

• 实验研究 •

金雀异黄素衍生物 5-羟基-4'-硝基-7-取代氧基异黄酮的合成及抗肿瘤活性研究

金永生¹, 刘超美¹, 戴阳², 吴秋业¹, 姚斌¹, 张大志¹

(1. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 2. 解放军 54960 部队医院, 潍坊 261000)

[摘要] **目的:** 寻找新型的以细胞信号转导为靶点抗肿瘤活性物质。 **方法:** 根据先导化合物金雀异黄素的结构, 设计合成了一类金雀异黄素衍生物: 5-羟基-4'-硝基-7-取代氧基异黄酮。以氯苄为起始原料, 经取代、硝化、Friedel-Crafts 反应和环合, 再与各种卤代烃反应; 采用 MINI 法对合成的目标化合物进行了体外抑制 MDA-MB-435 肿瘤细胞增殖实验。 **结果:** 得到 2 类重要中间体: 4'-硝基脱氧安息香和 4'-硝基金雀异黄素(4-6) 和 6 个目标化合物, 其中 5-羟基-4'-硝基-7-甲氧基异黄酮(4-1)、5-羟基-4'-硝基-7-烯丙氧基异黄酮(4-2)、5-羟基-4'-硝基-7-对氯苄氧基异黄酮(4-3)、5-羟基-4'-硝基-7-苄氧基异黄酮(4-4) 和 5-羟基-4'-硝基-7-乙氧基异黄酮(4-5) 为首次报道。除化合物(4-6) 具有较好的抗肿瘤活性外, 其余化合物抗肿瘤活性都较弱。 **结论:** 在 7 位羟基上引入简单烷基不能提高该类化合物的抗肿瘤活性。

[关键词] 异黄酮; 金雀异黄素; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R 914.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0111-03

Synthesis of genistein derivatives: 5-hydroxy-4'-nitro-7-substituted-oxo-isoflavone and their antitumor effects

JIN Yong-Sheng¹, LIU Chao-Mei¹, DAI Yang², WU Qiu-Ye¹, YAO Bin¹, ZHANG Da-Zhi¹ (1. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Hospital of No. 54960 Army, Weifang 261000)

[ABSTRACT] **Objective:** To search for novel antitumor agents targeting the cell signal transduction. **Methods:** According to the structure of the lead compound: genistein, a genistein derivative, 5-hydroxy-4'-nitro-7-substituted-oxo-isoflavones were designed and synthesized. The antitumor activities of the compounds on MDA-MB-435 cell line were evaluated using MINI method. **Results:** Two important intermediates: 4'-nitrodeoxybenzoin and 4'-nitrogenistein(4-6) and 6 title compounds were synthesized using benzyl chloride as the starting material. The reaction included substitution, nitration, Friedel-Crafts reaction and cyclation. Five compounds 5-hydroxy-7-methoxyl-4'-nitro-isoflavone (4-1), 7-allyloxy-5-hydroxy-4'-nitro-isoflavone (4-2), 7-(p-chlorobenzoyloxy)-5-hydroxy-4'-nitro-isoflavone (4-3), 7-benzyloxy-5-hydroxy-4'-nitro-isoflavone (4-4), 7-ethoxyl-5-hydroxy-4'-nitro-isoflavone(4-5) were firstly reported. It was showed that compound (4-6) had good antitumor activity, and others had weaker antitumor effects. **Conclusion:** Introduction of simple alkyls to 7-position hydroxy cannot enhance the antitumor effects of this type of compounds.

[KEY WORDS] isoflavones; genistein; antitumor effects

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 111-113]

近年来的研究发现, 大豆来源的天然产物金雀异黄素(genistein, 一种天然异黄酮)是强力酪氨酸蛋白激酶(PTK)抑制剂, 体外能抑制 c-src、v-abl 和表皮生长因子受体 PTK 等活性。研究发现金雀异黄素还可以抑制 DNA 拓扑异构酶 II 活性和抑制肿瘤细胞的 DNA 合成^[1], 激活 p38 有丝分裂原激活蛋白激酶, 抑制 ERK1/ERK2 和 cdc25C 的表达^[2], 增强对肿瘤细胞的免疫反应^[3]等协同的抗肿瘤作用^[4]。本实验以金雀异黄素为先导化合物, 设计合成了 6 个金雀异黄素衍生物(7-取代氧基-5-羟基-4'-硝基异黄酮), 并进行了抗肿瘤活性测试。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 Yamato model MP-21 型熔点测定仪(温度计未经校正); Varian INOVA-400 型和 Bruker-

Spectrospin AC-P300 型核磁共振仪, TMS 为内标; MOD-1106 型自动元素分析仪; 合成所用试剂均为上海化学试剂公司化学纯或分析纯试剂, 药理实验所用试剂均为 Sigma 公司产品, MDA-MB-435 细胞株购自美国 ATTC。

1.2 化合物的设计和合成 天然及合成的黄酮和异黄酮的抗肿瘤构效关系研究表明, C-7 和 C-5 位有羟基或苯环上有 3 个羟基的活性最好^[5,6]。但黄酮异黄酮的 4' 和 7 位羟基却很容易被代谢, 而失去活性。与金雀异黄素类似的大豆苷原(daidzein, 4', 7-二羟基异黄酮, 图 1)几乎没有抗肿瘤活性, 因此, 5 位羟基是产生抗肿瘤活性的必须基团。异黄酮的 4'-OH 被 F、NO₂ 取代仍有抗肿瘤活性, 且 NO₂ 取代后抗肿瘤

[作者简介] 金永生(1973-), 男(汉族), 硕士, 讲师。
E-mail: ysjin@smmu.edu.cn

活性比原羟基活性高^[7]。因此本实验在4'位引入硝基,对7位羟基引入烃基进行保护,合成了6个新化合物,其中5个为首次报道。合成路线见图2。

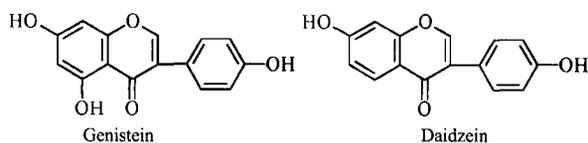


图1 金雀异黄酮和大豆苷原的结构
Fig 1 Structures of genistein and daidzein

1.2.1 对硝基苯乙腈(2)的制备 参考文献[8]方法,6.5 g (0.1 mol) KCN溶于10 ml水中,向其中缓慢滴加11.3 g

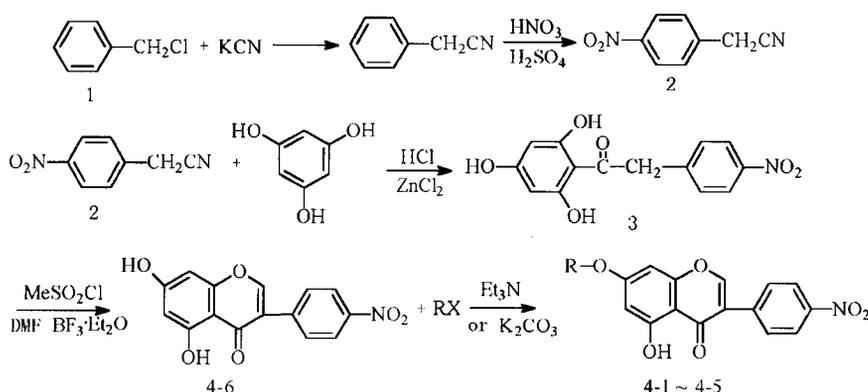


图2 目标化合物的合成路线
Fig 2 Synthetic route of title compounds

1.2.3 5,7-二羟基-4'-硝基异黄酮(4-6)的制备 取化合物(2)10 g (0.035 mol),DMF 50 ml,10 C以下滴加BF₃·Et₂O 20 ml,滴毕,室温搅拌30 min,60 C下加入甲烷磺酰氯9 ml,60~70 C反应2 h。将反应物倒入水中,过滤,干燥。熔点299~300 C,收率88%。

1.2.4 5-羟基-4'-硝基-7-甲氧基异黄酮(4-1)的制备 0.5 g (1.7 mmol)化合物(3),三乙胺1 ml,异丙醇10 ml,碘甲烷0.5 g (3.4 mmol),N₂保护,回流反应24 h,倒入水中,析出沉淀,过滤,干燥,快速柱层析(氯仿:甲醇=20:1),得产物。熔点220~222 C,产率51%。元素分析数据:计算值(%):C 61.35,H 3.54,O 4.47,实测值(%):C 61.20,H 3.39,O 4.65。¹HNMR (DMSO-d₆):δ3.890(3H,s,CH₃O-),6.470~6.476(1H,d,6-H,J=2.4),6.736~6.741(1H,d,8-H,J=2),7.902~7.924(2H,d,2',6'-H,J=8.8),8.298~8.320(2H,d,3',5'-H,J=8.8),8.696 (1H,s,2-H),12.690 (1H,s,5-OH)。

1.2.5 5-羟基-4'-硝基-7-烯丙氧基异黄酮的(4-2)制备 合成方法同化合物(4-1),熔点163~165 C,产率61%。元素分析数据:计算值(%):C 63.72,H 3.86,O 4.13,实测值(%):C 63.63,H 3.86,O 4.17。¹HNMR (CD₃COCD₃):δ4.74~4.77(2H,m,-CH₂-O),5.30~5.34,5.45~5.51

(0.09 mol)氯苄与10 ml乙醇的混合溶液。滴毕,将反应液回流3 h,冷却,过滤。滤液蒸去乙醇,剩余液冷却,分出有机层。将有机层液体减压蒸馏,收集135~140 C/0.09 kPa馏分,直接进行下一步反应。取硝酸7 ml和硫酸10 ml混和,冷却至10 C,滴加上面制得苯乙腈4 g(0.035 mol)。室温搅拌1 h,倒入50 ml冰水中。过滤干燥,乙醇重结晶。产率以氯苄记为75%,熔点114~115 C。文献^[8]值116~117 C。

1.2.2 2',4',6'-三羟基-2-(p-硝基苯基)-苯乙酮(3)的制备 参考文献[9]方法,间苯三酚25 g (0.2 mol),对硝基苯乙腈26 g (0.16 mol),100 ml干燥乙醚,ZnCl₂ 25 g,冰浴0 C,通入干燥氯化氢2 h,于冰箱放置3 d。再通氯化氢1 h,过滤。固体加到500 ml水中,煮沸2 h,放冷过滤,干燥,乙醇重结晶,收率90%,熔点243~244 C。

(2H,m,CH₂=),6.06~6.15(1H,m,=CH-),6.44~6.45 (1H,d,6-H,J=3),6.64~6.65(1H,d,8-H,J=3),7.95~7.98(2H,d,2',6'-H,J=9)8.31~8.34(2H,d,3',5'-H,J=9),8.54(1H,s,2-H),12.73(1H,s,5-OH)。

1.2.6 5-羟基-4'-硝基-7-对氯苄氧基异黄酮(4-3)的制备 0.5 g (1.7 mmol)化合物(3),Na₂CO₃ 0.5 g,DMF 10 ml,对氯苄氧基0.32 g (2 mmol),N₂保护,120 C反应8 h,倒入水中,过滤,干燥,快速柱层析(氯仿:甲醇=20:1)。熔点227~229 C,产率60%。元素分析数据:计算值(%):C 62.35,H 3.33,O 8.37,实测值(%):C 62.31,H 3.30,O 8.33。¹HNMR (DMSO-d₆):δ5.263(2H,s,p-Cl-Ph-CH₂-O),6.543~6.548(1H,d,6-H,J=2),6.802~6.807(1H,d,8-H,J=2),7.460~7.517(4H,q,H of p-Cl-Ph),7.892~7.914 (2H,d,2',6'-H,J=8.8),8.288~8.310(2H,d,3',5'-H,J=8.8),8.671(1H,s,2-H),12.664(1H,s,5-OH)。

1.2.7 5-羟基-4'-硝基-7-苄氧基异黄酮(4-4)的制备 合成方法同化合物(4-3),熔点227~229 C,产率67%。元素分析数据:计算值(%):C 67.86,H 3.88,O 3.60,实测值(%):C 67.78,H 3.86,O 3.48。¹HNMR(DMSO-d₆):δ5.267(2H,s,-CH₂-),6.547~6.552(1H,d,6-H,J=2),6.808~6.813(1H,d,8-H,J=2),7.356~7.491(5H,m,H-Ph-),7.896~7.918

(2H,d,2'6'-H, $J=8.8$),8.282~8.304(2H,d,3',5'-H, $J=8.8$),8.669(1H,s,2-H),12.660(1H,s,5-OH)。

1.2.8 5-羟基-4'-硝基-7-乙氧基异黄酮(4-5)的制备 合成方法同化合物(4-1),熔点192~194℃,产率53%。元素分析数据:计算值(%) :C 62.39,H 4.00,O 4.28,实测值(%) :C 62.43,H 4.06,O 4.26。¹HNMR (DMSO-d₆) : δ 1.343~1.378(3H,t,-CH₃, $J=6.8$),4.153~4.200(2H,q,-CH₂-, $J=6.8$),6.445~6.450(1H,d,6-H, $J=2$),6.712~6.717(1H,d,8-H, $J=2$),7.899-7.920(2H,d,2',6'-H, $J=8.4$),8.297-8.318(2H,d,3',5'-H, $J=8.4$),8.684(1H,s,2-H),12.677(1H,s,5-OH)。

1.3 药理实验 采用MINI法,选用人乳腺癌细胞株MDA-MB-435进行体外抗肿瘤细胞增殖测试,测定化合物的IC₅₀值。消化培养瓶中处于对数生长期的细胞,制成5×10⁵/L的细胞悬液,接种到96孔的培养板中,每孔的细胞数量为1×10⁴个。24h后加入待测化合物,浓度分别为50、25、12.5、6.5 μg/ml。空白对照组加入等体积的1%DMSO培养液。继续培养24h,然后加入30 μl含1.11×10⁴ Bq的[³H]-TdR的DMEM培养液,再培养24h,用自动细胞收集器将每孔内细胞分别收集于玻璃纤维膜上,蒸馏水冲洗至少20次,取下滤膜,对号剪下各滤膜片,加闪烁剂(0.4%PPO,0.01%POPOP的二甲苯溶液)4ml,暗处放置15min后,用Beckman LS-9800型液闪计数器测放射活性(Bq),每个数据均重复测定3次。根据数据作图求得IC₅₀值。

2 结果与讨论

2.1 重要中间体5,7-二羟基-4'-硝基异黄酮的合成 异黄酮合成的关键是脱氧安息香环形成异黄酮。文献^[10]报道由脱氧安息香环合成异黄酮的方法主要有3种:(1)在六氢吡啶和原甲酸三乙酯的作用下环合,此法需消耗大量的安息香,收率较很低,产物又较难处理;(2)在N,N-二甲基甲酰胺缩二甲醇或POCl₃/DMF作用下环合,收率一般。但当含有较多羟基的安息香反应时,羟基需保护,否则收率极低;用N,N-二甲基甲酰胺缩二甲醇存在同样的问题,而且N,N-二甲基甲酰胺缩二甲醇价格昂贵;(3)用BF₃·Et₂O使酚羟基络合而钝化芳环,进而使DMF-MeSO₂Cl选择性甲醛化其亚甲基,随后脱水环合生成异黄酮,收率高。我们采用此方法,并对此法进行改进,将反应温度由90~100℃降为60~70℃,并将BF₃·Et₂O的用量减少为原料4倍量,节省了原料,减少了副反应的发生和降低了后处理的难度,提高了收率。

2.2 目标化合物的合成 采用的方法为活泼卤代烃类化合物与中间体5,7-二羟基-4'-硝基异黄酮在碱作用下得到。由于异黄酮类化合物在碱性条件下加热反应会开环分解,因此寻找合适的碱和反应温度其极其重要。实验中分别选用了KOH、K₂CO₃、Na₂CO₃或三乙胺作为碱,又分别选用了甲醇、乙醇、异丙醇或DMF作溶剂。发现当选用无机碱时KOH、K₂CO₃使异黄酮的分解较严重,产物收率极低,高温时更甚,而用甲醇、乙醇做溶剂反应温度相对较低时则又不易反应完全,收率也不好。但用Na₂CO₃在DMF中120℃下,通N₂保

护,仅8h即可反应完全。用有机碱三乙胺,在异丙醇中反应收率也较好,但反应时间稍长。

2.3 化合物的抗肿瘤活性 化合物(4-1~4-6)对MDA-MB-435的IC₅₀(mmol/L)值分别为0.478、0.236、0.354、0.385、0.458、0.043。所合成的6个化合物除化合物(4-6)外抗肿瘤活性都较差。化合物(4-1~4-5)活性与母体化合物(4-6)的活性相比较下降许多,说明对7位羟基引入基团进行保护,可防止其被代谢,但同时也使活性下降;在7位羟基上引入简单的烷基进行保护不能提高其抗肿瘤活性。由于化合物数量有限,还无法讨论不同烷基对抗肿瘤活性影响。

致谢:感谢药学院和上海医药工业研究院核磁和元素分析室老师代做的分析测试。感谢美国圣乔治大学Lombardi肿瘤研究中心张鲁榕教授提供药理实验方法和数据。

【参考文献】

- [1] Liu XJ, Yang L, Mao YQ, *et al.* Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4):739-745.
- [2] Frey RS, Singletary KW. Genistein activates p38 mitogen-activated protein kinase, inactivates ERK1/ERK2 and decreases cdc25C expression in immortalized human mammary epithelial cells[J]. *J Nutr*, 2003, 133(1):226-231.
- [3] Guo TL, McCay JA, Zhang LX. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice[J]. *J Nutr*, 2001, 131(12):3251-3258.
- [4] Alhasan SA, Aranha O, Sarkar FH. Genistein elicits pleiotropic molecular effects on head and neck cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(12):4174-4181.
- [5] Cushman M, Nagarathnam D, Burg DL, *et al.* Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues[J]. *J Med Chem*, 1991, 34(2):798-806.
- [6] Cushman M, Nagarathnam D, Geahlen RL. Synthesis and evaluation of hydroxylated flavones and related compounds as potential inhibitors of the protein-tyrosine kinase p56^{lck}[J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(5):1345-1352.
- [7] 刘 澎, 常俊标, 陈荣峰, 等. 大豆异黄酮及其衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[J]. *药学报*, 2000, 35(8):583-586.
Liu P, Chang JB, Chen RF, *et al.* Studies on the synthesis and antitumor activities of soybean isoflavones and their derivatives [J]. *Yaoxue Xuebao (Acta Pharm Sinica)*, 2000, 35(8):583-586.
- [8] Adams G, Thail AF. Benzyl cyanide[A]. In: *Organic synthesis (Coll. Vol 1)*[M]. London and Newyord: John Wiley & Sons, Inc., 1963. 107-109.
- [9] Gulati KC, Seth SR, Venkataraman K. 2, 4, 6-trihydroxyacetophenone[A]. In: *Organic Synthesis (Coll. Vol 2)*[M]. London and Newyord: John Wiley & Sons, Inc., 1963. 522-523.
- [10] 李永福. C₁试剂在异黄酮合成中的应用[J]. *化学试剂*, 1991, 13(4):222-224.
Li YF. Application of C₁ reagents in the synthesis of isoflavones[J]. *Huaxue Shiji (Chem Reagents)*, 1991, 13(4):222-224.

【收稿日期】 2003-07-10

【修回日期】 2003-11-22

【本文编辑】 尹 茶