

# 胡椒碱-双环酰胺衍生物的设计、合成及抗宫颈癌活性

王秀军<sup>1</sup>, 姜文韬<sup>1</sup>, 何景梁<sup>1</sup>, 陈慧杰<sup>1</sup>, 乔悦<sup>1</sup>, 王德伟<sup>2</sup>,  
王炳岩<sup>1</sup>, 侯啸<sup>1</sup>, 刘伟<sup>3</sup>, 耿婷<sup>1</sup>, 张思懿<sup>1</sup>,  
刘星<sup>1</sup>, 马少杰<sup>1</sup>, 刘彬<sup>1</sup>, 杨明利<sup>4</sup>, 吉敬<sup>1</sup>

(1. 江苏海洋大学药学院, 连云港 222000; 2. 中国船舶重工集团有限公司第716研究所, 连云港 222000;  
3. 连云港经济技术开发区生命健康产业园管理处(新药产业发展局), 连云港 222000;  
4. 南京医科大学康达学院药学院, 连云港 222000)

**摘要** 以胡椒碱为母核进行结构改造, 合成了一系列胡椒碱-双环酰胺衍生物; 并用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR), 核磁共振碳谱(<sup>13</sup>C NMR)和高分辨质谱(HRMS)进行了结构确证. 噻唑蓝(MTT)比色法测试结果表明, 目标化合物对肾细胞(293T)、宫颈癌(HeLa)和乳腺癌(MDA-MB-321)细胞有良好的抑制活性, 大多数衍生物对HeLa细胞的抑制活性优于阳性对照药5-氟尿嘧啶(5-FU)和胡椒碱. 化合物**6b**对HeLa细胞的抗增殖活性最高, 半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为3.49 μmol/L, 对MDA-MB-321细胞的IC<sub>50</sub>值为20.89 μmol/L. 机理研究发现, 化合物**6b**不仅可有效抑制HeLa细胞的迁移、侵袭、黏附和克隆能力, 而且对HeLa细胞肿瘤异种移植物的生长表现出强烈的抑制作用. 因此, 化合物**6b**有可能成为肿瘤治疗中潜在的先导化合物.

**关键词** 胡椒碱; 抗肿瘤; 胡椒碱-双环酰胺衍生物

中图分类号 O626 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20230520

## Design, Synthesis and Anti-cervical Cancer Activity of Piperine-bicycloamide Derivatives

WANG Xiujun<sup>1</sup>, JIANG Wentao<sup>1</sup>, HE Jingliang<sup>1</sup>, CHEN Huijie<sup>1</sup>, QIAO Yue<sup>1</sup>, WANG Dewei<sup>2</sup>,  
WANG Bingyan<sup>1</sup>, HOU Xiao<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>3</sup>, GENG Ting<sup>1</sup>, ZHANG Siyi<sup>1</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>,  
MA Shaojie<sup>1\*</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>, YANG Mingli<sup>4\*</sup>, JI Jing<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China;  
2. The 716th Institute of China Shipbuilding Industry Group Co., Ltd., Lianyungang 222000, China;  
3. Lianyungang Economic and Technological Development Zone Life and Health Industry Park Management Office  
(New Pharmaceutical Industry Development Bureau), Lianyungang 222000, China;  
4. Department of Pharmacy, Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China)

**Abstract** In this paper, a series of piperine-dicycloamide derivatives was synthesized using piperine as parent

收稿日期: 2023-12-25. 网络首发日期: 2024-01-31.

联系人简介: 马少杰, 男, 博士, 讲师, 主要从事新药创新研发方面的研究. E-mail: msjgdp@126.com

杨明利, 女, 硕士, 副教授, 主要从事新药创新研发方面的研究. E-mail: mingliyang@njmu.edu.cn

吉敬, 女, 博士, 副教授, 主要从事药物活性分子作用机制方面的研究. E-mail: jijing@jou.edu.cn

基金项目: 江苏海洋大学江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室开放课题(批准号: HY202302, HY202305)、连云港市海产品检验技术研究重点实验室运行费(批准号: 5507018036)和江苏省研究生实践创新计划课题(批准号: SY202352X1)资助.

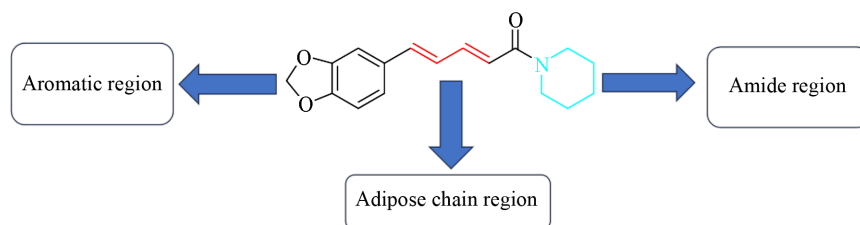
Supported by the Open Project of the Key Laboratory of Active Molecular Screening for Marine Drugs in Jiangsu Province, Jiangsu Ocean University, China(Nos.HY202302, HY202305), the Operating Fee of the Key Laboratory of Marine Product Inspection Technology in Lianyungang City, China(No.5507018036), and the Jiangsu Graduate Practice Innovation Program Project, China(No.SY202352X1).

nucleus, and their structures were confirmed by means of nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR), nuclear magnetic resonance carbon spectroscopy ( $^{13}\text{C}$  NMR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay showed that these compounds had good inhibitory effects on kidney cells (293T), cervical cancer (HeLa) and breast cancer (MDA-MB-321). Most derivatives had better inhibitory activity on HeLa cells than positive controls fluorouracil (5-FU) and piperine, and compound **6b** had the highest anti-proliferative activity on HeLa cells. The half maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of MDA-MB-321 cells was  $3.49 \mu\text{mol/L}$ , and the  $\text{IC}_{50}$  of MDA-MB-321 cells was  $20.89 \mu\text{mol/L}$ . The mechanism study showed that compound **6b** not only effectively inhibited the migration, invasion, adhesion and cloning ability of HeLa cells, but also showed a strong inhibitory effect on the growth of xenografts of HeLa cells. Therefore, compound **6b** has the potential to be a lead compound in tumor therapy.

**Keywords** Piperine; Anti-tumor; Piperine-bicycloamide derivative

宫颈癌是最常见的妇科癌症, 仅在2020年, 就有约60万例新的宫颈癌病例被报告. 宫颈癌的传统治疗方式主要包括手术干预、放疗和化疗<sup>[1]</sup>. 虽然手术有一定的治疗效果, 但也有明显的局限性. 手术治疗不仅给患者带来显著的疼痛, 也带来了由于不完全切除而导致肿瘤复发的风险<sup>[2]</sup>, 且有时无法有效根除肿瘤. 化疗是癌症治疗的主要方法, 目前可用的广谱化疗药物表现出脱靶副作用, 给药后会对患者的身体造成严重伤害<sup>[3]</sup>; 而新引入的小分子靶向药物长期使用可能导致肿瘤耐药性<sup>[4]</sup>. 因此, 在癌症治疗领域, 开发对癌症细胞具有低毒、高效和选择性的新药势在必行. 目前, 天然来源的抗肿瘤药物受到人们的重视, 如胡椒碱, 其对多种癌症具有治疗潜力, 包括乳腺癌、胶质瘤和宫颈癌等<sup>[5-9]</sup>. 研究表明, 胡椒碱对宫颈癌细胞的增殖有明显抑制作用<sup>[10,11]</sup>, 主要通过调节多种酶和转录因子活性来抑制肿瘤细胞的侵袭、转移和血管生成<sup>[12-16]</sup>.

研究胡椒碱及其类似结构修饰对肿瘤细胞的选择性和毒性作用具有重要意义. 如 Scheme 1 所示, 胡椒碱(化合物 **1**)的结构可分为芳香区、脂肪链区和哌啶环三部分. 这三部分的结构改变均可导致其生物活性的变化<sup>[17-19]</sup>. 哌啶环结构在天然药物中广泛存在, 与化合物生物活性相关<sup>[20-22]</sup>. 本文对胡椒碱的哌啶环、脂肪链和芳香环均进行了结构改造, 通过将哌啶环替换为 *N*-取代哌啶环或 *N*-取代哌啶环, 缩短脂肪链的长度以及将二恶茂亚甲基上的氢原子用氟原子取代, 获得了一系列相关衍生物; 并研究了其抗肿瘤活性和作用机制.



Scheme 1 Domain division of piperine(1) structure

## 1 实验部分

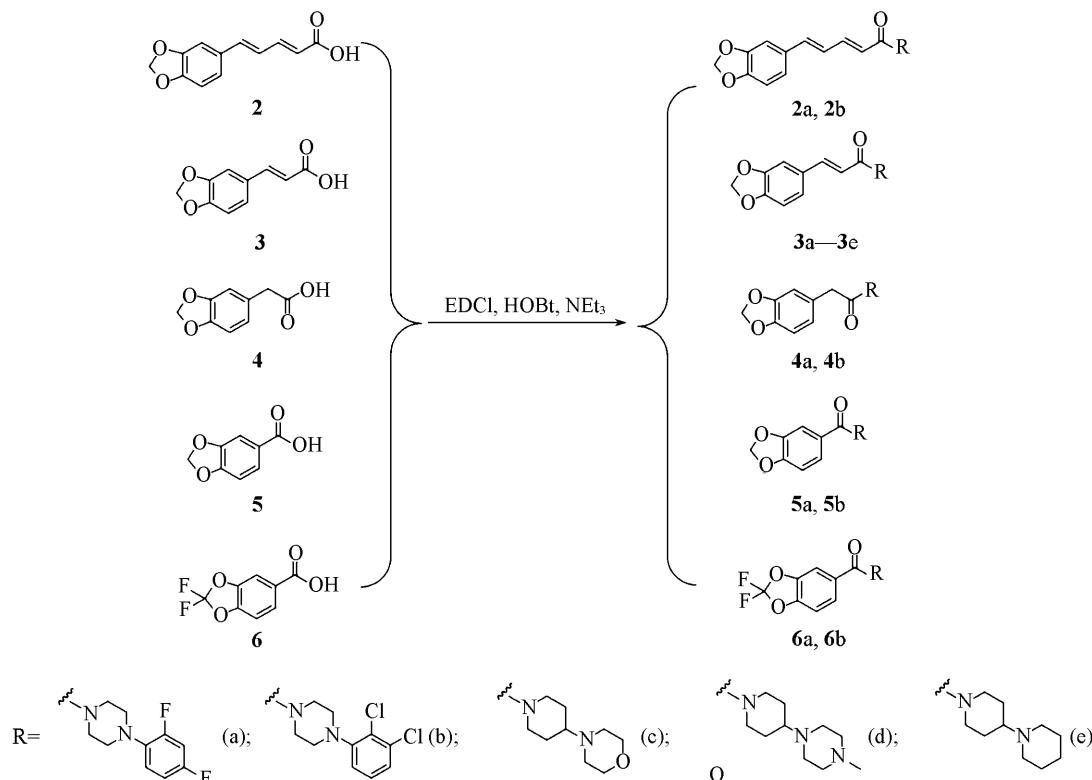
### 1.1 试剂与仪器

胡椒碱、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、(2*E*, 4*E*)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环-5-基)戊-2,4-二烯酸(**2**)、3-(苯并[d][1,3]二氧杂五环-5-基)丙烯酸(**3**)、2-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)乙酸(**4**)、3,4-亚甲二氧基苯甲酸(**5**)和2,2-二氟-1,3-苯并二噁茂-5-羧酸(**6**), 分析纯, 上海毕得医药科技股份有限公司; 杂环仲胺试剂1-(2,4-二氟苯基)哌啶(a)、1-(2,3-二氯苯基)哌啶(b)、4-(4-哌啶基)吗啉(c)、1-甲基-4-(4-哌啶基)哌啶(d)和4-4-哌啶基哌啶(e), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 肾细胞(293T)、宫颈癌(HeLa)和乳腺癌(MDA-MB-321)细胞系, 北京国家生物医学实验室.

微孔板读取器, 美国 BioTek 公司; BRUKER-400 型核磁共振波谱仪(NMR), 德国 Bruker 公司; Triple TOF 5600 plus LC/MS/MS 型高分辨质谱仪(HRMS), 美国 AB Sciex 公司; SMP-50 型全自动数字熔点仪, 英国 Bibby 科学有限责任公司; SECURA3102-1CEU 型精密天平, 德国 Secura 公司; 包被侵袭小室, 美国康宁公司; ELX808 IU 型酶标仪, 美国 BioTek Instruments 公司.

## 1.2 实验过程

目标化合物的合成路线如 Scheme 2 所示, 化合物的相关谱图见本文支持信息图 S1~图 S51.



Scheme 2 Synthetic routes of target compounds 2a—6b

1.2.1 化合物 2a 和 2b 的合成 将 0.916 mmol 化合物 2、1.1 mmol HOBT、1.1 mmol EDCI 及 2.7 mmol 三乙胺加入 4 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 1 h. 随后, 加入 1.1 mmol 杂环仲胺 a 和 b, 室温下继续反应 2 h. 通过减压蒸馏除去二氯甲烷, 经柱层析 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ ) 分离纯化, 得到目标化合物 (2*E*, 4*E*)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,4-二氟苯基)哌嗪-1-基]戊-2,4-二烯-1-酮 { (2*E*, 4*E*)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,4-difluorophenyl)piperazin-1-yl]penta-2,4-dien-1-one, 2a} 和 (2*E*, 4*E*)-5-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基]戊-2,4-二烯-1-酮 { (2*E*, 4*E*)-5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]penta-2,4-dien-1-one, 2b}.

化合物 2a, 橙色固体, 240 mg, 收率 67%, m. p. 160~162 °C.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.48 (dd,  $J=14.6, 10.0$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 6.95~6.89 (m, 2H), 6.88~6.78 (m, 4H), 6.75 (d,  $J=5.0$  Hz, 1H), 6.46 (d,  $J=14.6$  Hz, 1H), 6.00 (s, 2H), 3.84 (d,  $J=57.7$  Hz, 4H), 3.05 (t,  $J=5.0$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 165.64, 159.33, 159.23, 157.39, 157.29, 156.83, 156.74, 154.85, 154.76, 148.32, 148.26, 143.42, 139.03, 136.19, 136.16, 136.12, 136.09, 130.87, 125.07, 122.71, 120.03, 120.00, 119.95, 119.92, 119.05, 110.98, 110.95, 110.81, 110.78, 108.54, 105.72, 105.08, 104.89, 104.87, 104.68, 101.34, 51.51, 50.79, 45.90, 42.16; HRMS ( $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$  计算值),  $m/z$ : 421.1337(421.1340)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

化合物 2b, 橙色固体, 292 mg, 收率 74.1%, m. p. 130~132 °C.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.49

(dd,  $J=15.0, 10.0$  Hz, 1H), 7.25~7.14(m, 2H), 7.01(s, 1H), 6.98~6.88(m, 2H), 6.86~6.72(m, 3H), 6.47(d,  $J=15.0$  Hz, 1H), 6.00(s, 2H), 3.86(d,  $J=55.0$  Hz, 4H), 3.07(t,  $J=5.0$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 165.73, 150.63, 148.30, 148.25, 143.37, 138.99, 134.20, 130.87, 127.77, 127.57, 125.20, 125.08, 122.68, 119.15, 118.81, 108.53, 105.73, 101.33, 51.84, 50.15, 46.00, 42.29; HRMS( $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$  计算值),  $m/z$ : 453.0745(453.0749)[ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ .

1.2.2 化合物 **3a~3e** 的合成 将 1.04 mmol 化合物 **3**、1.24 mmol HOBt、1.24 mmol EDCI 及 3.12 mmol 三乙胺加入 4 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 1 h. 随后, 加入杂环仲胺 a~e (1.24 mmol), 室温下继续反应 2 h. 通过减压蒸馏除去二氯甲烷, 经柱层析( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ )分离纯化, 得到目标化合物 (*E*)-3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,4-二氟苯基)哌嗪-1-基]丙-2-烯-1-酮 { (*E*)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,4-difluorophenyl)piperazin-1-yl]prop-2-en-1-one, **3a** }、(*E*)-3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基]丙-2-烯-1-酮 { (*E*)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]prop-2-en-1-one, **3b** }、(*E*)-3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-(4-吗啉基哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮 [ (*E*)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-(4-morpholinopiperidin-1-yl)prop-2-en-1-one, **3c** ]、(*E*)-3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮 { (*E*)-3-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]prop-2-en-1-one, **3d** } 和 (*E*)-1-([1,4'-联哌啶]-1'-基)-3-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)丙-2-烯-1-酮 [ (*E*)-1-([1,4'-Bipiperidin]-1'-yl)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)prop-2-en-1-one, **3e** ].

化合物 **3a**, 淡黄色固体, 257 mg, 收率 66.4%, m. p. 138~140 °C.  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.65(d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 7.07(d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 7.03(dd,  $J=5.0, 1.7$  Hz, 1H), 6.96~6.89(m, 1H), 6.89~6.85(m, 1H), 6.83(d,  $J=7.9$  Hz, 2H), 6.76(d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 6.02(s, 2H), 3.88(d,  $J=45.0$  Hz, 4H), 3.08(t,  $J=5.0$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 165.65, 159.36, 159.27, 157.42, 157.32, 156.84, 156.75, 154.86, 154.77, 149.13, 148.28, 142.96, 136.12, 136.07, 129.62, 123.90, 120.06, 120.03, 119.99, 119.96, 114.73, 111.00, 110.97, 110.83, 110.80, 108.56, 106.36, 105.10, 104.91, 104.89, 104.70, 101.49, 51.53, 50.81, 45.96, 42.26; HRMS( $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3$  计算值),  $m/z$ : 373.1368(373.1364)[ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

化合物 **3b**, 淡黄色固体, 268 mg, 收率 63.7%, m. p. 96~98 °C.  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.65(d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 7.23~7.16(m, 2H), 7.07(d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 7.03(dd,  $J=7.9, 1.7$  Hz, 1H), 6.95(dd,  $J=7.8, 1.7$  Hz, 1H), 6.83(d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.77(d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 6.02(s, 2H), 3.89(d,  $J=42.1$  Hz, 4H), 3.08(t,  $J=5.0$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 165.75, 150.62, 149.12, 148.28, 142.92, 134.22, 129.63, 127.78, 127.59, 125.23, 123.88, 118.82, 114.83, 108.56, 106.37, 101.48, 51.84, 51.18, 46.08, 42.40; HRMS( $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$  计算值),  $m/z$ : 427.0593(427.0593)[ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ .

化合物 **3c**, 淡黄色固体, 240 mg, 收率 67%, m. p. 144~150 °C.  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.58(d,  $J=15.4$  Hz, 1H), 7.06~6.96(m, 2H), 6.85~6.66(m, 2H), 6.00(s, 2H), 4.73(s, 1H), 4.13(s, 1H), 3.79~3.67(m, 4H), 3.12(s, 1H), 2.71(s, 1H), 2.62~2.56(m, 4H), 2.49(td,  $J=9.3, 5.4$  Hz, 1H), 1.94(d,  $J=11.1$  Hz, 2H), 1.55~1.41(m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 164.99, 148.51, 148.21, 142.03, 129.85, 123.72, 115.22, 108.50, 106.33, 101.00, 67.15, 61.99, 49.69; HRMS( $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$  计算值),  $m/z$ : 345.1814(345.1814)[ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

化合物 **3d**, 淡黄色固体, 220 mg, 收率 59%, m. p. 117~121 °C.  $^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 7.56(d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 7.03(s, 1H), 6.99(d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.79(d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.72(d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 5.98(s, 2H), 4.72(s, 1H), 4.14(s, 1H), 3.45(s, 1H), 3.10(s, 1H), 2.61(s, 5H), 2.50(s, 5H), 2.29(s, 3H), 1.92(d,  $J=12.6$  Hz, 2H), 1.48(qd,  $J=11.8, 3.8$  Hz, 2H), 1.23(m, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR(126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 165.41, 148.93, 148.20, 142.36, 129.77, 123.69, 115.29,

108.49, 106.34, 101.41, 61.74, 58.13, 55.39, 50.50, 45.94, 45.24, 41.76, 29.03, 28.10, 18.45; HRMS( $C_{20}H_{28}N_3O_3$  计算值),  $m/z$ : 358.2135(358.2131)[M+H]<sup>+</sup>.

化合物 **3e**, 白色固体 200 mg, 收率 61%, m. p. 146~150 °C. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.59(s,  $J=15.3$ , 1H), 7.04(s, 1H), 6.99(d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 6.80(d,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.74(d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 5.99(s, 2H), 4.76(s, 1H), 4.16(s, 1H), 3.09(s, 1H), 2.65(s, 1H), 2.56~2.47(m, 5H), 1.90(d,  $J=11.7$  Hz, 2H), 1.66~1.55(m, 4H), 1.55~1.42(m, 4H); <sup>13</sup>C NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 165.37, 148.89, 148.19, 142.02, 129.82, 123.65, 115.41, 108.48, 106.34, 101.40, 62.45, 50.30, 45.57, 42.07, 29.00, 27.58, 26.39, 24.74; HRMS( $C_{20}H_{27}N_2O_3$  计算值),  $m/z$ : 343.2025(343.2022)[M+H]<sup>+</sup>.

1.2.3 化合物 **4a** 和 **4b** 的合成 将 1.11 mmol 化合物 **4**, 1.33 mmol HOBT, 1.33 mmol EDCI 及 3.33 mmol 三乙胺加入 4 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 1 h. 随后加入 1.33 mmol 杂环仲胺 a 和 b, 室温下继续反应 2 h. 通过减压蒸馏除去二氯甲烷, 经柱层析( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ )分离纯化, 得到目标化合物 2-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,4-二氟苯基)哌嗪-1-基]乙-1-酮{2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,4-difluorophenyl)piperazin-1-yl]ethan-1-one, **4a**} 和 2-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1-[4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基]乙-1-酮{2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]ethan-1-one, **4b**}.

化合物 **4a**, 白色固体 250 mg, 收率 63%, m. p. 74~75 °C. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 6.90~6.84(m, 1H), 6.83(s, 1H), 6.81(s, 1H), 6.79(d,  $J=3.9$  Hz, 1H), 6.77(s, 1H), 6.71(d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 5.96(s, 2H), 3.82(t,  $J=5.1$  Hz, 2H), 3.70(s, 2H), 3.63(t,  $J=5.1$  Hz, 2H), 2.99(t,  $J=5.1$  Hz, 2H), 2.88(t,  $J=5.0$  Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 169.58, 159.29, 159.20, 157.35, 157.25, 156.76, 156.67, 154.78, 154.68, 147.98, 146.51, 136.10, 136.07, 136.03, 136.00, 128.52, 121.62, 119.94, 119.91, 119.87, 119.84, 110.93, 110.90, 110.76, 110.73, 109.09, 108.44, 105.05, 104.86, 104.85, 104.65, 101.05, 51.23, 51.21, 50.61, 50.59, 46.20, 41.85, 40.56; HRMS( $C_{19}H_{18}F_2N_2O_3Na$  计算值),  $m/z$ : 383.1180(383.1183)[M+Na]<sup>+</sup>.

化合物 **4b**, 淡黄色固体 300 mg, 收率 69%, m. p. 95~103 °C. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.20(dd,  $J=8.1, 1.7$  Hz, 1H), 7.16(t,  $J=8.0$  Hz, 1H), 6.90(dd,  $J=7.9, 1.7$  Hz, 1H), 6.81~6.78(m, 1H), 6.77(s, 1H), 6.71(dd,  $J=7.9, 1.8$  Hz, 1H), 5.96(s, 2H), 3.88~3.80(m, 2H), 3.70(s, 2H), 3.67~3.60(m, 2H), 3.01(t,  $J=5.1$  Hz, 2H), 2.90(t,  $J=4.9$  Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 169.69, 150.54, 147.98, 146.51, 134.19, 128.54, 127.72, 127.53, 125.19, 121.62, 118.75, 109.09, 108.44, 101.05, 51.56, 51.01, 46.32, 41.98, 40.61; HRMS( $C_{19}H_{19}Cl_2N_2O_3$  计算值),  $m/z$ : 393.0771(393.0773)[M+H]<sup>+</sup>.

1.2.4 化合物 **5a** 和 **5b** 的合成 将 1.2 mmol 化合物 **5**, 1.44 mmol HOBT, 1.44 mmol EDCI 及 3.60 mmol 三乙胺加入 4 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 1 h. 随后, 加入 1.44 mmol 杂环仲胺 a 和 b, 室温下继续反应 2 h. 通过减压蒸馏除去二氯甲烷, 经柱层析( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ )分离纯化, 得到目标化合物 苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基[4-(2,4-二氟苯基)哌嗪-1-基]甲酮{Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl[4-(2,4-difluorophenyl)piperazin-1-yl]methanone, **5a**} 和 苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基[4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基]甲酮{Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]methanone, **5b**}.

化合物 **5a**, 白色固体 270 mg, 收率 63%, m. p. 74~75 °C. <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 6.98(dd,  $J=7.9, 1.7$  Hz, 1H), 6.95(d,  $J=1.6$  Hz, 1H), 6.92(dt,  $J=9.9, 4.6$  Hz, 1H), 6.86(s, 1H), 6.84(s, 1H), 6.82(d,  $J=2.7$  Hz, 1H), 6.02(s, 2H), 3.80(s, 3H), 3.04(s, 4H); <sup>13</sup>C NMR(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 169.94, 159.34, 159.25, 157.40, 157.31, 156.83, 156.74, 154.85, 154.76, 148.96, 147.69, 136.17, 136.14, 136.10, 136.07, 129.15, 121.70, 120.05, 120.02, 119.98, 119.95, 110.98, 110.95, 110.81, 110.78, 108.26, 108.12, 105.09, 104.89, 104.88, 104.68, 101.48, 50.60; HRMS

( $C_{18}H_{17}F_2N_2O_3$  计算值),  $m/z$ : 347.1214(347.1215)[ $M+H$ ]<sup>+</sup>.

化合物 **5b**, 白色固体 252 mg, 收率 56%, m. p. 153~159 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 7.22 (dd,  $J=8.0, 1.7$  Hz, 1H), 7.18 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J=7.9, 1.6$  Hz, 1H), 6.97~6.94 (m, 2H), 6.86 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H), 6.03 (s, 2H), 3.81 (s, 4H), 3.06 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 170.02, 150.58, 148.95, 147.69, 134.23, 129.24, 127.78, 127.59, 125.27, 121.70, 118.84, 108.28, 108.13, 101.48, 50.38; HRMS ( $C_{18}H_{16}Cl_2N_2O_3Na$  计算值),  $m/z$ : 401.0434(401.0436)[ $M+Na$ ]<sup>+</sup>.

1.2.5 化合物 **6a** 和 **6b** 的合成 将 1.0 mmol 化合物 **6**、1.20 mmol HOBT、1.20 mmol EDCI 及 3.0 mmol 三乙胺加入 4 mL 二氯甲烷中, 室温下反应 1 h. 随后, 加入 1.20 mmol 杂环仲胺 a 和 b, 室温下继续反应 2 h. 通过减压蒸馏除去二氯甲烷, 经柱层析 ( $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=1:1$ ) 分离纯化, 得到目标化合物 (2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)[4-(2,4-二氟苯基)哌嗪-1-基]甲酮 { (2,2-Difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)[4-(2,4-difluorophenyl)piperazin-1-yl]methanone, **6a** } 和 (2,2-二氟苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)[4-(2,3-二氯苯基)哌嗪-1-基]甲酮 { [4-(2,3-Dichlorophenyl)piperazin-1-yl](2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)methanone, **6b** }.

化合物 **6a**, 白色固体 262 mg, 收率 68.5%, m. p. 87~89 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 7.22 (d,  $J=7.1$  Hz, 2H), 7.13 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.95~6.89 (m, 1H), 6.84 (q,  $J=8.4$  Hz, 2H), 3.77 (d,  $J=103.3$  Hz, 4H), 3.05 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 168.68, 159.43, 159.34, 157.49, 157.40, 156.89, 156.79, 154.90, 154.81, 144.70, 143.76, 136.03, 136.01, 135.96, 135.93, 133.67, 131.63, 131.50, 129.59, 123.21, 120.12, 120.08, 120.04, 120.01, 111.02, 110.99, 110.85, 110.82, 109.48, 109.15, 105.13, 104.94, 104.93, 104.73, 51.12; HRMS ( $C_{18}H_{15}F_4N_2O_3$  计算值),  $m/z$ : 383.1017(383.1019)[ $M+H$ ]<sup>+</sup>.

化合物 **6b**, 无色透明油状液体 250 mg, 收率 60%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 7.23 (s, 1H), 7.23~7.20 (m, 2H), 7.18 (t,  $J=7.9$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J=7.8, 1.8$  Hz, 1H), 3.82 (d,  $J=123.3$  Hz, 4H), 3.07 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : 168.75, 150.39, 144.65, 143.72, 134.21, 133.65, 131.61, 131.54, 129.57, 127.75, 127.62, 125.35, 123.22, 118.83, 109.50, 109.14, 51.36, 48.19, 42.71, 26.91; HRMS ( $C_{18}H_{15}Cl_2F_2N_2O_3$  计算值),  $m/z$ : 415.0438(415.0436)[ $M+H$ ]<sup>+</sup>.

1.2.6 细胞培养 研究用细胞系均购自国家生物医学实验室(北京), 所有细胞系的支原体检测均为阴性. 细胞在含有体积分数为 10% 的胎牛血清(FBS)和体积分数为 1% 的青霉素-链霉素的 DMEM (KGM12800-500) 培养基中培养, 在 37 °C 和体积分数 5% 的  $CO_2$  恒温培养箱 (Thermo Fisher Scientific, BB150) 中孵育. 当细胞融合率为 70%~80% 时, 加入 0.25% 的胰蛋白酶 [由 0.25 g 胰蛋白酶加入 100 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制而成] 进行消化、传代和培养.

1.2.7 噻唑蓝法测定药物  $IC_{50}$  噻唑蓝 (MTT) 可用于细胞增殖及活性测定及对体外细胞的毒性测定<sup>[23]</sup>. 将 HeLa 细胞、293T 细胞和 MDA-MB-231 细胞接种在 96 孔板中 ( $1 \times 10^4$  个/孔), 将 HeLa 细胞、293T 细胞和 MDA-MB-231 用体积分数为 10% 的胎小牛血清培养液配制成单个细胞悬液, 以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种到 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 孵育过夜. 弃去上层清液, 以胡椒碱和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 为对照组, 将细胞暴露于不同浓度的药物中培养, 每孔加入 200  $\mu$ L 待测药物, 每个浓度设 3 个复孔. 在其四周铺上 200  $\mu$ L PBS 缓冲液, 防止边缘液体蒸发. 在药物作用 48 h 后除去上层清液, 在避光条件下向每个孔中加入 10  $\mu$ L MTT (5 mg/mL), 在培养箱中孵育 4 h. 随后弃去 MTT, 每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 置于摇床上振荡 10 min 使结晶物充分融解. 使用酶标仪测量 490 nm 处的吸光度, 计算半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值.

1.2.8 细胞侵袭实验与黏附实验 经过 MTT 实验筛选后得到针对 HeLa 细胞的  $IC_{50}$  值最小的化合物 **6b**. 参照文献[24]方法, 在侵袭实验中, 用 50 mg/mL 基质凝胶 ( $V_{\text{基质胶}}:V_{\text{稀释液}}=1:8$ ) 加入到包被侵袭小室的上室中, 在 4 °C 下风干. 将 HeLa 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 12 孔板中, 细胞融合度约 80%, 孵育 12 h. 分别

加入 5-FU (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为阳性对照组, 加入 DMSO 作为阴性对照组, 将不同浓度的化合物 **6b** (2.5, 5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为实验组的药物, 孵育 24 h. 随后使用胰酶消化各孔细胞, 用体积分数为 0.2% 的 BSA 无血清培养基重悬细胞. 将 100  $\mu\text{L}$  单细胞悬液加入上室. 下室中加入 650  $\mu\text{L}$  体积分数为 10% 的 FBS 的 DMEM 培养基. 在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱孵育 24~36 h, 随后用棉签擦去未侵袭过的细胞, 用质量分数为 4% 的多聚甲醛 PBS 溶液固定细胞 20 min, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 随后使用质量分数为 0.05% 的结晶紫溶液染色 20 min. 用清水清洗包被侵袭小室并晾干, 然后用倒置显微镜拍摄包被侵袭小室细胞图像, 用 ImageJ 软件计算侵入细胞数量.

在黏附实验中, 将 HeLa 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种在 12 孔板中, 细胞融合度约 80%, 置于培养箱中孵育 12 h. 吸去上层清液, 每孔加入 1 mL 待测药物, 同时加入阴性对照 DMSO 和阳性对照 5-FU. 在相同培养条件下培养 24 h. 将处理的肿瘤细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种在铺胶的 96 孔板中, 设 3 个重复孔, 在其四周铺上 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液, 防止边缘液体蒸发. 放入 37  $^{\circ}\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h. 吸弃上层清液, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT, 继续培养 4 h. 随后弃去上层清液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO, 置于振荡器上振荡 5~10 min, 在显微镜下观察无晶体, 随后用酶标仪测量 490 nm 波长的吸光度.

1.2.9 细胞克隆形成实验 参照文献[24]方法, 先将对数期生长的 HeLa 细胞接种在 12 孔板中, 待细胞黏附后, 将含有不同浓度化合物 **6b** (2.5, 5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 和阳性对照药物 5-FU (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的培养基加入每个孔中, 同时建立 DMSO 阴性对照组. 给药 6 h 后, 更换含有体积分数 10% 的 FBS 的 DMEM 培养基, 继续培养 14 d, 培养基每 7 d 更换 1 次. 克隆形成后, 洗涤培养板, 并用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 20~30 min, 然后用质量分数为 0.05% 的结晶紫染色溶液染色 30 min, 观察细胞集落的形成. 最后, 使用 ImageJ 软件对孔板进行倒置、拍照和计数, 以细胞克隆增殖抑制率 (Inhibition rate, %) 评估化合物 **6b** 对 HeLa 细胞克隆的抑制作用:

$$\text{Inhibition rate} = \frac{1 - \text{OD}_{\text{exp}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100\%$$

式中:  $\text{OD}_{\text{exp}}$  为实测紫外吸光度;  $\text{OD}_{\text{control}}$  为空白样品紫外吸光度.

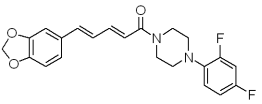
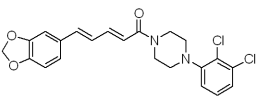
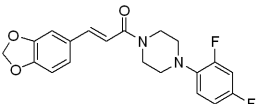
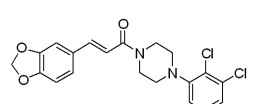
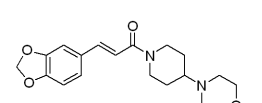
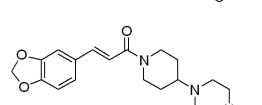
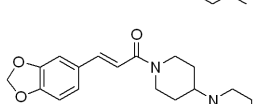
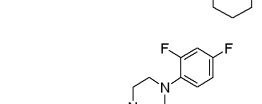
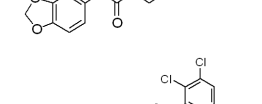
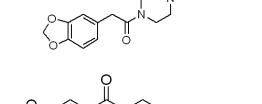
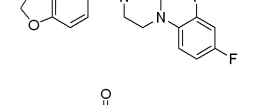
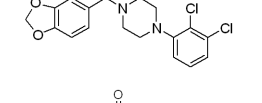
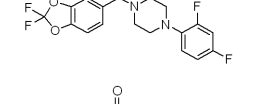
1.2.10 鸡胚绒毛尿囊膜实验 绒毛尿囊膜实验 (CAM 实验) 以鸡胚为载体, 主要用于研究体内肿瘤的形成、血管生成和转移. 利用 CAM 实验可有效评价药物对肿瘤细胞体内增殖的抑制能力, 参照文献 [25, 26] 方法, 所有动物实验均遵循动物伦理委员会的标准. 种蛋购自中国安徽铜陵五峰养鸡场. 将鸡胚胎在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 7 d. 使用基质胶和 DMEM 悬浮液 (体积比 1:1) 混合物重新悬浮 HeLa 细胞, 并稀释至  $2 \times 10^6$  cell/mL. 将重新悬浮的 HeLa 细胞植入鸡胚的毛细血管中. 实验组由阴性对照组 (DMSO)、阳性对照组 5-FU (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 和化合物 **6b** 的 3 个不同浓度 (2.5, 5 和 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 的实验组组成, 每组 6 个鸡胚. 在肿瘤细胞植入 4 d 后, 将不同浓度的化合物 **6b** 和阳性药物 5-FU 分别加入到鸡胚尿囊膜中. 在药物治疗 3 d 后, 切除肿瘤, 拍照, 称重并记录, 以肿瘤的质量以及鸡胚中血管生成情况作为评价化合物 **6b** 体内抗肿瘤能力的指标.

## 2 结果与讨论

### 2.1 MTT 实验结果

为考察结构改造对胡椒碱衍生物活性的影响, 采用 MTT 法评估了胡椒碱-双环酰胺衍生物对 HeLa, MDA-MB-231 和 293T 细胞系的体外抗增殖活性, 结果列于表 1. 可见, 大多数化合物对 HeLa 细胞和 MDA-MB-321 细胞增殖的抑制作用明显; 与胡椒碱相比, 目标化合物对正常肾细胞 293T 的毒性较低, 说明该类化合物对肿瘤细胞有较好的选择性. 用双环结构取代哌啶环导致该类化合物抗肿瘤活性显著增强; 此外, 缩短脂肪链的长度或用氟原子取代苯并二恶茂环亚甲基上的氢也显著提高了其抗肿瘤活性. 化合物 **6b** 对 HeLa 细胞 [ $\text{IC}_{50} = (3.49 \pm 0.42) \mu\text{mol/L}$ ] 和 MDA-MB-321 细胞 [ $\text{IC}_{50} = (20.89 \pm 0.44) \mu\text{mol/L}$ ] 均有明显的抑制作用, 优于阳性对照组 5-FU [ $\text{IC}_{50} = (42.07 \pm 0.74) / (33.79 \pm 0.85) \mu\text{mol/L}$ ], 对 HeLa 细胞的抑制作用更明显.

**Table 1 Antiproliferative activities of target compounds against two cancer cells and one normal cell\***

Compd.	Structure	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )		
		293T	HeLa	MDA-MB-321
2a		>100	26.85±1.65	53.34±9.40
2b		59.44±9.11	21.62±2.18	83.29±26.95
3a		82.28±11.87	51.33±3.44	>100
3b		55.24±2.41	54.34±6.39	44.64±1.85
3c		>100	34.00±1.17	>100
3d		>100	53.23±3.10	>100
3e		>100	79.97±3.58	>100
4a		>100	12.93±0.64	>100
4b		45.22±3.66	24.70±2.57	28.43±3.98
5a		87.35±8.00	4.30±0.12	>100
5b		27.07±1.23	8.59±0.65	>100
6a		41.99±5.80	22.82±0.51	>100
6b		45.34±2.75	3.49±0.42	20.89±0.44
Piperine		42.77±7.61	44.03±3.23	239.03±37.49
5-Fu		107.72±8.92	42.07±0.74	33.79±0.85

\* Data was expressed as the mean±SE from the dose-response curves of at least three independent experiments with three determinations in each.

## 2.2 化合物 6b 对 HeLa 细胞的迁移及黏附实验结果

基于 MTT 结果, 选择对 HeLa 细胞表现出最佳抑制活性的化合物 6b, 通过黏附和迁移实验进一步研究其在体外抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的作用. 结果表明, 随着化合物 6b 剂量的增加, 迁移细胞的数量明显减少, 结果如图 1(A) 和 (B) 所示. 化合物 6b 在不同浓度下对 HeLa 细胞的抑制率如下: 2.5  $\mu\text{mol/L}$  [(22.73 $\pm$ 4.85)%]; 5  $\mu\text{mol/L}$  [(42.61 $\pm$ 3.98)%]; 10  $\mu\text{mol/L}$  [(86.55 $\pm$ 5.91)%], 相比于相同浓度的阳性对照药 5-FU [10  $\mu\text{mol/L}$ , (50.95 $\pm$ 2.86)%], 化合物 6b 抑制细胞迁移能力优于 5-FU.

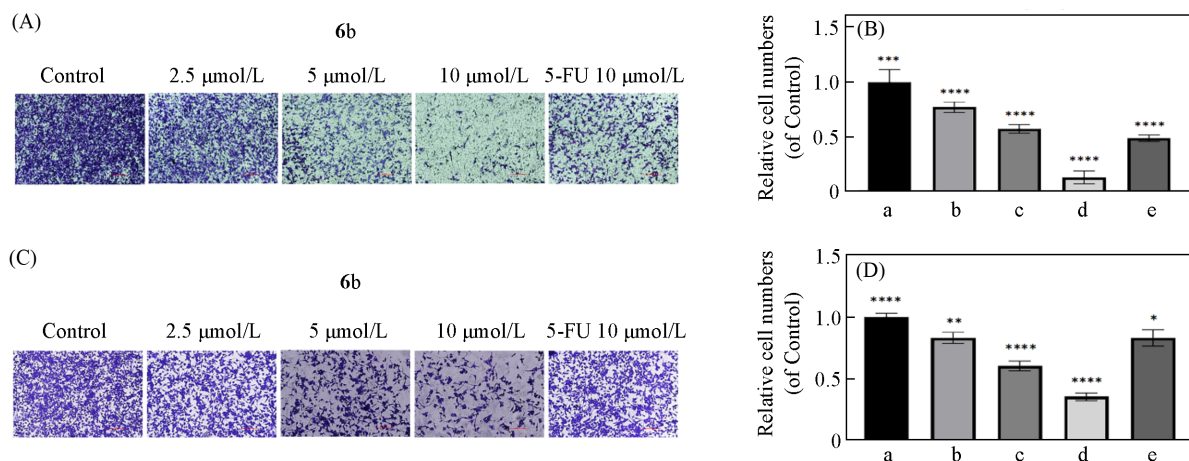


Fig. 1 Schematic diagrams(A, C) and statistics(B, D) of the effects of compounds 6b and 5-FU on the migration(A, B) and adhesion ability(C, D) of HeLa cells in 24 h

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . a. Control; b. 6b, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ; c. 6b, 5  $\mu\text{mol/L}$ ; d. 6b, 10  $\mu\text{mol/L}$ ; e. 5-FU, 10  $\mu\text{mol/L}$ .

用不同浓度的化合物 6b 处理 HeLa 细胞后所得细胞黏附结果如图 1(C) 和 (D) 所示, 细胞黏附率分别为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  (82.93%), 5  $\mu\text{mol/L}$  (60.36%) 和 10  $\mu\text{mol/L}$  (35.51%). 与相同浓度的 5-FU (10  $\mu\text{mol/L}$ , 82.83%) 处理结果相比, 化合物 6b 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时对癌症细胞黏附具有较好的抑制作用, 且化合物 6b 浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 即可达到与 10  $\mu\text{mol/L}$  5-FU 接近的效果.

上述结果表明, 化合物 6b 对 HeLa 细胞的体外迁移及黏附的抑制作用比 5-FU 更强.

## 2.3 化合物 6b 对 HeLa 细胞克隆实验结果

为进一步考察化合物 6b 对 HeLa 细胞的体外增殖抑制效果, 采用不同浓度的化合物 6b (2.5, 5 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 和阳性药物 5-FU (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别处理 HeLa 细胞, 随后孵育细胞, 形成克隆. 研究结果表明, 随着化合物 6b 剂量的增加, 细胞克隆数量明显减少. 由图 2(A) 和 (B) 可见, 随着化合物 6b 浓度的增加, 细胞的增殖能力下降, 化合物 6b 浓度与细胞增殖率关系如下: 2.5  $\mu\text{mol/L}$ , (77.27 $\pm$ 4.85)%; 5  $\mu\text{mol/L}$ , (57.39 $\pm$ 3.98)%; 10  $\mu\text{mol/L}$ , (13.45 $\pm$ 5.91)%. 值得注意的是, 浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  的阳性药物 5-FU 处理后的细胞增殖率为 (49.05 $\pm$ 2.86)%, 远低于相同浓度的化合物 6b 处理组, 可见化合物 6b 对 HeLa 细胞体外增殖有更好的抑制作用.

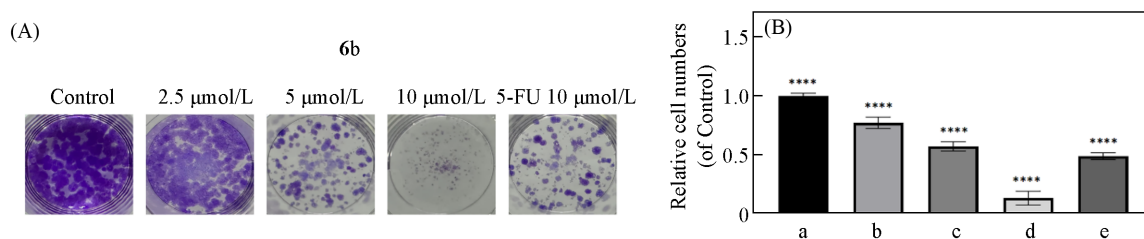


Fig. 2 Schematic diagrams(A) and statistics(B) of the effects compounds 6b and 5-Fu inhibited the clone ability of HeLa cells in 24 h

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . a. Control; b. 6b, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ; c. 6b, 5  $\mu\text{mol/L}$ ; d. 6b, 10  $\mu\text{mol/L}$ ; e. 5-FU, 10  $\mu\text{mol/L}$ .

## 2.4 化合物 6b 的 CAM 实验结果

体外实验结果表明, 化合物 6b 对 HeLa 细胞的增殖、黏附和迁移具有良好的抑制作用. 为进一步评价体内条件下化合物 6b 对 HeLa 细胞的抑制效果, 采用接种 HeLa 细胞的鸡胚作为受试对象进行测试. 首先给鸡胚接种 HeLa 细胞, 培养 11 d 后, 将鸡胚随机分为 5 组, 其中 3 组分别给予 3 种浓度化合物 6b (2.5, 5 和 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 1 组给予 5-FU (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 给药后培养 3 d 后, 观察鸡胚血管生成情况与肿瘤质量变化. 结果表明, 药物对血管生成抑制情况存在剂量依赖性, 结果如图 3(A) 和 (B) 所示. 化合物 6b 的浓度对应鸡胚的血管生成率分别为 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (91.97 $\pm$ 4.27)%; 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (74.69 $\pm$ 5.93)%; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (53.41 $\pm$ 3.66)%; 而 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  阳性药物 5-FU 的血管生成率为 (78.52 $\pm$ 4.02)%. 上述结果表明, 相同浓度的化合物 6b 对肿瘤血管生成的抑制作用比 5-FU 更明显.

另一方面, 肿瘤的质量同样存在剂量依赖性. 通过数据对比发现, 高剂量化合物 6b 对肿瘤抑制效果显著 [图 3(C) 和 (D)]. 化合物 6b 的浓度与肿瘤质量关系如下: 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (28.17 $\pm$ 1.17) mg; 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (15 $\pm$ 1.41) mg; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , (8.17 $\pm$ 0.75) mg. 使用 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  5-FU 处理后肿瘤质量为 (14.5 $\pm$ 1.05) mg. 结果表明相同浓度下的化合物 6b 对肿瘤生长抑制能力强于阳性对照药 5-FU.

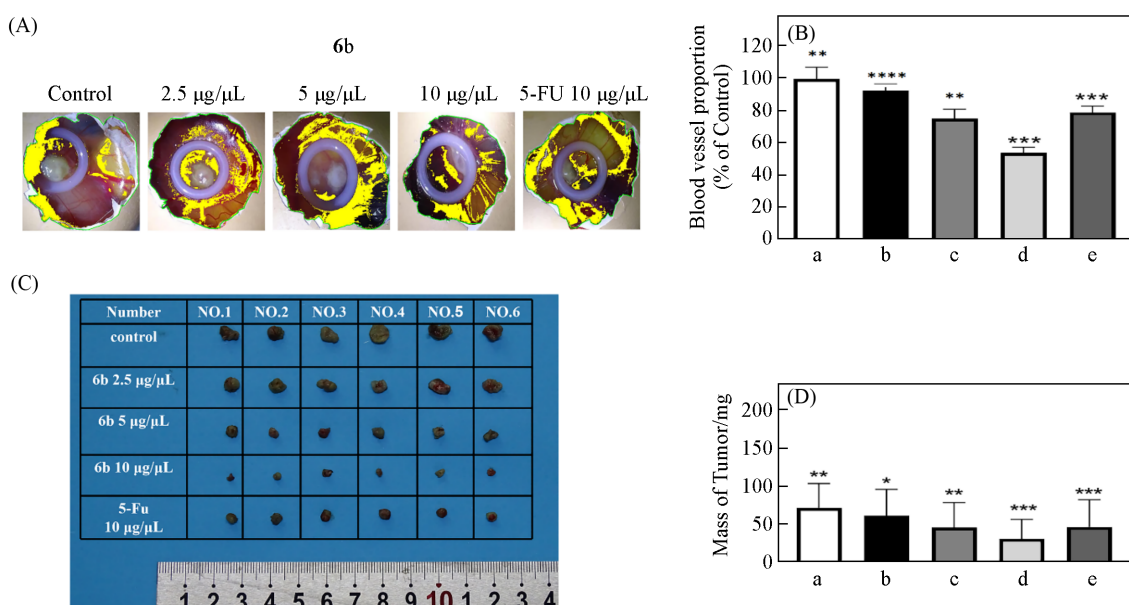


Fig. 3 Schematic diagrams(A, C) and statistics(B, D) of the effects of compounds 6b and 5-FU on chick embryo blood vessel(A, B) and chicken embryo xenograft tumors(C, D) of HeLa cells *in vivo*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . a. Control; b. 6b, 2.5  $\mu\text{mol/L}$ ; c. 6b, 5  $\mu\text{mol/L}$ ; d. 6b, 10  $\mu\text{mol/L}$ ; e. 5-FU, 10  $\mu\text{mol/L}$ .

## 3 结 论

合成了 13 个胡椒碱-双环酰胺衍生物, MTT 实验结果表明, 部分目标化合物的抗肿瘤活性明显优于阳性对照药 5-FU 和胡椒碱. 其中, 化合物 6b 对 HeLa 细胞抗增殖的  $\text{IC}_{50}$  值为 3.49  $\mu\text{mol/L}$ , 对 MDA-MB-321 细胞的  $\text{IC}_{50}$  值为 20.89  $\mu\text{mol/L}$ . 化合物 6b 不仅对 HeLa 细胞的迁移、黏附及克隆能力有很强的抑制作用; CAM 实验结果也表明, 其体内抗肿瘤活性明显高于 5-FU. 因此, 化合物 6b 有良好的体内外抗肿瘤活性, 可作为抗肿瘤药物的先导化合物进行深入研究.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20230520>.

## 参 考 文 献

[1] Wei Y., Lin S. T., Zhi W. H., Chu T., Liu B. H., Peng T., Xu M. C., Ding W. C., Cao C. H., Wu P., *J. Med. Virol.*, 2023, 95(3),

e28656

- [ 2 ] Franklin E. F., Dean M. S., Johnston D. M., Nevidjon B. M., Burke S. L., Booth L. M. S., *Cancer*, **2022**, *128*, 2669—2672
- [ 3 ] Ouyang D. Y., Zeng L. H., Pan H., Xu L. H., Wang Y., Liu K. P., He X. H., *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *60*, 424—430
- [ 4 ] Sahsuvar S., Guner R., Gok O., Can O., *Sci. Rep.*, **2023**, *13*(1), 18225
- [ 5 ] Lv Y. Y., Zhu J. J., Huang S. H., Xing X. L., Zhou S., Yao H., Yang Z., Liu L., Huang S. S., Miao Y. Y., Liu X. Q., Fernie A. R., Ding Y. H., Luo J., *Plant J.*, **2023**, *117*(1), 107—120
- [ 6 ] Derosa G., Maffioli P., Sahebkar A., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2016**, *928*, 173—184
- [ 7 ] Hou X. M., Zhang C. X., Wang L. M., Wang K. W., *J. Nat. Prod.*, **2021**, *84*(2), 373—381
- [ 8 ] Haq I. U., Imran M., Nadeem M., Tufail T., Gondal T. A., Mubarak M. S., *Phytother. Res.*, **2021**, *35*(2), 680—700
- [ 9 ] Manayi A., Nabavi S. M., Setzer W. N., Jafari S., *Curr. Med. Chem.*, **2018**, *25*(37), 4918—4928
- [ 10 ] Mitra S., Anand U., Jha N. K., Shekhawat M. S., Saha S. C., Nongdam P., Rengasamy K. R. R., Proćków J., Dey A., *Front. Pharmacol.*, **2021**, *12*, 772418
- [ 11 ] Aumeeruddy M. Z., Mahomoodally M. F., *Cancer*, **2019**, *125*(10), 1600—1611
- [ 12 ] Qi Y. B., Yao L., Liu J. K., Wang W., *J. Orthop. Surg. Res.*, **2023**, *18*(1), 180
- [ 13 ] Bakshi H., Nagpal M., Singh M., Dhingra G. A., Aggarwal G., *Curr. Mol. Pharmacol.*, **2021**, *14*(4), 477—486
- [ 14 ] Rajarajan D., Natesh J., Penta D., Meeran S. M., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, *69*(51), 15562—15574
- [ 15 ] Cardoso L. P., de Sousa S. O., Gusson-Zanetoni J. P., Silva L. L. D. M. D. M., Frigieri B. M., Henrique T., Tajara E. H., Oliani S. M., Rodrigues-Lisoni F. C., *Pharmaceuticals*, **2023**, *16*(1), 103
- [ 16 ] de Almeida G. C., Oliveira L. F. S., Predes D., Fokoue H. H., Kuster R. M., Oliveira F. L., Mendes F. A., Abreu J. G., *Sci. Rep.*, **2020**, *10*(1), 11681
- [ 17 ] Afreen, Salahuddin, Mazumder A., Joshi S., Kumar R., Yar M. S., Ahsan M. J., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2021**, *21*(30), 2715—2751
- [ 18 ] Chavarria D., Silva T., Silva D. M. E., Remião F., Borges F., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2016**, *26*(2), 245—264
- [ 19 ] Elimam D. M., Elgazar A. A., El-Senduny F. F., El-Domany R. A., Badria F. A., Eldehna W. M., *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2022**, *37*(1), 39—50
- [ 20 ] Frolov N. A., Vereshchagin A. N., *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, *24*(3), 2937
- [ 21 ] Liang X. X., Zhang L., Li F. L., Luan S. X., He C. L., Yin L. Z., Yin Z. Q., Zou Y. F., Yue G. Z., Li L. X., Song X., Lv C., Zhang W., Jing B., *Future Med. Chem.*, **2020**, *12*(3), 223—242
- [ 22 ] Nehra B., Mathew B., Chawla P. A., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2022**, *22*(6), 493—528
- [ 23 ] Jafri A., Siddiqui S., Rais J., Ahmad M. S., Kumar S., Jafar T., Afzal M., Arshad M., *Excli J.*, **2019**, *18*, 154—164
- [ 24 ] Song L. Y., Wang Y., Zhen Y. H., Li D. K., He X. D., Yang H., Zhang H. Y., Liu Q., *Biotechnol. Lett.*, **2020**, *42*(10), 2049—2058
- [ 25 ] DeBord L. C., Pathak R. R., Villaneuva M., Liu H. C., Harrington D. A., Yu W. D., Lewis M. T., Sikora A. G., *Am. J. Cancer Res.*, **2018**, *8*(8), 1642—1660
- [ 26 ] Komatsu A., Matsumoto K., Saito T., Muto M., Tamanoi F., *Cells*, **2019**, *8*(5), 440

(Ed.: L, W, K)