

· 论 著 ·

新型金雀异黄酮衍生物 5-羟基-4'-硝基-7-取代酰氧基异黄酮的合成及抗肿瘤活性研究

金永生^{1*}, 刘超美¹, 吴秋业¹, 姚斌¹, 戴阳², 张鲁榕³, 沈晓兰¹

(1. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学卫生勤务学系卫生勤务学教研室, 上海 200433; 3. 美国乔治城大学 Lombardi 肿瘤研究中心, Washington DC 20007, USA)

[摘要] **目的:**对金雀异黄酮进行结构改造,设计合成 7-取代酰氧基-5-羟基-4'-硝基金雀异黄酮衍生物,并进行抗肿瘤活性测试。**方法:**以氯苄为起始原料,经取代、硝化、Friedel-Crafts 反应和环合,再与各种酰氯反应得到 8 个目标化合物。**结果:**合成的目标化合物经元素分析和¹H NMR 确证其结构;其中化合物 **5B**(5-羟基-4'-硝基-7-丙酰氧基异黄酮)体内外对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 均具有较强的抑制活性,IC₅₀为 0.017 mmol/L。**结论:**金雀异黄酮的 4'引入硝基,同时 7 位丙酰化产物具有良好的抗肿瘤活性。

[关键词] 异黄酮;金雀异黄酮;化学合成;抗肿瘤药**[中图分类号]** R 979.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0182-04

Design and synthesis of genistein derivatives 5-hydroxy-4'-nitro-7-substituted-acyloxy-isoflavone and their antitumor effects

JIN Yong-sheng¹, LIU Chao-mei¹, WU Qiu-ye¹, YAO Bin¹, DAI yang², ZHANG Lu-rong³, Sheng Xiao-lan¹ (1. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Health Service, Faculty of Health Services, Shanghai 200433; 3. Department of Oncology, Lombardi Cancer Center, Georgetown University, Washington DC 20007, USA)

[ABSTRACT] **Objective:** To design and synthesize genistein derivatives 5-hydroxy-4'-nitro-7-substituted-acyloxy-isoflavones and to evaluate their antitumor effects. **Methods:** Benzyl chloride was used as the raw material to obtain the title compounds by multi-step reaction: substitution, nitration, Friedel-Crafts reaction, cyclation reaction and acylation or alkylation. **Results:** Synthesized compounds were confirmed by ¹H NMR and element analysis. Of them **5B** (5-hydroxy-4'-nitro-7-propionyloxy isoflavone) had the most potent inhibitory effects on MDA-MB-435 breast cancer cells line *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion:** Propionylation of 7-OH and substitution of OH by NO₂ can enhance the antitumor activity of genistein.

[KEY WORDS] isoflavone; genistein; chemical synthesis; antitumor agent

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 182-185]

金雀异黄酮(genistein)是一种大豆来源的天然异黄酮,也是一种强力酪氨酸蛋白激酶(PTK)抑制剂,近年来研究发现金雀异黄酮还可抑制 DNA 拓扑异构酶 II 活性和抑制肿瘤细胞的 DNA 合成、诱发肿瘤细胞凋亡、激活 p38 有丝分裂原激活蛋白激酶、抑制 ERK1/ERK2 和 Cdc25C 的表达、增强对肿瘤细胞的免疫反应、抑制肿瘤新生血管生成等多效的抗肿瘤作用^[1~5]。

天然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 个羟基的活性最高^[6,7]。在非天然黄酮中,黄酮的 7 位羟基由其他取代基代替后仍有很好的活性^[8]。但黄酮和异黄酮的 4'和 7 位羟基却很容易被代谢而失去活性,5 位羟基是产生抗肿瘤活性的必需基团。异黄酮的 4'-OH 被 F、NO₂ 取代后仍有抗肿瘤活性,并且 NO₂ 取代后

抗肿瘤活性比原羟基活性高^[9]。因此我们在 4'位引入硝基,并保留 5 位,对 7 位进行修饰,以期发现具有更好活性的异黄酮类抗肿瘤化合物。

1 材料

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,柱层析用硅胶为烟台芝罘化工厂生产;熔点采用 ZMD-1 型熔点测定仪测定(温度计未经校正);¹H NMR 采用 Varian INOVA-400 型核磁共振仪测定, TMS 为内标;元素分析采用 MOD-1106 型自动元素分析仪测定。所用试剂均为 Sigma 公司产品,MDA-MB-435 细胞株购自美国 ATTC。

[作者简介] 金永生(1973-),男(满族),硕士,讲师。

* Corresponding author, E-mail: ysjin@smmu.edu.cn

2 方法和结果

2.1 化合物的合成 首先氯苄与氰化钠反应,得到苯乙腈(1),再硝化得到对硝基苯乙腈(2);对硝基苯乙腈与间苯三酚在氯化氢与氯化锌的催化下反应得

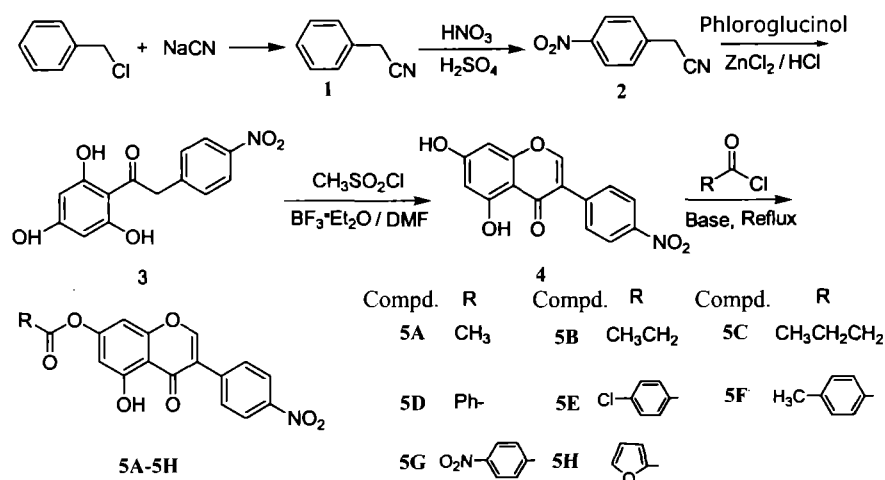


图1 目标化合物的合成路线

Fig 1 Synthetic route of title compounds

2.1.1 苯乙腈(1)和对硝基苯乙腈(2)的合成 按文献^[10]方法。对硝基苯乙腈产率以氯苄计算为75%, m. p. 114~115°C, 文献^[10]值 116~117°C。

2.1.2 2',4',6'-三羟基-2-(*p*-硝基苯基)-苯乙酮(3)的合成 参考文献^[11]方法,于三颈瓶中加入间苯三酚 25 g (0.2 mol),对硝基苯乙腈 26 g (0.16 mol),100 ml 干燥乙醚,新熔融过 ZnCl₂ 25 g,冰浴至 5°C 以下,向其中通入干燥氯化氢 2 h,然后于 5°C 左右保温放置 1 d。再通入干燥氯化氢 1 h,再于 5°C 左右保温放置 2 d。过滤反应瓶内混合物,将所得固体加入到 500 ml 水中,煮沸 1 h,冷却后过滤,烘干得到的固体,用乙醇重结晶,得到黄色固体 40 g,收率 90%, m. p. 243~244°C,文献^[12]值 249~250°C。

2.1.3 5,7-二羟基-4'-硝基异黄酮(4)的合成 取化合物(3)10 g (0.035 mol),DMF 50 ml,10°C 以下滴加 BF₃·Et₂O 20 ml,滴加完毕,于室温下搅拌 30 min,然后滴加甲烷磺酰氯 9 ml,滴加完毕在 60~70°C 条件下反应 2 h。待反应物冷却后倒入到 80 ml 水中,析出固体,过滤,得到的固体烘干后用 DMF/H₂O 重结晶,得黄色固体 9 g, m. p. 299~300°C,收率 86%。

2.1.4 5-羟基-4'-硝基-7-乙酰氧基-异黄酮(5A)的合成 取化合物(4)0.5 g (1.7 mmol),溶于二氧六环 10 ml,加入三乙胺 1 ml,于室温下滴加含乙酰氯 0.26 g (3.4 mmol)的二氧六环溶液 2 ml。滴加完

到脱氧安息香(3),再在甲烷磺酰氯、三氯化硼乙醚和 DMF 作用下环合得到异黄酮(4),异黄酮(4)与各种酰氯反应得到最终的目标化合物 5A~5H。




合成路线见图 1。目标化合物的¹HNMR 和元素分析数据见表 1。

毕于 80°C 下反应 2 h,然后减压蒸去溶剂,所得固体干燥,柱层析(氯仿:甲醇=80:1)分离,得淡黄色产物 0.29 g, m. p. 154~156°C,收率 50.3%。化合物 5B、5C 的合成方法同化合物 5A, m. p. 分别为 157~159°C 和 168~170°C,收率均为 60%。

2.1.5 5-羟基-4'-硝基-7-苯甲酰氧基异黄酮(5D)的合成 取化合物(4)0.5 g (1.7 mmol),NaOH 0.08 g,水 20 ml,搅拌,冰浴冷却至 5°C 以下。缓慢滴加含苯甲酰氯 0.35 g (2.5 mmol)的 10 ml 丙酮溶液。滴加完毕,室温搅拌 2 h,过滤,干燥,柱层析(氯仿:甲醇=60:1)分离,得淡黄色产物 0.4 g, m. p. 240~242°C,收率 58%。化合物 5E、5H 的合成方法同化合物 5D。m. p. 分别为 233~236°C 和 253~255°C,收率分别为 55%和 63%。

2.1.6 5-羟基-4'-硝基-7-对甲基苯甲酰氧基异黄酮(5F) 取对甲基苯甲酸 4 g,SOCl₂ 10 ml,回流 2 h,然后减压蒸去过量的 SOCl₂,剩余液体为对甲基苯甲酰氯粗品,直接用于下一步反应。取化合物(4)0.5 g (1.7 mmol),NaOH 0.08 g,水 20 ml,搅拌,冰浴冷却至 0°C 以下。取上面粗品对甲基苯甲酰氯 1 g,用丙酮 10 ml 溶解,将此溶液缓慢滴加到上面的水溶液中,滴加完毕,室温搅拌 2 h,然后加入 Na₂CO₃ 固体,使反应液为碱性,过滤,所得固体干燥,柱层析(氯仿:甲醇=60:1)分离,得淡黄色产物 0.4 g, m. p. 242~244°C,收率 57%。

表1 目标化合物5A~5H的¹HNMR和元素分析数据
Tab 1 Data of ¹HNMR and element analysis of title compounds

Compd.	¹ HNMR (δ)	Element analysis(%) ^a		
		C	H	N
5A	(DMSO-d ₆): 2.503 (3H, s, CH ₃ CO), 6.743-6.738 (1H, d, 6-H, J=2 Hz), 7.051-7.056 (1H, d, 8-H, J=2 Hz), 7.910-7.932 (2H, d, 2',6'-H, J=8.8 Hz), 8.314-8.336 (2H, d, 3',5'-H, J=8.8 Hz), 8.765(1H,s,2-H), 12.664(1H,s, 5-OH)	59.98(59.83)	3.12(3.25)	4.21(4.10)
5B	(CD ₃ COCD ₃): 1.188-1.238(3H, t, -CH ₃ , J=7.4 Hz), 1.768-1.787 (2H, m, CH ₂ , J=7.4 Hz), 2.636-2.710 (2H, q, CH ₂ , J=7.4 Hz), 6.671-6.677 (1H, d, 6-H, J=2.8 Hz), 6.943-6.950(1H, d, 8-H, J=2.8 Hz), 7.966-7.986 (2H, d, 2',6'-H, J=8 Hz), 8.335-8.355 (2H, d, 3',5'-H, J=8 Hz), 8.643 (1H,s,2-H), 12.746 (1H, s, O-H)	60.49(60.85)	3.90(3.69)	4.00(3.94)
5C	(CD ₃ COCD ₃): 1.129-1.179(3H, t, -CH ₃ , J=7.4 Hz), 2.416-2.429(2H, q, CH ₂ , J=7.2 Hz), 6.679-6.686(1H, d, 6-H, J=2.8 Hz), 7.187-7.194(1H, d, 8-H, J=2.8 Hz), 7.935-8.015(2H, d, 2',6'-H, J=8 Hz), 8.353-8.373(2H, d, 3',5'-H, J=8 Hz), 8.752(1H,s,2-H), 12.864(1H, s, O-H)	61.81(61.79)	4.10(4.09)	3.77(3.79)
5D	(CD ₃ COCD ₃): 6.889-6.896(1H, d, 6-H, J=2.1 Hz), 7.172-7.179(1H, d, 8-H, J=2.1 Hz), 7.616-7.667(2H, m, 3'',5''-H), 7.782-7.757 (1H, m, 4''-H) 8.194-8.222 (2H, m, 2'',6''-H) 7.992-8.022 (2H, d, 2',6'-H; J=12 Hz), 8.349-8.379(2H, d, 3',5'-H, J=12 Hz), 8.703 (1H,s,2-H), 12.814 (1H, s, O-H)	65.47(65.51)	3.34(3.25)	3.31(3.47)
5E	(DMSO-d ₆): 6.941-6.947(1H, d, 6-H, J=2.4 Hz), 7.265-7.271(1H, d, 8-H, J=2.4 Hz), 7.701-7.722 (2H, d, 2H, 3'',5''-H, J=8.4 Hz), 7.928-7.949(2H,d, 2'',6''-H, J=8.4 Hz) 8.153-8.175(2H, d, 2',6'-H, J=8.8 Hz), , 8.324-8.346(2H,d, 3',5'-H, J=8.8 Hz), 8.795(1H,s, 2-H), 12.72(1H,s, 5-OH)	60.21(60.36)	2.65(2.76)	3.09(3.20)
5F	(DMSO-d ₆): 2.448-2.510 (3H,m, CH ₃ -Ph-), 6.910-6.916 (1H, d, 6-H, J=2.4 Hz), 7.241-7.247 (1H, d, 8-H, J=2.4 Hz), 7.436-7.456 (2H, d, 3'',5''-H, J=8 Hz), 8.044-8.064 (2H, d, 2'',6''-H, J=8 Hz), 7.928-7.951 (2H,d, 2',6'-H, J=9.2 Hz), 8.323-8.346 (2H,d, 3',5'-H, J=9.2 Hz), 8.793 (1H,s,2-H), 12.71 (1H,s, 5-OH)	66.05(66.19)	3.75(3.62)	3.47(3.36)
5G	(DMSO-d ₆): 6.989-6.993 (1H, d, 6-H, J=1.6 Hz), 7.307-7.311 (1H, d, 8-H, J=1.6 Hz), 7.926-7.949 (2H, d, 2',6'-H, J=9.2 Hz), 8.323-8.345 (2H, m, 2H, 2'',6''-H, J=8.8 Hz), 8.427-8.449 (2H, d, 3'',5''-H, J=8.8 Hz), 8.380-8.403 (2H, d, 3',5'-H, J=9.2 Hz), 8.801(1H, s, 2-H), 12.73 (1H,s, 5-OH)	58.96(58.94)	2.85(2.70)	6.37(6.25)
5H	(DMSO-d ₆): 6.808-6.822 (1H, m, ) , 6.874-6.882(1H, t, 6-H, J=3.2 Hz), 7.193-7.203 (1H, t, 8-H, J=4 Hz), 7.600-7.611 (1H, t, ) , 7.927-7.949 (2H, d, 2',6'-H, J=8.8 Hz), 8.099-8.105 (1H, q, ) , 8.304-8.326(1H, d, 2-H, 3',5'-H, J=8.8 Hz), 8.751 (1H, s, 2-H), 12.657 (1H, s, 5-OH)	61.06(61.08)	2.83(2.82)	3.58(3.56)

^aData in and out brackets are calculated and found, respectively.

2.1.7 5-羟基-4'-硝基-7-对硝基苯甲酰氧基异黄酮(5G)的合成 取对硝基苯甲酸 4 g, SOCl₂ 10 ml, 向其中加入 1 滴 DMF, 回流 24 h, 然后减压蒸去过量的 SOCl₂, 得到黄色固体, 待用。取化合物(4) 0.5 g (1.7 mmol), NaOH 0.08 g, 水 20 ml, 搅拌,

冰浴冷却 0℃ 以下。取上面制得的对硝基苯甲酰氯粗品 1 g, 溶解到 10 ml 丙酮溶液。将其缓慢滴加到上面的水溶液中, 滴加完毕, 室温搅拌 2 h, 过滤, 所得固体干燥后柱层析(氯仿: 甲醇=40:1)分离, 得淡黄色产物 0.44 g, m. p. 237~240℃, 收率 58%。

2.2 抗肿瘤活性实验

2.2.1 体外抑制肿瘤细胞增殖实验 采用核素掺入法,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 IC₅₀ 值。化合物 **4** 及 **5A~5H** 的 IC₅₀ 分别为 0.043,0.147,0.017,0.096,0.124,0.134,0.179,0.132,0.115 mmol/L。

2.2.2 化合物 **5B** 对肿瘤细胞生长抑制实验 收集对数生长期的 MDA-MB-435 肿瘤细胞,用无血清 DMEM 溶液洗涤,再用 0.01 mol/L PBS 稀释液将肿瘤细胞调整为每毫升含 3×10⁷ 个细胞,吹打均匀后,用微量加样器吸取 0.1 ml 细胞悬液,接种至 10 d 龄鸡胚(由 Truslow Farms 公司提供)绒毛尿囊膜,每组 15 只,在 37.8℃ 继续孵育。2 d 后,将 200 μl 生理盐水或 200 μl 受试化合物 **5B** 的溶液(100 μg **5B** 加入到 200 μl 生理盐水中)连续 5 d 加到鸡胚绒毛尿囊膜的血管上,5 d 后采集、称重肿瘤肿块,拍照。空白和受试两组平均肿瘤重量分别为:(83.2±6.9)和(38.3±7.1) mg($t=2.624, P<0.01$)。

3 讨论

2',4',6'-三羟基-2-(*p*-硝基苯基)-苯乙酮的合成过程中,由于间苯三酚易氧化性,用常用的 AlCl₃ 催化的傅克酰基化反应无法得到产物。合成该化合物的常用方法有 ZnCl₂/HCl 催化下对硝基苯乙腈与间苯三酚反应和 BF₃·Et₂O 催化对硝基苯乙酸与间苯三酚作用,后者收率极低。因此本实验采用前一种方法。在实验中对第 2 次通 HCl 时间与第 1 次通 HCl 的时间间隔对收率的影响进行了考察,发现在第 1 次之后 1 d 再次通 HCl,保持总反应时间 3 d 不变,收率可达 90%。

体外抗肿瘤实验表明,化合物 **5B** 对 MDA-MB-435 肿瘤细胞具有很好的抑制活性,比母体化合物 **4** 高约 2 倍多。其余化合物的抗肿瘤活性均不好。因此 7 位羟基酰基化对活性的影响,有进一步研究的价值。由于化合物数量相对较少,7 位羟基酰基化是否有利于提高活性还无法定论。肿瘤在鸡胚尿囊膜上生长抑制实验是一种公认的测试化合物抗肿

瘤活性的体内实验方法。实验结果表明化合物 **5B** 具有较好的体内抗肿瘤活性,有进一步研究的价值。

[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] Katdare M, Osborne M, Telang NT. Soy isoflavone genistein modulates cell cycle progression and induces apoptosis in HER-2/neu oncogene expressing human breast epithelial cells[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(4): 809-815.
- [3] 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.
- [4] Guo TL, McCay JA, Zhang LX, et al. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice[J]. *J Nutr*, 2001, 131(12): 3251-3258.
- [5] 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.
- [6] Cushman M, Zhu H, Geahlen RL, et al. Synthesis and biochemical evaluation of a series of aminoflavones as potential inhibitors of protein-tyrosine kinase p56lck, EGFR, and p60v-src[J]. *J Med Chem*, 1994, 37(20): 3353-3362.
- [7] 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.
- [8] Akama T, Ishida H, Kimura U, et al. Structure-activity relationships of the 7-substituents of 5,4'-diamino-6,8,3'-trifluoroisoflavone, a potent antitumor agent[J]. *J Med Chem*, 1998, 41(12): 2056-2067.
- [9] 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.
- [10] 盛伟城. 对羟基苯乙酸合成工艺改进[J]. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(6): 276-277.
- [11] Gulati KC, Seth SR, Venkataraman K. 2,4,6-trihydroxyacetophenone[A]. In: Blatt AH ed. *Organic synthesis (Coll. Vol 2)* [M]. London and Newyord: John Wiley & Sons Inc., 1963. 522-523.
- [12] Moersch GW, Morrow DF, Neuklis WA. The antifertility activity of isoflavones related to genistein[J]. *J Med Chem*, 1967, 10(2): 154-158.

[收稿日期] 2004-06-24

[修回日期] 2004-09-17

[本文编辑] 尹 茶