

2-苯基苯并咪唑类化合物的设计、合成及抗肿瘤活性评价

余梓楷,尚一帆,魏雅婷,黄新羽,张欣,王涛*

(广州中医药大学 中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 设计并合成一系列 2-苯基苯并咪唑类化合物,以期发现具有较好抗肿瘤活性的苯并咪唑类先导化合物。方法 基于分子对接研究设计一类 2-苯基苯并咪唑类化合物,以 4-取代苯甲醛和邻苯二胺为起始原料,经环合、亲核取代等反应合成 12 个目标化合物。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法考察目标化合物对 5 种人源肿瘤细胞(宫颈癌 HeLa 细胞、肺癌 A549 细胞、肝癌 HepG2 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞和结肠癌 HT-29 细胞)的体外抗增殖活性,进一步采用 Swiss ADME 在线预测目标化合物的成药性。此外,利用紫外分光光度法对带有硝酸酯支链的 2-苯基苯并咪唑类化合物的体外一氧化氮释放能力进行测定,探究其协同抗肿瘤效应。结果 所设计的目标化合物结构均经¹H-NMR、¹³C-NMR 及高分辨质谱确证。体外抗肿瘤活性测试结果表明,部分化合物具有较好的体外抗肿瘤活性,其中化合物 5d 活性最为突出,其对乳腺癌 MCF-7 细胞(IC₅₀ = 4.11 μmol·L⁻¹)和结肠癌 HT-29 细胞(IC₅₀ = 4.86 μmol·L⁻¹)的抑制作用明显优于阳性药顺铂,对肺癌 A549 细胞(IC₅₀ = 5.86 μmol·L⁻¹)的抑制活性与阳性药顺铂相当。此外,化合物 5d 的一氧化氮释放度最高,且 Swiss ADME 平台预测其具有优良的成药性。结论 化合物 5d 具有突出的抗肿瘤潜力和良好的成药性,可作为极具潜力的先导化合物,为基于苯并咪唑骨架的抗肿瘤药物研究奠定了一定基础。

关键词:2-苯基苯并咪唑;设计与合成;抗肿瘤活性;分子对接;成药性

中图分类号:R914

文献标志码:A

随着肿瘤发病率和死亡人数不断上升,肿瘤已经成为世界范围内重大公共卫生问题^[1]。在众多治疗方法中,化疗至今仍是重要的治疗手段之一。然而,传统化疗药物因缺乏对肿瘤细胞的特异性识别,在杀伤肿瘤细胞的同时也会损害正常细胞,进而引发严重不良反应并可能诱导耐药性的产生,最终导致治疗效果不理想。因此,开发高效、低毒的抗肿瘤药物成为药物化学领域的一个热点研究方向。

自然界中广泛存在的含氮杂环化合物在医药、农业等领域均有重要应用价值,其中苯并咪唑类化合物是较早发现的代表性化合物之一。苯并咪唑的芳香稠杂环结构可通过氢键、 π - π 堆积及疏水作用等多重分子间作用力与生物靶标结合^[2],这些非共价相互作用的协同效应使其在药物研发中备受关注,目前已有多个含苯并咪唑骨架的药物经美国 FDA 批准上市^[3]。构效关系分析证实,苯并咪唑这类刚性平面杂环化合物能够作用于多个药物靶点,无论是作为优势骨架还是

药效团,其在多靶点抗肿瘤药物研究领域显示出巨大的应用潜力^[4]。而且,苯并咪唑结构骨架能进行多位点修饰,经修饰获得的衍生物可对多种激酶产生抑制作用^[5],表现出优异的抗肿瘤活性。苯并咪唑衍生物主要通过诱导细胞凋亡^[6]、抑制细胞增殖^[7]、调节细胞信号传导^[8]等机制发挥抗肿瘤作用。此外,苯并咪唑类化合物还具有较好的成药性,如适宜的脂水分配系数、良好的生物利用度和较低的毒性,被认为是一类有前景的抗肿瘤药物候选结构^[9]。

腺苷 5'-单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)是一种异三聚体丝氨酸/苏氨酸激酶复合物,曾一度被认为可能具有抑制致癌雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号传导的功能。研究证实 AMPK 激活或与某些肿瘤抑制信号协同影响细胞增殖和周期进程^[10]。mTOR 是细胞生长和分裂的主要调节因子,通常肿瘤细胞会过度激活 AKT/mTOR 信号通路,因此,mTOR 抑制剂如 ATG-008、AZD-3147 等在肿瘤靶向治疗中已有广泛应用^[11]。研究表

收稿日期:2025-01-09

基金项目:国家自然科学基金项目(81774193);广州中医药大学创新创业训练计划资助项目(202410572088)

作者简介:余梓楷(2003-),男(汉族),广东汕头人,E-mail:3546717431@qq.com; *通信作者:王涛(1970-),女(汉族),湖南邵阳人,教授,主要从事天然有效成分结构修饰及活性评价研究,E-mail:wangtao@gzucm.edu.cn。

明,苯并咪唑类化合物可通过作用于 AMPK 及 mTOR 发挥抗肿瘤作用^[12-13],且部分抗肿瘤衍生物已进入临床试验阶段,甚至在临床治疗中得以应用^[14]。然而,该类衍生物存在易产生耐药性和不良反应等问题,因此,通过各种策略对苯并咪唑类衍生物开展深入研究与结构优化始终是该领域持续探索的方向。

一氧化氮(NO)是首个在生物体内发现的气体信号分子,可以直接穿透细胞膜进行信号传导,参与机体各系统的生理过程,在循环调节、神经传导、抗感染等方面展现出独特的生物学功能。研究发现,使用外源性 NO(NO 供体)可在体内释放高浓度 NO,从而产生多种活性氮物质诱导 DNA 损伤和线粒体功能障碍,最终触发细胞程序性死亡,因此,NO 供体可作为抗肿瘤药物使用^[15-16]。但 NO 在体内半衰期短,靶向性差,致使 NO 供体抗肿瘤效果十分有限。联合治疗或将 NO 供体与抗肿瘤药物缀合是解决 NO 供体抗肿瘤效果不足的有效策略^[17]。本课题组曾应用该策略对多种具有抗肿瘤活性的天然化学成分进行修饰研究,发现在抗肿瘤天然成分骨架中设计引入 NO 供体可明显提高原母体的体外抗肿瘤活性,且降低了

毒性和不良反应^[18-19],上述研究成果为本课题的设计提供了借鉴思路。

基于上述认识,本文作者以苯并咪唑骨架为母核开展衍生物设计,并利用苯甲醛和邻苯二胺缩合反应构建苯并咪唑骨架,同时在 N-1 位、2 号位苯环对位引入不同的基团,合成系列 2-苯基苯并咪唑类化合物,采用体外 MTT 法结合 ADME 成药性评价对所合成的化合物进行筛选,同时针对其中连有硝酸酯结构片段的衍生物通过体外 NO 释放度测定评估其作为 NO 供体的潜力,以期获得具有较好活性的苯并咪唑类似物,为苯并咪唑骨架相关抗肿瘤药物的研究提供实验基础和理论依据。

1 目标化合物的设计及合成路线

将 2-苯基苯并咪唑结构分别与 AMPK (PBD:6bx6) 和 mTOR (PBD:4drj) 进行分子对接研究,发现其与两个蛋白均展现出良好的结合能力,结合能分别为 $-6.6 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-8.6 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。进一步对 2-苯基苯并咪唑进行 2D 可视化及分子 20 Å 范围内作用力分析,结果见图 1。

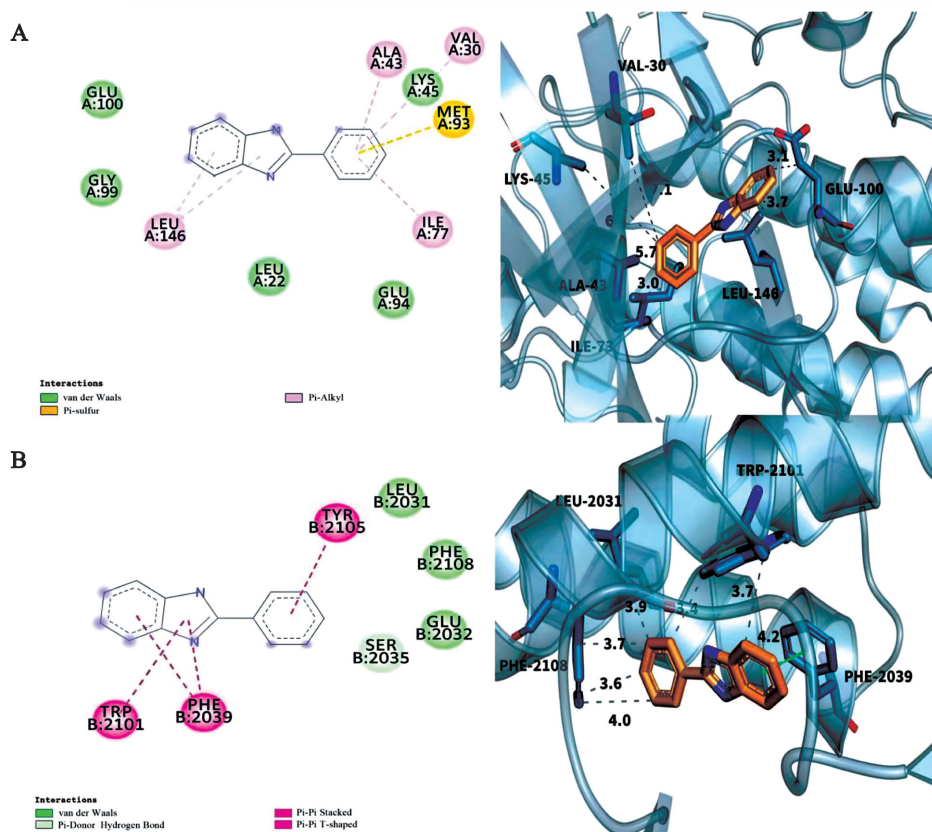


Figure 1 Molecular docking of 2-phenylbenzimidazole with AMPK (PBD:6bx6, A) and mTOR (PBD:4drj, B)

2-苯基苯并咪唑母核的 2 位苯基占据了由 Ala-43、Val-30 和 Lys-45 等氨基酸残基构成的 AMPK 蛋白疏水口袋并与 Met-93 形成 π -硫键, 苯并咪唑结构片段与 AMPK 铰链区 Leu-146 形成疏水相互作用; 母核与 mTOR 蛋白的 Trp-2101、Phe-2039、Tyr-2105 形成了 π - π 堆积相互作用, 2 位苯基与多种氨基酸残基形成弱疏水相互作用。

前期构效关系研究发现, 苯并咪唑 2 位被脂肪族、芳香族(含杂环)修饰均可明显提高抗肿瘤

活性, 对 2 位的苯基进行取代修饰或在咪唑环氮上引入脂肪族支链均有利于提高化合物的抗肿瘤活性。此外, 引入硝酸酯支链可通过释放 NO, 增强化合物在肿瘤微环境中的细胞毒性。综上, 本文作者提出以下设计思路: 保留 2-苯基苯并咪唑母核结构, 在 R^1 位引入电子效应不同的取代基, 或在 R^2 位引入疏水性基团或具抗肿瘤作用的基团(NO 供体片段)^[20], 以期增强化合物的抗肿瘤活性, 改善脂水分配系数, 提高成药性(图 2)。

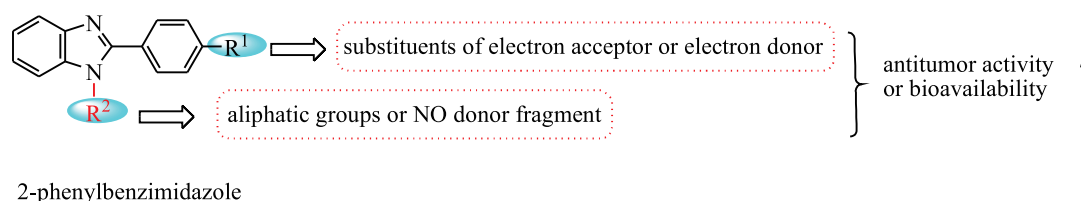
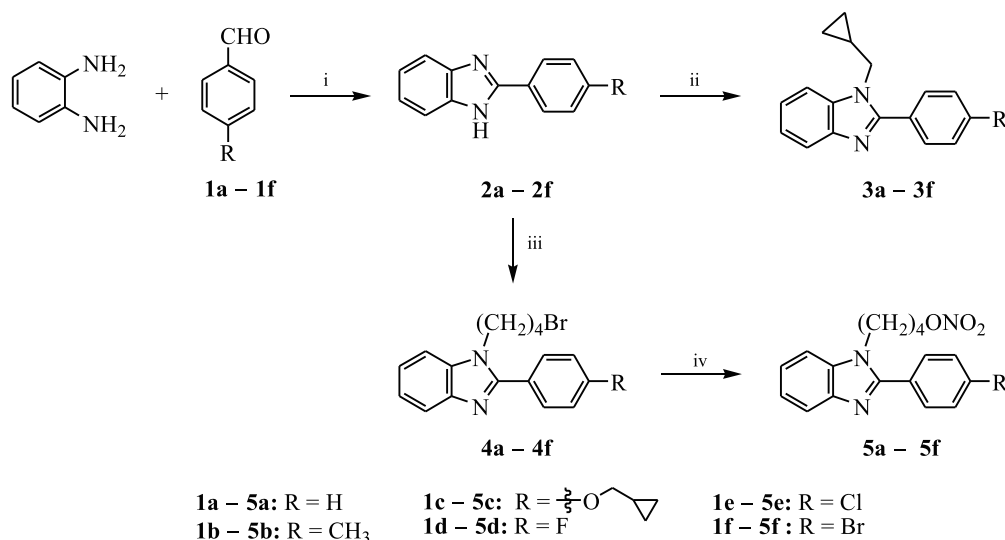


Figure 2 Design strategy of 2-phenylbenzimidazole derivatives

目标化合物的合成路线如图 3 所示。以不同取代的苯甲醛(**1a**~**1f**)和邻苯二胺为原料, 在焦亚硫酸钠催化下经缩合反应生成关键中间体, 即苯并咪唑的芳香骨架(**2a**~**2f**), **2a**~**2f** 经亲核取代反应在 N-1 位引入亚甲基环丙烷, 得到目标化

合物 **3a**~**3f**; 中间体 **2a**~**2f** 与 1,4-二溴丁烷经亲核取代反应生成含溴支链的中间体 **4a**~**4f**, **4a**~**4f** 进一步经基团间转化在 N-1 位引入硝酸酯支链, 得到目标化合物 **5a**~**5f**。



Reagents and conditions: i) Na₂S₂O₅, DMF/H₂O, 80 °C, 45 min; ii) (bromomethyl) cyclopropane, Cs₂CO₃, acetone, reflux, 24 h; iii) 1,4-dibromobutane, Cs₂CO₃, acetone, reflux, 24 h; iv) MeCN, AgNO₃, 50 °C, 24 h.

Figure 3 Synthetic routes to target compounds

2 合成实验

化合物熔点采用 X-4A 显微熔点仪测定(上海仪电物理光学仪器有限公司), 温度未经校正; 核磁共振谱采用 AVANCE III HD 400 核磁共振

波谱仪测定(瑞士 Bruker 公司), TMS 为内标; 质谱采用 AB SCIEX Triple TOF5600 + LC-MS/MS System 高分辨质谱仪测定(美国 AB Sciex 公司)。实验所用其他试剂及试药均为市售分析纯。

2.1 4-环丙甲氧基苯甲醛(1c)的合成

取0.31 g(2.5 mmol)对羟基苯甲醛、1.24 g(3.8 mmol)碳酸铯置于50 mL圆底烧瓶中,加入8 mL丙酮和0.84 g(6.2 mmol)溴甲基环丙烷,搅拌回流反应,TLC监测反应进程,约6 h反应结束。向反应液中加入15 mL蒸馏水,用乙酸乙酯(20 mL×3)萃取,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(25 mL×2)洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩滤液,剩余物经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比10:1),得无色油状液体0.35 g,收率80.1%。

2.2 2-(4-取代苯基)苯并咪唑(2a~2f)的合成通法

取0.26 g(2.4 mmol)邻苯二胺、2.2 mmol取代苯甲醛**1a~1f**、0.49 g(2.6 mmol)焦亚硫酸钠置于50 mL圆底烧瓶中,加入9 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和1 mL蒸馏水的混合溶剂,充分溶解,80 °C搅拌反应,TLC监测反应进程,约45 min反应结束。将圆底烧瓶置于冰水中冷却,加入适量水,适当震荡后有固体析出,抽滤,用石油醚-二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂洗涤,干燥,得到关键中间体**2a~2f**。**2a~2e**均为白色固体,**2f**为淡黄色固体,收率75.6%~83.1%。

2.3 目标化合物 *N*-1-(环丙基甲基)-2-(4-取代苯基)苯并咪唑(3a~3f)的合成通法

在50 mL圆底烧瓶中加入1.0 mmol中间体**2a~2f**、0.42 g(1.3 mmol)碳酸铯和8 mL丙酮,充分混合,加入0.27 g(2.0 mmol)(溴甲基)环丙烷,搅拌回流反应,TLC监测反应进程,约24 h反应结束。向反应液中加入15 mL蒸馏水,用乙酸乙酯(20 mL×3)萃取,合并有机相,用饱和氯化钠水溶液(25 mL×2)洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩滤液,剩余物经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比15:1),得到化合物**3a~3f**,收率68.4%~74.1%。

N-1-(环丙基甲基)-2-苯基苯并咪唑(**3a**):白色油状液体,收率72.5%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{17}H_{17}N_2$ 249.1386 $[M+H]^+$, found 249.1377。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.88~7.80(m, 1H), 7.74~7.67(m, 2H), 7.54~7.49(m, 2H), 7.48~7.44(m, 2H), 7.34~7.27(m, 2H), 4.12(d, $J=6.6$ Hz, 2H), 1.21~1.07(m, 1H), 0.52~0.43(m, 2H), 0.20~0.11(m, 2H)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.8, 143.1, 135.8, 130.8,

129.7, 129.5, 128.7, 122.7, 122.3, 119.9, 110.4, 48.9, 11.3, 4.3。

N-1-(环丙基甲基)-2-(4-甲基苯基)苯并咪唑(**3b**):白色油状液体,收率64.8%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{18}H_{19}N_2$ 263.1543 $[M+H]^+$, found 263.1542。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.90~7.85(m, 1H), 7.67~7.61(m, 2H), 7.51~7.47(m, 1H), 7.35(d, $J=7.4$ Hz, 4H), 4.16(d, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.45(s, 3H), 1.23~1.12(m, 1H), 0.55~0.47(m, 2H), 0.24~0.15(m, 2H)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 153.7, 140.0, 135.6, 129.4(2C), 129.3, 122.8, 122.5, 119.7, 110.4, 49.0, 21.5, 11.3, 4.4。

N-1-(环丙基甲基)-2-(4-环丙基甲氧基苯基)苯并咪唑(**3c**):白色油状液体,收率69.2%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{21}H_{23}N_2O$ 319.1805 $[M+H]^+$, found 319.1802。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.85~7.78(m, 1H), 7.68~7.62(m, 2H), 7.49~7.43(m, 1H), 7.33~7.27(m, 2H), 7.06~7.00(m, 2H), 4.13(d, $J=6.5$ Hz, 2H), 3.88(d, $J=6.9$ Hz, 2H), 1.36~1.27(m, 2H), 0.73~0.64(m, 2H), 0.54~0.47(m, 2H), 0.43~0.35(m, 2H), 0.23~0.15(m, 2H)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 160.2, 153.7, 135.8, 130.9, 130.8, 122.6, 122.3, 119.6, 114.8(2C), 110.3, 72.9, 49.0, 11.3, 10.2, 4.3, 3.2。

N-1-(环丙基甲基)-2-(4-氟苯基)苯并咪唑(**3d**):白色固体, mp 109.4~109.8 °C, 收率67.7%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{17}H_{16}FN_2$ 267.1292 $[M+H]^+$, found 267.1287。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.86~7.80(m, 1H), 7.75~7.68(m, 2H), 7.50~7.45(m, 1H), 7.36~7.28(m, 2H), 7.25~7.18(m, 2H), 4.14~4.08(m, 2H), 1.19~1.09(m, 1H), 0.55~0.47(m, 2H), 0.20~0.13(m, 2H)。¹³C-NMR(100 MHz, $CDCl_3$) δ : 164.8, 162.3, 152.8, 143.0, 135.8, 131.5(d, $J=8.0$ Hz), 127.0(d, $J=3.0$ Hz), 122.9, 122.5, 119.9, 116.0, 115.8, 110.4, 49.0, 11.3, 4.4。

N-1-(环丙基甲基)-2-(4-氯苯基)苯并咪唑(**3e**):白色固体, mp 105.3~106.2 °C, 收率71.9%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{17}H_{16}ClN_2$ 283.0996 $[M+H]^+$, found 283.0986。¹H-NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.86~7.81(m, 1H),

7.70 ~ 7.65 (m, 2H), 7.53 ~ 7.55 (m, 3H), 7.36 ~ 7.29 (m, 2H), 4.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.21 ~ 1.09 (m, 1H), 0.55 ~ 0.48 (m, 2H), 0.22 ~ 0.15 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 152.5, 143.0, 136.0, 135.9, 130.8, 129.3, 129.0, 123.0, 122.5, 120.0, 110.4, 49.0, 11.4, 4.4。

N-1-(环丙基甲基)-2-(4-溴苯基)苯并咪唑 (**3f**): 黄色固体, mp 103.1 ~ 104.0 °C, 收率 67.6%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{BrN}_2$ 327.0491 [M + H]⁺, found 327.0489。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.85 ~ 7.80 (m, 1H), 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.48 ~ 7.44 (m, 1H), 7.35 ~ 7.32 (m, 1H), 7.31 ~ 7.28 (m, 1H), 4.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.18 ~ 1.08 (m, 1H), 0.57 ~ 0.43 (m, 2H), 0.25 ~ 0.09 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 152.6, 143.1, 135.9, 132.0, 131.1, 129.8, 124.3, 123.1 (2C), 122.7, 122.6, 120.1, 120.0, 110.5, 49.1, 11.4, 4.5。

2.4 中间体 4a ~ 4f 的合成通法

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 1.0 mmol 中间体 **2a** ~ **2f**, 0.42 g (1.3 mmol) 碳酸铯, 8 mL 丙酮, 充分混合, 加入 0.76 g (3.5 mmol) 1,4-二溴丁烷, 参照“2.3 项”下的合成方法进行反应, 得到中间体 **4a** ~ **4f**。

2.5 目标物 *N*-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-取代苯基)苯并咪唑 (**5a** ~ **5f**) 的合成通法

在 50 mL 圆底烧瓶中加入 0.5 mmol 中间体 **4a** ~ **4f**, 0.68 g (4.0 mmol) 硝酸银和 5 mL 乙腈, 50 °C 避光反应, TLC 监测反应进程。反应结束后, 过滤, 减压浓缩滤液, 剩余物经硅胶柱色谱分离纯化 (石油醚-乙酸乙酯, 体积比 3:1), 得到目标化合物 **5a** ~ **5f**。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-苯基苯并咪唑 (**5a**): 白色固体, mp 148.5 ~ 149.1 °C, 收率 53.2%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$ 312.1343 [M + H]⁺, found 312.1334。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.90 ~ 7.80 (m, 4H), 7.68 ~ 7.57 (m, 3H), 7.47 ~ 7.38 (m, 2H), 4.37 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.81 ~ 1.68 (m, 2H), 1.57 ~ 1.46 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 154.2, 141.1, 134.9, 131.4, 129.7, 129.6, 129.5, 124.4, 123.9, 119.4, 112.2, 73.3, 44.6,

25.7, 23.5。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-甲基苯基)苯并咪唑 (**5b**): 白色固体, mp 140.3 ~ 140.5 °C, 收率 57.6%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$ 326.1499 [M + H]⁺, found 326.1491。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.83 ~ 7.78 (m, 1H), 7.77 ~ 7.71 (m, 1H), 7.66 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.43 ~ 7.36 (m, 1H), 7.35 (t, $J = 8.9$ Hz, 3H), 4.42 ~ 4.29 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 1.79 ~ 1.69 (m, 2H), 1.57 ~ 1.47 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 154.1, 141.5, 140.9, 135.2, 130.0, 129.5, 127.0, 123.9, 123.4, 119.3, 111.9, 73.4, 44.3, 25.7, 23.6, 21.4。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-环丙基甲氧基苯基)苯并咪唑 (**5c**): 白色固体, mp 125.2 ~ 126.1 °C, 收率 43.1%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$ 382.1762 [M + H]⁺, found 382.1760。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.82 ~ 7.75 (m, 2H), 7.75 ~ 7.70 (m, 2H), 7.43 ~ 7.31 (m, 2H), 7.11 ~ 7.04 (m, 2H), 4.45 ~ 4.29 (m, 4H), 3.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.27 ~ 1.22 (m, 1H), 0.63 ~ 0.57 (m, 2H), 0.38 ~ 0.32 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 160.8, 154.1, 142.0, 135.1, 131.2, 126.2, 123.9, 123.5, 119.2, 115.3, 112.0, 73.1 (2C), 44.4, 25.7, 23.6, 10.5, 3.6。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-氟苯基)苯并咪唑 (**5d**): 白色固体, mp 165.4 ~ 165.8 °C, 收率 61.0%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_3$ 330.1249 [M + H]⁺, found 330.1245。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.88 ~ 7.81 (m, 2H), 7.81 ~ 7.72 (m, 2H), 7.43 ~ 7.38 (m, 2H), 7.37 ~ 7.31 (m, 2H), 4.40 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.80 ~ 1.66 (m, 2H), 1.62 ~ 1.46 (m, 2H)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 164.9, 152.9, 141.7, 135.4, 132.2, 132.1, 123.8, 123.3, 119.5, 116.6, 116.4, 111.9, 73.4, 44.3, 25.8, 23.6。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-氯苯基)苯并咪唑 (**5e**): 白色固体, mp 164.2 ~ 165.1 °C, 收率 63.9%。HR-MS m/z : calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_3$ 346.0953 [M + H]⁺, found 346.0944。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.89 ~ 7.86 (m, 1H),

7.86 ~ 7.83 (m, 1H), 7.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.47 ~ 7.42 (m, 2H), 7.41 ~ 7.31 (m, 2H), 4.39 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.35 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.80 ~ 1.68 (m, 2H), 1.59 ~ 1.47 (m, 2H)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 153.1, 141.1, 134.9, 132.5, 131.8, 128.7, 125.1, 124.5, 124.0, 119.5, 112.3, 73.4, 44.6, 25.7, 23.5。

N-1-(4-硝基氧基丁基)-2-(4-溴苯基)苯并咪唑 (**5f**): 白色固体, mp 163.1 ~ 163.8 °C, 收率 72.3%。HR-MS m/z : calcd. for $C_{17}H_{17}BrN_3O_3$ 390.0447 [M]⁺, found 390.0426。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.84 ~ 7.79 (m, 2H), 7.78 (d, $J = 2.9$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.43 ~ 7.39 (m, 1H), 7.39 ~ 7.29 (m, 1H), 4.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.77 ~ 1.70 (m, 2H), 1.57 ~ 1.50 (m, 2H)。¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 153.1, 141.1, 134.9, 132.5, 131.8, 128.7, 125.1, 124.5, 124.0, 119.5, 112.3, 73.4, 44.6, 25.8, 23.6。

3 体外抗肿瘤活性筛选

采用 MTT 法, 以顺铂 (cisplatin) 为阳性对照药, 以人宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A459、肝癌细胞 HepG2、结肠癌细胞 HT-29、乳腺癌细胞

MCF-7 为测试细胞株, 评价目标化合物的体外抗肿瘤增殖活性。取对数生长期的人源 HeLa、A459、HepG2、HT-29、MCF-7 细胞 (购于中科院上海细胞库), 分别用质量浓度为 0.25% 的 EDTA 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液。使用完全培养基进行稀释调节细胞悬液密度至每毫升 5×10^4 个, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后弃去旧培养基, 分别加入适宜浓度梯度的含药培养基进行处理, 于 37 °C 条件下孵育 48 h。弃去旧培养基, 每孔依次加入 120 μ L 新的培养基和 10 μ L MTT 溶液, 继续 37 °C 条件下避光孵育 4 h。吸去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10 min, 采用 Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo 公司) 在 570 nm 波长处测定每孔 OD 值。平行设置空白组 (仅含完全培养基)、阴性对照组 (仅含细胞、完全培养基)、不同浓度药物实验组、阳性药顺铂实验组 (含顺铂、细胞、完全培养基), 每组数据平行测定 3 次, 求其平均值。按如下公式计算得到各种化合物对肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{抑制率}\% = \left[1 - \left(\frac{\text{实验组 OD} - \text{空白组 OD}}{\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD}} \right) \right] \times 100\%$$

采用 GraphPad Prism 软件以药物各浓度的负对数对抑制率进行拟合计算, IC₅₀ 值结果用平均数 \pm 标准差表示。具体结果见表 1。

Table 1 IC₅₀ values of 2-phenylbenzimidazole derivatives against five tumor cells proliferation

Compd.	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ^a				
	HeLa	A549	HepG2	MCF-7	HT-29
3a	43.99 \pm 1.11	16.48 \pm 0.05	40.37 \pm 1.39	16.8 \pm 0.98	13.87 \pm 1.41
3b	>50	>50	>50	>50	>50
3c	>50	>50	>50	>50	>50
3d	>50	>50	>50	>50	>50
3e	>50	>50	>50	>50	>50
3f	>50	>50	>50	29.87 \pm 0.30	11.62 \pm 0.19
5a	>50	>50	>50	>50	>50
5b	>50	>50	>50	>50	>50
5c	>50	>50	>50	>50	>50
5d	35.88 \pm 1.59	5.86 \pm 0.08	30.57 \pm 1.09	4.11 \pm 0.45	4.86 \pm 0.02
5e	41.66 \pm 0.95	8.02 \pm 0.03	39.66 \pm 0.85	19.67 \pm 0.82	11.25 \pm 0.15
5f	>50	12.43 \pm 0.42	>50	27.10 \pm 0.35	15.63 \pm 0.57
cisplatin	14.02 \pm 1.42	5.44 \pm 0.24	6.47 \pm 0.32	19.20 \pm 0.62	17.60 \pm 0.47

a: Values were expressed as means \pm SD of three independent experiments.

4 体外一氧化氮释放度测定

采用实验室前期建立的方法^[21]对带有硝酸酯支链的化合物(5a~5f)进行体外 NO 释放度测定,进一步考察目标化合物体外抗肿瘤活性与 NO 释放度之间的关系。将目标化合物适量配置成浓度为 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DMSO 溶液,分别取 1.0 mL,用含有过量 L-半胱氨酸的磷酸缓冲溶液(取 3.4 g 磷酸二氢钾,加入 197.5 mL 浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液和 0.3 g L-半胱氨

酸,用蒸馏水调节 pH 值至 7.4,即得)稀释成浓度为 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的受试品溶液,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光水浴孵化。在各不同时间点取出 8.0 mL 受试品溶液,加入 2.0 mL Griess 试剂显色。室温放置 10 min,采用 V-5100 紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司)于 542 nm 波长处测吸光度,各个时间点的吸光度值重复测 3 次,求其平均值。根据标准曲线方程计算出各目标化合物在不同时间点的 NO 释放度,以 NO 释放量为纵坐标,时间为横坐标,绘制 NO 释放量与时间关系曲线(图 4)。

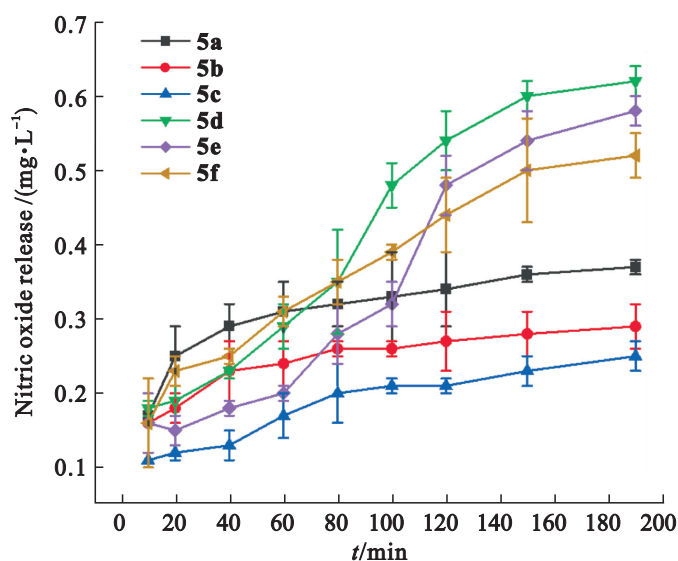


Figure 4 Nitric oxide release curve for compounds 5a – 5f

5 ADME 预测

绘制目标化合物的结构图,利用 swiss ADME

(<http://www.swissadme.ch/>) 计算出化合物的 ADME 特性,结合网站的工具对化合物成药性进行分析,相关数据见表 2。

Table 2 ADME properties prediction of 2-phenylbenzimidazole derivatives

Compd.	MW/ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) <500	H-bond acceptors <10	H-bond donors <5	Rotatable bonds <10	TPSA (Å^2) ≤ 140	$\text{Log}P_{\text{ow}}$	GI ^a	BS ^b
2a	194.23	1	1	1	28.68	2.94	high	0.55
3a	248.32	1	0	3	17.82	3.65	high	0.55
3b	262.35	1	0	3	17.82	3.98	high	0.55
3c	318.41	2	0	6	27.05	4.34	high	0.55
3d	266.31	2	0	3	17.82	3.95	high	0.55
3e	282.77	1	0	3	17.82	4.18	high	0.55
3f	327.22	1	0	3	17.82	4.27	high	0.55
5a	311.34	4	0	7	72.87	2.91	high	0.55
5b	325.36	4	0	7	72.87	3.27	high	0.55
5c	381.43	5	0	10	82.10	3.63	high	0.55
5d	329.33	5	0	7	72.87	3.24	high	0.55
5e	345.78	4	0	7	72.87	3.46	high	0.55
5f	390.23	4	0	7	72.87	3.55	high	0.55

a: Gastrointestinal absorption; b: Biopharmaceutics classification system.

进一步采用生物利用度雷达图,以母核化合物 **2a** 为对照,对不同系列中抗肿瘤活性较好的化合物 **3a**、**5d** 从分子尺寸 (SIZE)、饱和度 (IN-

SOLU)、不饱和度 (INSATU)、柔韧性 (FLEX)、亲脂性 (LIPO) 和极性 (POLAR) 六个方面进行化合物的成药性评价,结果见图 5。

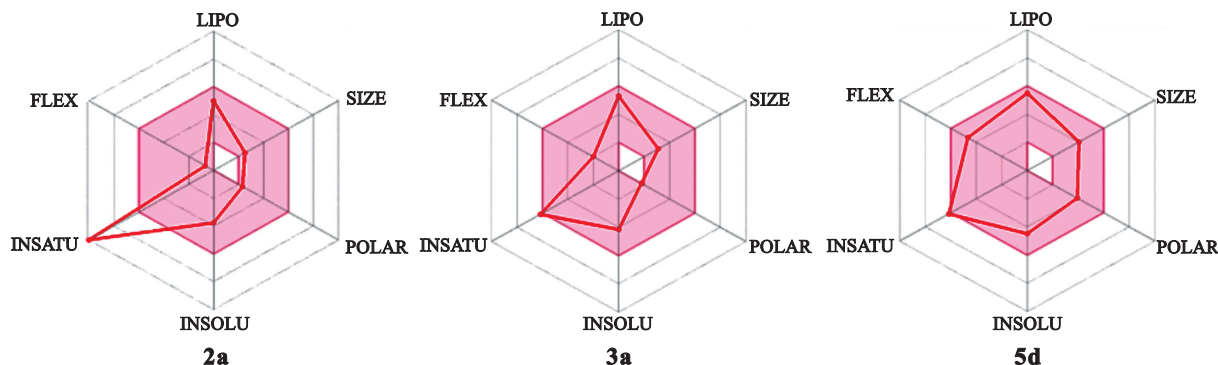


Figure 5 Radar plot of bioavailability for compounds **2a**, **4a**, and **5d**

6 结果与讨论

为解决苯并咪唑类化合物的耐药性问题并提高其抗肿瘤活性,本文作者采用双靶点设计策略,以 2-苯基苯并咪唑为母核,设计合成了一系列衍生物,并侧重在苯并咪唑的 *N*-1 位引入脂溶性基团从而提高化合物成药性。在化合物的合成过程中,为减少卤代烃发生消除反应,尝试采用能够促进 S_N2 反应进行的 DMF、丙酮、四氢呋喃等偶极溶剂,结果发现沸点较低的丙酮效果最佳,其具有减少副反应发生、后处理简单的优点。此外,因 2 位苯环上取代基不同,咪唑 *N*-烷基化反应的效果差别较大,推测原因为不同取代基产生的电子效应可能会影响 *N*-1 位与卤代烃亲核取代反应的速率和收率。尝试通过改变反应温度或增加缚酸剂等方式提高收率,但效果较差,最终通过改变投料配比,加大卤代烃的用量获得了较好的反应效果。

体外抗肿瘤活性筛选结果显示,目标化合物对 5 种人源癌细胞 (HeLa、A549、HepG2、MCF-7 和 HT-29) 表现出不同程度的抑制作用。其中化合物 **5d** 表现尤为出色,对 5 种肿瘤细胞的 IC_{50} 值为 $4.11 \sim 35.88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,且其对 MCF-7、HT-29 的抑制活性 (IC_{50} 值分别为 $4.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 优于阳性对照药顺铂 (IC_{50} 值分别为 $19.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $17.60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),活性分别是顺铂的 4.6 倍和 3.6 倍。

NO 体外释放曲线结果表明,在测定的 190 min 内化合物体外 NO 释放量顺序为:**5d** > **5e** > **5f** > **5a** > **5b** > **5c**,其中化合物 **5d** 的体外 NO 释放度最高,为 $0.62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。推测目标化合物

体外 NO 释放量与 2 位苯环的取代基类型有关,取代基的电负性越大,越有利于 NO 分子的释放。其次,ADME 预测结果表明,与母核骨架相比,所合成的化合物符合 Lipinski 五规则,其中化合物 **3a**、**5d** 分子饱和度 (INSOLU) 适中,成药性更具优势。

在此基础上,初步总结了构效关系:在 *N*-1 位引入不同的结构片段对抗肿瘤活性产生明显影响,大部分带有硝酸酯结构片段的化合物抗肿瘤活性明显优于带有环丙甲基的化合物,推测这可能是由于硝酸酯支链中的硝氧基作为药效基团在细胞内可以释放 NO,而 NO 信号分子可以发挥抗肿瘤作用,这种协同作用使化合物抗肿瘤活性得以提高^[22]。进一步分析化合物 **5a** ~ **5f** 的构效关系发现,在 2 位苯环对位引入不同的给电子基团或吸电子基团,也会影响化合物抗肿瘤活性,引入吸电子能力越强的取代基则抗肿瘤活性更优。综上,化合物 **5d** 可作为具有潜在抗肿瘤作用的苗头分子加以深入研究。

参考文献:

- [1] HU Z Q, YOU W C, PAN K F, et al. Epidemiological characteristics of cancers in China and America: interpretation of the report of American cancer statistics, 2023 [J]. Sci Technol Rev (科技导报), 2023, 41(18): 18-28.
- [2] WU K Y, PENG X Y, CHEN M J, et al. Recent progress of research on anti-tumor agents using benzimidazole as the structure unit [J]. Chem Biol Drug Des, 2022, 99(5): 736-757.
- [3] KUMAR R, MARIANESAN A B, PATHAK S. Ben-

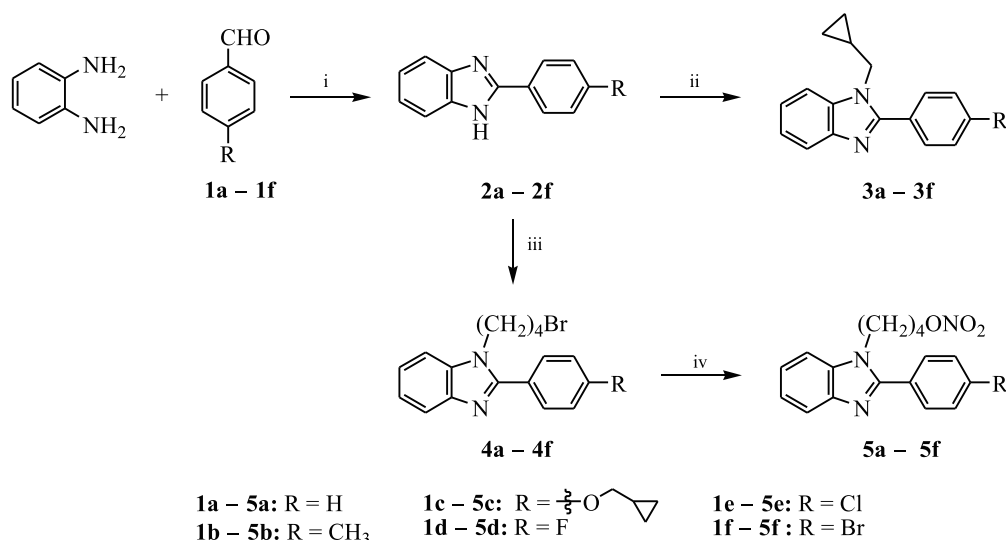
- zimidazole as a privileged scaffold in drug design and discovery [J]. *Curr Top Med Chem*, 2024, 24 (17):1504 – 1528.
- [4] CHEN J J, WANG W X, ZHANG W Y, et al. Design, synthesis and *in vitro* antitumor activity of benzimidazole derivatives[J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2025, 35(3):167 – 179.
- [5] LEE Y T, TAN Y J, OON C E. Benzimidazole and its derivatives as cancer therapeutics; the potential role from traditional to precision medicine [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(2):478 – 497.
- [6] SHARMA P, SRINIVASA R T, THUMMURI D, et al. Synthesis and biological evaluation of new benzimidazole-thiazolidinedione hybrids as potential cytotoxic and apoptosis inducing agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 124:608 – 621.
- [7] LIU J, HUANG N, LI N, et al. 2-(1*H*-benzimidazol-2-yl)-4, 5, 6, 7-tetrahydro-2*H*-indazol-3-ol, a benzimidazole derivative, inhibits T cell proliferation involving $H^+ / K^+ -ATPase$ inhibition [J]. *Molecules*, 2014, 19(11):17173 – 17186.
- [8] WU K, PENG X, CHEN M, et al. Recent progress of research on anti-tumor agents using benzimidazole as the structure unit [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 99:736 – 757.
- [9] WANG S, ZHOU D, XU Z, et al. Anti-tumor drug targets analysis: current insight and future prospect [J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(11):1180 – 1202.
- [10] HSU C C, PENG D, CAI Z, et al. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85:52 – 68.
- [11] ZOU Z, TAO T, LI H, et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10:31.
- [12] ZHANG J, YAO D, JIANG Y, et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole derivatives as the G9a histone methyltransferase inhibitors that induce autophagy and apoptosis of breast cancer cells [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 72:168 – 181.
- [13] LIU H, WANG Y, SHARMA A, et al. Derivatives containing both coumarin and benzimidazole potently induce caspase-dependent apoptosis of cancer cells through inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling [J]. *Anti-Cancer Drug*, 2015, 26(6):667 – 677.
- [14] DING R R, TENG M T, HU J Y, et al. Advances of benzimidazole derivatives on the function of antitumors and the mechanism [J]. *J Biol (生物学杂志)*, 2019, 36(6):74 – 78.
- [15] JIANG Y, LI Y Y. Research progress of nitric oxide donor in antitumor application [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2024, 48(4):309 – 320.
- [16] HAN C, WU L T, ZHOU C Y, et al. Design, synthesis and anti-NSCLC activity of NO donating amlinopyrimidines [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2016, 26(3):175 – 181.
- [17] WANG C, XI D, WANG H, et al. Hybrids of MEK inhibitor and NO donor as multitarget antitumor drugs [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 196:112271.
- [18] HE B E, ZHU Z C, CHEN F L, et al. Synthesis and antitumor potential of new arylidene ursolic acid derivatives *via* caspase-8 activation [J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2021, 354(6):e2000448.
- [19] ZHU Z C, ZHOU H X, CHEN F L, et al. Sinomenine derivatives: synthesis, antitumor activity, and apoptotic induction in MCF-7 cells *via* IL-6/PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *ChemMedChem*, 2022, 17(14):e202200234.
- [20] ZHOU H X, YU Z K, WU Z W, et al. Synthesis and *in vitro* anti-tumor effects screening of sinomenine-nitrate conjugates [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2024, 33(7):705 – 713.
- [21] XIAO M J, HUANG D, HE J W, et al. Synthesis of nitric oxide-donating caffeic acid derivatives and nitric oxide-releasing activities *in vitro* [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)*, 2016, 33(2):248 – 251.
- [22] MA L F, XU L L, YUAN L J, et al. Discovery of NO donor-aurovertin hybrids as dual ferroptosis and apoptosis inducers for treating triple negative breast cancer [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(15):13089 – 13105.

Design, synthesis, and antitumor activity evaluation of 2-phenylbenzimidazoles

YU Zikai, SHANG Yifan, WEI Yating, HUANG Xinyu, ZHANG Xin, WANG Tao*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To discover compounds with good antitumor activity, a total of twelve 2-phenylbenzimidazoles were designed and synthesized *via* cyclization and nucleophilic substitution using 4-substituted benzaldehyde and o-phenylenediamine as starting reagents. The structures of target compounds were confirmed by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, and high-resolution mass spectrometry. Further, the *in vitro* antitumor activity of 2-phenylbenzimidazoles against five tumor cell lines (HeLa, A549, HepG2, MCF-7 and HT-29) was evaluated using the MTT assay. The results indicated that some compounds showed prominent antitumor effects. Compound **5d** was found to be the most potent antiproliferative agent. It demonstrated superior inhibitory effects against MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 4.11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and HT-29 ($\text{IC}_{50} = 4.86 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) compared to the positive drug cisplatin. Furthermore, its inhibitory activity against A549 ($\text{IC}_{50} = 5.86 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was comparable to that of cisplatin. In addition, the *in vitro* nitric oxide release assay showed that compound **5d** had the highest nitric oxide release. According to predictions from the Swiss ADME server, compound **5d** also displayed excellent druggability, making it a promising candidate for further research. This study provides a certain experimental basis for development of benzimidazole compounds as antitumor agents.



Key words: 2-phenylbenzimidazole; design and synthesis; antitumor activity; molecular docking; druggability