM2蛋白结合,较好地激活p53的表达,抑制MDM2表达。

3 讨论

本研究以甘草查尔酮为先导化合物骨架,基于MDM2-p53结合位点为对接部位,设计并合成了



A - 不同组细胞凋亡蛋白表达; B - 不同组细胞蛋白带光密度; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.0001$, ⁴⁾ $P < 0.0001$, ⁵⁾ $P < 0.0001$ 。

A - Apoptosis protein expression in different groups; B - Optical density of protein band in different groups; Comparison with blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.0001$, ⁴⁾ $P < 0.0001$, ⁵⁾ $P < 0.0001$ 。

图8 化合物 3o 对 HeLa 细胞目的蛋白表达的影响. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Effect compounds 3o on HeLa purpose protein expression. $n = 3, \bar{x} \pm s$

20 个全新三氟甲氧基查尔酮类衍生物。通过 MTT 实验进行活性筛选和初步的构效关系分析,并筛选了活性高而毒性较低的候选化合物 3o;进一步实验证明,化合物 3o 可明显抑制宫颈癌 HeLa 细胞的迁移和侵袭,促进细胞凋亡,可将细胞增殖阻滞在 G₀/G₁ 期。分子对接研究结果显示化合物 3o 能与 MDM2 蛋白的 p53 结合位点稳定结合(结合能为 $-37.62 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)。以上研究结果提示,化合物 3o 对宫颈癌细胞增殖具有显著抑制作用,并可促进癌细胞凋亡和抑制迁移和侵袭。结合分子对接结果初步预测,其抗癌作用可能是通过与 MDM2 结合,抑制 MDM2-p53 复合物的形成,激活 p53 蛋白功能来实现。本研究为新型查尔酮类抗癌候选药物筛选而奠定一定的实验基础。

REFERENCES

- [1] ZHOU Y W, WANG M Y, WEI C Y, et al. Interpretation of the 2022 US cancer statistics report and comparison of cancer prevalence in China and the United States[J]. *Electron J Integr Ther Oncol* (肿瘤学综合治疗电子杂志), 2022, 8(2):54-63.
- [2] D'ORIA O, CORRADO G, LAGANÀ A S. New advances in cervical cancer: From Bench to Bedside[J]. *Environ Res Public Health*, 2022, 19(12):7094.
- [3] KANAPATHIPILLAI, MATHUMAI. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer[J]. *Cancers*, 2018, 10(6):154.
- [4] SABAPATHY, KANAGA, LANE, et al. Understanding p53 functions through p53 antibodies[J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(4):317-329.
- [5] LIEBL, MAGDALENA C, HOFMANN. The role of p53 Signaling in colorectal cancer[J]. *Cancers*, 2021, 13(9):2125.
- [6] ZAVILEYSKIY, LEV, BUNIK. Regulation of p53 function by formation of non-nuclear heterologous protein complexes[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2):327.
- [7] MAO Y, JIANG P. The crisscross between p53 and metabolism in cancer[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(6):914-922.
- [8] KOO, NAYEONG, SHARMA, et al. Therapeutics Targeting p53-MDM2 Interaction to Induce Cancer Cell Death[J]. *Mol Sci*, 2022, 23(9):5005.
- [9] SINGH, ANUP KUMAR. CHAUHAN. Dual targeting of MDM2 with a novel small-molecule inhibitor overcomes TRAIL resistance in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(11):1027-1040.
- [10] ZHU, HAOHAO, GAO, et al. Targeting p53-MDM2 interaction

by small-molecule inhibitors: learning from MDM2 inhibitors in clinical trials[J]. *Hematol Oncol*, 2022, 15(1):91.

- [11] PATEL K R, PATEL H D, et al. p53: an attractive therapeutic target for cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(22):3706-3734.
- [12] HENNINGSEN K M, MANZINI V, MAGERHANS A, et al. MDM2-Driven ubiquitination rapidly removes p53 from its cognate promoters[J]. *Biomolecules*, 2021, 12(1):22.
- [13] OUYANG Y, LI J, CHEN X, et al. Chalcone derivatives: role in anticancer therapy[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6):894.
- [14] ZHUANG C L, ZHANG W, SHENG C, et al. Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry[J]. *Chem Rev*, 2017, 117(12):7762-7810.
- [15] STOLL R, RENNER C, HANSEN S, et al. Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(2):336-344.
- [16] MOREIRA J, ALMEIDA J B, CARVALHO S, et al. Chalcones as promising antitumor agents by targeting the p53 pathway: an overview and new insights in drug-likeness[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26(12):3737.
- [17] BRANDÃO, PEDRO, LOUREIRO, et al. Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction with prenylchalcones: Synthesis of a small library and evaluation of potential antitumor activity[J]. *Med Chem*, 2018, 156:711-721.
- [18] AIZITI A, ZHENG Y, MOURBOUL A, et al. Synthesis of novel α -methyl chalcone derivatives and in vitro activity against cervical cancer[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2022, 32(1):8-18.
- [19] AIZITI A, AKEBAIER M, MOURBOUL A. Preparation of a novel α -methylchalcone, anticervical cancer activity, and effects on the Akt-MDM2-p53 signaling pathway[J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2023, 39(7):1399-1400.
- [20] BOER L, ZHENG Y, AIZITI A, et al. Synthesis of 4-chloride-2', 4'-dimethoxychalcone and molecular docking of MDM2 protein[J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2020, 43(11):1491-1494.
- [21] ZHENG Y, MIREGULI M, MOURBOUL A. Synthesis of halogenated chalcone derivatives and their anti-cervical cancer activity[J]. *Synth Chem* (合成化学), 2019, 27(1):50-55.
- [22] AIZITIALI A, YANG Z, MOURBOUL A, et al. Synthesis and anti-cervical cancer activities of novel α -methyl chalcone derivatives[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2022, 32(1):8-18.
- [23] YUSUPUWAJIMU A, AIZITIALI A, MOURBOUL A, et al. Design, synthesis of novel trifluoromethylchalcone derivatives and in vitro anti-cervical cancer activity[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2022, 53(6):674-684.
- [24] BURMAOGLU S, AKTAS A D, GOBEK A, et al. Design, synthesis and antiproliferative activity evaluation of fluorine-containing chalcone derivatives[J]. *Biomol Struct Dyn*, 2020, 40(8):3525-3550. (收稿日期:2023-09-20)