

阿魏酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究

黄志勇, 黄珍, 郭易华, 李龙, 李荣东* (湖南中医药大学, 长沙 410208)

摘要: 目的 设计、合成了一系列含有喹唑啉结构的阿魏酸衍生物, 并对其抗肿瘤活性进行研究。方法 基于拼接原理, 将阿魏酸与喹唑啉进行结合, 并对喹唑啉 6 位进行修饰得到目标化合物, 采用 CCK-8 法测试目标化合物对肺癌细胞 A549 的抗肿瘤活性, 利用分子对接技术对目标化合物与表皮生长因子受体的结合模式进行模拟。结果 目标化合物的结构经 HRMS(ESI)、¹H-NMR 进行确证; 体外抗肿瘤活性结果表明化合物 11d、11f、12d 和 12g 的 IC₅₀ 低于阳性药吉非替尼, 11c 的 IC₅₀ 值与吉非替尼相当。结论 化合物 11d(IC₅₀=3.09 μmol·L⁻¹) 对肺癌细胞 A549 抗肿瘤活性较强, 值得深入研究。

关键词: 阿魏酸衍生物; 合成; 抗肿瘤; 表皮生长因子受体

中图分类号: R914.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)05-0589-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.05.003

引用本文: 黄志勇, 黄珍, 郭易华, 等. 阿魏酸衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 589-594.

Study on Synthesis and Antitumor Activity of Ferulic Acid Derivatives

HUANG Zhiyong, HUANG Zhen, GUO Yihua, LI Long, LI Rongdong* (Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesize a series of ferulic acid derivatives containing quinazoline structure, and to study their antitumor activity. **METHODS** Based on the principle of splicing, ferulic acid was combined with quinazoline, and the 6-position of quinazoline was modified to obtain the target compound. The anti-tumor activity of the target compound against lung cancer cell A549 was tested by CCK-8 method. Molecular docking technology was used to simulate the binding mode of the target compound and epidermal growth factor receptor. **RESULTS** The structure of the target compound was confirmed by HRMS (ESI) and ¹H-NMR. The *in vitro* antitumor activity results showed that the IC₅₀ of compounds 11d, 11f, 12d and 12g were lower than the positive drug of gefitinib, and the IC₅₀ of 11c was comparable to gefitinib. **CONCLUSION** Compound 11d (IC₅₀=3.09 μmol·L⁻¹) has strong antitumor activity against lung cancer cell A549, which is worthy of further study.

KEYWORDS: ferulic acid derivatives; synthesis; anti-tumor; epidermal growth factor

恶性肿瘤严重威胁到人类的生命健康, 肺癌是最常见的恶性肿瘤之一^[1-2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞肺癌, 约占所有肺癌的 85%^[3]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是人类表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor, HER)家族成员之一, 在 NSCLC 中表达异常, 并且与疾病的晚期和不良预后有关^[4]。很多临床上用于治疗 NSCLC 的表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR tyrosine kinase inhibitor, EGFR-TKIs)具有喹唑啉结构, 例如吉非替尼^[5]、厄洛替尼^[6]和阿法替尼^[7]等, 喹唑啉母核是设计 NSCLC 靶向治疗药物的一种优势结构。阿魏酸是一种广泛存在于植物中的酚酸, 具有广泛的药理作用, 如抗氧化、抗炎、

抗菌等^[8], 并且在高浓度下具有抗肿瘤作用^[9]。阿魏酸在体外具有 EGFR 抑制活性^[10], 能抑制 EGFR 诱导的乳腺癌细胞生长^[11]。本实验基于拼接原理, 将阿魏酸与喹唑啉进行结合, 并对喹唑啉 6 位进行修饰, 设计合成了 16 种阿魏酸衍生物。通过 HRMS(ESI)、¹H-NMR 进行结构确证, 采用 CCK-8 法对其抗肿瘤活性进行筛选, 初步探究其构效关系, 并应用分子对接技术模拟化合物与 EGFR 的结合模式, 希望得到新型、高效的抗肿瘤药物前体。

1 仪器与方法

1.1 仪器与试剂

Waters Xevo G2-XS TOF 质谱仪(美国 Waters 公司); 核磁共振波谱仪 AVANCE III HD 600(德国布鲁克公司); RE-2000B 型旋转蒸发器、低温恒温反应浴槽、循环水式真空泵、DB-2BC 型真空干燥

基金项目: 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室开放基金资助项目(201702)

作者简介: 黄志勇, 男, 硕士 E-mail: 1426694187@qq.com *通信作者: 李荣东, 男, 博士, 教授 E-mail: jjdhw12@163.com

箱均购自巩义市予华仪器有限公司；智能磁力搅拌器(爱博特科技)；Multiskan MK3 多功能酶标仪(Thermo 公司)；人肺癌细胞株 A549(上海酶研生物科技有限公司)；吉非替尼(Solarbio 公司, 批号: PS18050)。实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯, 所有试剂使用前都未作处理。

1.2 合成

目标化合物 **11a~11h** 和 **12a~12h** 的合成路线见图 1。合成路线分为 2 部分, 第 1 部分以阿魏酸为原料, 经酯化、苄基化、硝化、还原, 得到中间体 **5**。第 2 部分以 6-羟基-7-甲氧基-3H-喹唑啉-4-酮为原料, 通过乙酰化反应保护羟基, 然后氯化得到 7-甲氧基-6-乙酰氧基-4-氯喹唑啉, 将其与中间体 **5** 对接, 脱保护得到重要中间体 **10**, 对其 6 位羟基进行修饰, 得到目标化合物 **11a~11h**, 进一步脱保护分别得到目标化合物 **12a~12h**。

1.2.1 (E)-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)丙烯酸甲酯(2)的合成 阿魏酸(10 g, 0.051 mol)溶于甲醇(60 mL) 90 °C 搅拌 0.5 h, 缓慢滴加 98% 浓硫酸(1.8 mL), 回流反应 7 h, 停止反应, 冷却至室温。减压蒸除甲醇, 加乙酸乙酯(100 mL)提取, 滴加饱和 Na₂CO₃ 溶液, 调节 pH 值至 7, 水相用乙酸乙酯(80 mL×2)萃取, 合并有机相, 加水(50 mL×2)洗涤, 无水硫酸镁干燥有机相 4 h。过滤, 滤液减压浓缩, 得淡黄色油状物 10.6 g, 收率: 98.9%。

1.2.2 (E)-3-(3-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(3)的合成 **2**(10 g, 0.048 mol)、DMF(50 mL)、氯化苄(11.9 mL, 0.100 mol)和 K₂CO₃(11.2 g, 0.081 mol) 75 °C 反应 6 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。反应液冷却至室温, 倒入冰水搅拌, 抽滤, 烘干滤饼, 得白色固体 14.6 g, 收率: 96.1%。

1.2.3 (E)-3-(2-硝基-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(4)的合成 **3**(10 g, 0.033 mol)溶于冰醋

酸(75 mL) 40 °C 搅拌 0.5 h, 冷却至室温, 冰浴条件下缓慢滴加 86% 硝酸(20 mL), 反应温度控制在 30 °C 以下。室温搅拌 0.5 h, 倒入冰水搅拌, 抽滤, 烘干滤饼。得黄色固体 10.1 g, 收率: 87.8%。

1.2.4 (E)-3-(2-氨基-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(5)的合成 还原铁粉(16 g, 0.286 mol)、冰醋酸(45 mL)、水(45 mL)、氯化铵(0.5 g, 0.009 3 mol)和 36% 盐酸(0.75 mL) 90 °C 机械搅拌 1.5 h, 加入 **4**(5.5 g, 0.016 mol)继续反应 1.5 h。趁热抽滤, 滤液减压浓缩, 加二氯甲烷(200 mL)提取, 加水(100 mL×3)洗涤, 无水硫酸镁干燥有机相 4 h。过滤, 滤液减压浓缩, 得亮黄色固体 4.3 g, 收率: 85.8%。

1.2.5 7-甲氧基-6-乙酰氧基-4-氯喹唑啉(8)的合成 6-羟基-7-甲氧基-4-酮喹唑啉(10 g, 0.052 mol)、乙酸酐(108 mL, 1.14 mol)和吡啶(22.4 mL, 0.278 mol) 100 °C 搅拌 1 h, 加入 4-二甲氨基吡啶(1.4 g, 0.011 5 mol), 继续搅拌 4 h, 停止反应。冷却至室温, 倒入冰水搅拌, 抽滤, 滤饼烘干, 得黄白色固体。将其溶于氯化亚砷(107 mL, 1.47 mol), 80 °C 搅拌 0.5 h, 滴加 DMF(4.6 mL, 0.059 mol)。4 h 后停止反应, 冷却至室温, 减压回收氯化亚砷, 倒入冰水搅拌, 抽滤, 烘干滤饼, 得灰白色固体 10.5 g, 收率: 80.0%。

1.2.6 (E)-3-(2-((6-乙酰氧基-7-甲氧基喹唑啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(9)的合成 丙烯酸甲酯(5 g, 0.016 mol)溶于异丙醇(40 mL) 95 °C 搅拌 0.5 h, 加入 7-甲氧基-6-乙酰氧基-4-氯喹 **8**(4.8 g, 0.019 mol)。4 h 后趁热抽滤, 烘干滤饼, 得黄白色固体 6.3 g, 收率: 74.6%。

1.2.7 (E)-3-(2-((6-羟基-7-甲氧基喹唑啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(10)的合成 **9**(5 g, 0.009 mol)溶于甲醇(50 mL) 70 °C 搅拌

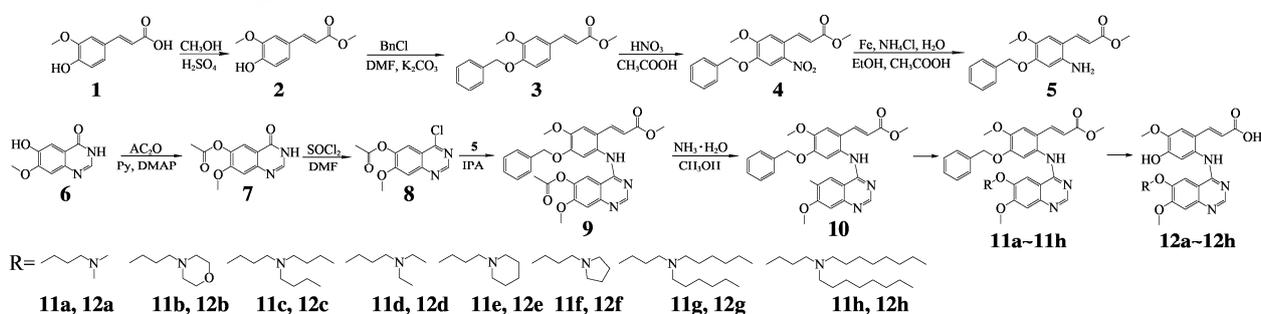


图 1 化合物 **11a~11h** 和 **12a~12h** 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of compounds **11a~11h** and **12a~12h**

0.5 h, 加入氨水(3.6 mL)。5.5 h 后冷却至室温, 反应液减压浓缩, 得黄色油状物。加入甲醇(15 mL) 搅拌, 出现黄白色固体, 抽滤, 烘干滤饼, 得黄白色固体 3.6 g, 收率: 78.2%。

1.2.8 (*E*)-3-(2-((6-(3-(二甲氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11a**)的合成 **10**(2 g, 0.004 mol)溶于 DMF(20 mL)95 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(1.2 g, 0.008 5 mol)、碘化钾(0.02 g)和 *N,N*-二甲基-3-氯丙胺(0.63 mL, 0.004 8 mol)。继续反应 6 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加入冰水(50 mL), 搅拌 1 h, 抽滤得粗产品。将粗产品溶于丙酮(10 mL)搅拌, 缓慢滴加盐酸, 有淡黄色固体产生, 抽滤, 烘干滤饼, 得淡黄色固体 1.8 g, 收率: 72.0%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.66(s, 1H), 8.64(s, 1H), 8.28(s, 1H), 8.26(s, 1H), 7.44(d, *J*=6.0 Hz, 2H), 7.19(d, *J*=5.3 Hz, 2H), 7.06(d, *J*=9.3 Hz, 2H), 6.25~6.17(m, 2H), 4.45(s, 2H), 4.09(s, 3H), 4.04~3.98(m, 2H)3.92(s, 3H), 3.46(t, *J*=7.3 Hz, 2H), 3.02(s, 6H), 2.40(s, 3H), 1.08(t, *J*=7.1 Hz, 2H)。HRMS(ESI)*m/z*: 573.257 0[M+H]⁺。

同法合成目标化合物 **11b~11c**。

(*E*)-3-(2-((6-(3-吗啉丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11b**), 黄色固体, 收率: 75.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.64(d, *J*=7.5 Hz, 1H), 8.52(s, 1H), 7.68(s, 1H), 7.64(s, 1H), 7.53(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.43~7.37(m, 4H), 7.33(t, *J*=6.9 Hz, 1H), 7.03(s, 1H), 6.21(s, 1H), 5.23(s, 2H), 4.57~4.46(m, 2H), 4.09(s, 6H), 3.94(s, 3H), 3.68~3.59(m, 2H), 3.48(t, *J*=7.3 Hz, 2H), 3.11~2.99(m, 2H), 2.98~2.91(m, 2H), 2.51~2.43(m, 4H)。HRMS(ESI) *m/z*: 615.284 6 [M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二丁氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11c**), 黄色固体, 收率: 75.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.38(s, 1H), 7.56~7.49(m, 3H), 7.43~7.37(m, 3H), 7.36~7.31(m, 2H), 7.06(d, *J*=9.6 Hz, 1H), 6.23(s, 1H), 5.19(s, 2H), 4.52~4.39(m, 2H), 4.08(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.54(s, 3H), 3.52~3.46(m, 2H), 3.16~3.01(m, 4H), 2.43~2.33(m, 2H), 1.83~1.73(m, 4H), 1.48(q, *J*=7.4 Hz, 4H), 1.04(t, *J*=7.3 Hz,

6H)。HRMS(ESI) *m/z*: 657.294 7[M+H]⁺。

1.2.9 (*E*)-3-(2-((6-(3-(二乙氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11d**)的合成 **10**(4 g, 0.008 mol)溶于 DMF(40 mL) 75 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(2.4 g, 0.017 mol)、碘化钾(0.02 g)和 1,3-溴氯丙烷(0.9 mL, 0.009 5 mol)。继续反应 5.5 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加冰水(50 mL), 搅拌 1 h, 抽滤得粗产品, 加丙酮洗涤, 烘干滤饼, 得到黄色固体。将其溶于 DMF(30 mL)95 °C 搅拌 0.5 h, 加入碳酸钾(2.0 g, 0.014 mol)、碘化钾(0.02 g)和二乙胺(0.11 mL, 0.001 mol)。继续反应 7 h, TLC 检测反应完全后, 停止反应。冷却至室温, 加冰水(50 mL), 搅拌 1 h, 抽滤得粗产品。将粗产品溶于丙酮(10 mL), 缓慢滴加盐酸, 有黄色固体产生, 抽滤, 烘干滤饼, 得黄色固体 3.2 g, 收率: 65.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.54(s, 1H), 8.11(s, 1H), 7.43(s, 2H), 7.37~7.16(m, 5H), 6.95(s, 1H), 6.26~5.97(m, 2H), 5.11(s, 2H), 4.40~4.21(m, 2H), 4.02(s, 3H), 3.85(s, 3H), 3.49(s, 3H), 3.42~3.36(m, 4H), 3.10~2.91(m, 2H), 2.44~2.20(m, 2H), 1.35(t, *J*=6.6 Hz, 6H)。HRMS(ESI)*m/z*: 601.264 8[M+H]⁺。

同法合成目标化合物 **11e~11h**。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(1-六氢吡啶基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11e**), 黄色固体, 收率: 70.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.62(s, 1H), 8.58(s, 1H), 8.54(s, 1H), 7.66(m, 1H), 7.38~7.21(m, 5H), 7.00(s, 1H), 6.96(s, 1H), 6.26~6.06(m, 1H), 5.05(s, 2H), 4.62~4.58(m, 2H), 4.04(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.88(s, 3H), 3.56~3.53(m, 2H), 3.38~3.32(m, 6H), 3.08~2.94(m, 4H), 2.67~2.55(m, 2H)。HRMS(ESI) *m/z*: 613.306 7[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(1-四氢吡咯基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11f**), 黄色固体, 收率: 74.1%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.64(s, 1H), 8.56(s, 1H), 7.72(s, 1H), 7.53(d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.42~7.28(m, 5H), 7.01(s, 1H), 6.22(s, 1H), 5.23(s, 2H), 4.58~4.46(m, 2H), 4.09(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.60(s, 3H), 3.51(t, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.10~2.93(m, 4H), 2.44(t, *J*=6.6 Hz, 2H), 2.28~2.09(m, 4H)。

HRMS(ESI) m/z : 599.240 9[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二己基氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11g**)，黄色固体产物，收率：67.4%。

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.63(s, 1H), 8.32(s, 1H), 7.53~7.30(m, 5H), 7.11(s, 2H), 6.21(d, $J=5.4$ Hz, 2H), 5.18(s, 2H), 4.51~4.37(m, 2H), 4.08(s, 6H), 3.91(s, 3H), 3.48(t, $J=7.3$ Hz, 2H), 3.01~2.95(m, 4H), 2.41~2.35(m, 2H), 1.71~1.65(m, 4H), 1.48~1.27(m, 12H), 0.92(t, $J=6.7$ Hz, 6H)。HRMS(ESI) m/z : 713.491 6[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二辛氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(**11h**)，黄色固体，收率：60.8%。

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.66(s, 1H), 8.64(s, 1H), 8.36(s, 1H), 7.56~7.31(m, 5H), 7.14~7.01(m, 2H), 6.31~6.12(m, 2H), 5.20(s, 2H), 4.52~4.40(m, 2H), 4.09(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.89(s, 3H), 3.51~3.45(m, 2H), 3.14~3.03(m, 4H), 2.42~2.35(m, 2H), 1.83~1.75(m, 4H), 1.47~1.24(m, 20H), 0.91(t, $J=6.8$ Hz, 6H)。HRMS(ESI) m/z : 769.439 4[M+H]⁺。

1.2.10 (*E*)-3-(2-((6-(3-(二甲氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸(**12a**)的制备 (*E*)-3-(2-((6-(3-(二甲氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-(苄氧基)苯基)丙烯酸甲酯(2 g, 0.003 4 mol)、冰醋酸(2.5 mL)和 36%盐酸(7.5 mL)110 °C 搅拌 7 h, TLC 检测反应完全后，停止反应。冷却至室温，反应液减压浓缩，得黄色油状物。加甲醇(10 mL)搅拌，出现黄色固体，抽滤，滤饼真空干燥，得黄色固体 1.1 g。收率：67.2%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.64(d, $J=11.0$ Hz, 1H), 8.26(d, $J=11.8$ Hz, 1H), 7.42(s, 1H), 7.18(s, 1H), 7.06(s, 2H), 6.19(s, 1H), 4.50~4.39(m, 2H), 4.08(s, 3H), 3.92(s, 3H), 3.46(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.02(s, 3H), 2.70(s, 3H), 2.44~2.38(m, 2H)。HRMS(ESI) m/z : 469.174 0[M+H]⁺。

同法合成目标化合物 **12b~12h**。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(吗啉丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸(**12b**)，黄色固体，收率：70.6%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.66(s, 1H), 8.23(s, 1H), 7.44(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.15(s, 1H), 7.08(s, 1H), 6.21(s, 1H),

4.49~4.41(m, 2H), 4.09(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.50(t, $J=6.9$ Hz, 4H), 3.10~2.97(m, 2H), 2.51~2.40(m, 4H), 1.37~1.21(m, 2H)。HRMS(ESI) m/z : 511.165 4[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二丁氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸(**12c**)，黄色固体，收率：75.5%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.66(s, 1H), 8.32(s, 1H), 7.41(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.23(d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.06(s, 2H), 6.21(s, 1H), 4.50~4.40(m, 2H), 4.07(s, 3H), 3.92(s, 3H), 3.54~3.42(m, 2H), 3.10~2.95(m, 2H), 2.45~2.31(m, 4H), 1.84~1.68(m, 4H), 1.47(q, $J=7.4$ Hz, 4H), 1.04(t, $J=7.3$ Hz, 6H)。HRMS(ESI) m/z : 553.270 4[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二乙氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸的制备(**12d**)，黄色固体，收率：59.8%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.30(s, 1H), 7.45(s, 1H), 7.20(s, 1H), 7.06(s, 1H), 6.28~6.17(m, 2H), 4.51~4.39(m, 2H), 4.09(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.59~3.44(m, 4H), 3.16~3.01(m, 2H), 2.44~2.34(m, 2H), 1.41(t, $J=7.2$ Hz, 6H)。HRMS(ESI) m/z : 497.239 7[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(1-六氢哌啶基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸(**12e**)，黄色固体，收率：71.2%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.60(s, 1H), 8.54(s, 1H), 7.51(s, 1H), 7.44(s, 1H), 7.34(s, 1H), 6.93(s, 1H), 6.21~6.02(m, 1H), 4.08(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.65(t, $J=9.1$ Hz, 2H), 3.41~3.34(m, 6H), 2.45(t, $J=6.9$ Hz, 2H), 2.05~1.91(m, 4H), 0.92~0.81(m, 2H)。HRMS(ESI) m/z : 509.191 2[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(1-四氢吡咯基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸(**12f**)，黄色固体，收率：68.4%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.28(s, 1H), 7.37(d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.24(s, 1H), 7.04(d, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.20(s, 2H), 4.57~4.33(m, 2H), 4.05(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.52(t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.22~3.15(m, 4H), 3.09~2.96(m, 4H), 1.06(t, $J=7.0$ Hz, 2H)。HRMS(ESI) m/z : 495.223 6[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二己基氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯

酸 (**12g**), 黄色固体, 收率: 60.1%。¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.27(s, 1H), 7.88(d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.16(s, 1H), 7.07(s, 1H), 6.43(d, *J*=9.2 Hz, 1H), 6.20(s, 1H), 4.06~3.98(m, 2H), 3.49(s, 6H), 3.20~3.16(m, 2H), 3.09(t, *J*=6.0 Hz, 4H), 2.85(t, *J*=8.3 Hz, 2H), 1.88~1.80(m, 4H), 1.59~1.40(m, 12H), 1.05(t, *J*=7.6 Hz, 6H)。HRMS(ESI) *m/z*: 609.441 9[M+H]⁺。

(*E*)-3-(2-((6-(3-(二辛氨基)丙氧基)-7-甲氧基喹啉-4-基)氨基)-5-甲氧基-4-羟基苯基)丙烯酸 (**12h**), 黄色固体, 收率: 57.2%。¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ 8.65(s, 1H), 8.33(s, 1H), 7.36(s, 1H), 7.27(s, 1H), 7.03(s, 1H), 6.25~6.15(m, 2H), 4.50~4.37(m, 2H), 4.05(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.48(t, *J*=7.7 Hz, 2H), 3.27~3.22(m, 4H), 3.09~2.95(m, 2H), 1.84~1.74(m, 4H), 1.47~1.23(m, 20H), 0.89(t, *J*=6.6 Hz, 6H)。HRMS(ESI)*m/z*: 665.380 6 [M+H]⁺。

1.3 体外抗肿瘤活性试验

采用 CCK-8 法测定目标化合物 **11a**~**11h**、**12a**~**12h** 对肺癌细胞 A549 的体外抗肿瘤活性, 阿魏酸和吉非替尼为阳性对照药。将处于对数生长期的 A549 癌细胞种于 96 孔板中($8 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$), 置于 37 °C, 5% CO₂ 条件下的培养箱中贴壁培养 24 h。设置空白对照组、阳性对照组和药物组, 96 孔板内分别加入用 0.2% DMSO 稀释的梯度浓度药物(0.5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹)100 μL, 空白对照组不加药物, 每组设 6 个复孔, 置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 置于培养箱中继续培养 1 h, 采用全自动酶标仪检测每孔 490 nm 处的 OD 值。使用 GraphPad Prism 软件计算化合物的 IC₅₀ 值。

1.4 分子对接研究

查阅文献并从 RSCB^[12] 蛋白库网站 (<https://www.rcsb.org/>) 获取 EGFR 蛋白的 X-衍射晶体结构(PDB 编号为 2ITY^[13]), 利用 Ledock 软件对目标化合物和 EGFR 进行分子对接。操作流程: ①使用 Chemdraw 3D 软件对目标化合物进行能量优化, 并保存为 mol2 格式。②根据下载的 EGFR 蛋白分子的配体的位置确定对接盒子的对接参数。③通过 Ledock 软件进行分子对接, 得出目标化合物与 EGFR 蛋白分子的结合自由能。④通过 Pymol 软件展示和分析目标化合物与 EGFR 蛋白

分子对接的具体情况。

2 结果和讨论

2.1 合成

阿魏酸裸露的羧基和酚羟基会对后续的修饰造成影响, 所以对裸露的羧基和酚羟基分别进行酯化保护和苄基保护。在预试验中, 选择先保护酚羟基, 再通过酯化反应保护羧基, 但是酯化反应的产率极低, 只有 16%~20%, 所以选用本研究的保护顺序, 先保护羧基。这 2 个基团的保护也能让硝化反应的位置集中在甲氧基的对位上, 使硝化反应副产物降低到可以承受的范围。

2.2 抗肿瘤活性

以肺癌细胞 A549 为实验对象, 采用 CCK-8 法检测 16 个目标化合物的抗肿瘤活性, 以阿魏酸和吉非替尼为阳性对照, 结果见表 1。目标化合物 **11d**、**11f**、**12d** 和 **12g** 的 IC₅₀ 值低于阳性药吉非替尼, 化合物 **11c** 的 IC₅₀ 值与吉非替尼相当。通过对比 6 位烷基取代的目标化合物, 发现 6 位取代基的碳链延长并不能增强其抗肿瘤活性, 其最优选择为 3-二乙丙氧基。对脱去苄基与酯基保护和未脱保护的目标化合物的 IC₅₀ 值进行比较, 发现苄基化保护阿魏酸酚羟基, 酯化保护羧基, 能增强其对肺癌细胞 A549 的抗肿瘤活性。

表 1 化合物 **11a**~**11h** 和 **12a**~**12h** 对 A549 细胞的 IC₅₀
Tab. 1 IC₅₀ of compounds **11a**~**11h** and **12a**~**12h** against A549 cells

化合物	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	化合物	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
11a	>500	12a	>500
11b	51.16	12b	>500
11c	27.64	12c	>500
11d	3.09	12d	7.12
11e	>500	12e	>500
11f	3.92	12f	>500
11g	120.80	12g	13.79
11h	>500	12h	>500
阿魏酸	>500	吉非替尼	28.37

2.3 分子对接

Ledock 软件对接结果见表 2, 其中目标化合物 **11d** 的分子对接结果最好。目标化合物 **11d** 与 EGFR 蛋白分子的结合模式图见图 2, **11d** 能很好地插入蛋白的结合口袋并与蛋白周围的氨基酸发生相互作用, 主要为疏水作用和氢键作用。**11d** 结构中阿魏酸酯基部分的氧与 LYS-745 形成氢键, 苄基与

CYS-797、ARG-841 形成疏水作用。Ledock 软件对接结果与体外抗肿瘤活性试验结果基本符合。

表 2 化合物 11a~11h 和 12a~12h 的对接结果

Tab. 2 Docking results of compounds 11a~11h and 12a~12h

化合物	结合自由能 $\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	化合物	结合自由能 $\Delta G/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
11a	-7.67	12a	-7.60
11b	-7.85	12b	-7.77
11c	-8.08	12c	-7.64
11d	-8.80	12d	-8.03
11e	-8.55	12e	-7.96
11f	-8.46	12f	-7.64
11g	-8.45	12g	-8.64
11h	-8.73	12h	-7.96

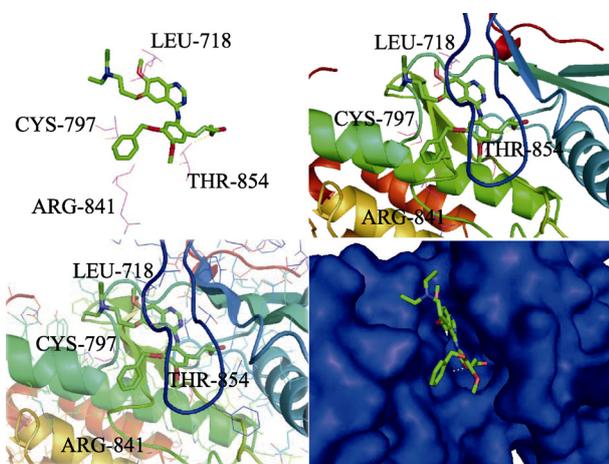


图 2 化合物 11d 与 EGFR 蛋白的结合模式

Fig. 2 Binding mode of compound 11d and EGFR protein

3 结论

基于拼接原理,设计合成了 16 个含喹唑啉的阿魏酸衍生物,并通过 HRMS(ESI)、 $^1\text{H-NMR}$ 对其结构进行确证。采用 CCK-8 法进行抗肿瘤活性测试,部分目标化合物具有优于阳性对照药吉非替尼的抗肿瘤活性,其中化合物 11d 的抗肿瘤活性最佳。分子对接结果显示目标化合物与 EGFR 靶点具有较好的结合作用,与体外抗肿瘤试验结果基本一致。本研究为进一步探索具有抗肿瘤作用的阿魏酸衍生物的开发提供了依据。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: a Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] CHEN Z, FILLMORE C M, HAMMERMAN P S, et al. Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(8): 535-546.
- [4] JÄNNE P A, ENGELMAN J A, JOHNSON B E. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: Implications for treatment and tumor biology[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(14): 3227-3234.
- [5] PAEZ J G, JÄNNE P A, LEE J C, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy[J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500.
- [6] TSAO M S, SAKURADA A, CUTZ J C, et al. Erlotinib in lung cancer-molecular and clinical predictors of outcome[J]. N Engl J Med, 2005, 353(2): 133-144.
- [7] SOLCA F, DAHL G, ZOEPHEL A, et al. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 343(2): 342-350.
- [8] HU X, REN G Y, TANG L H, et al. Ferulic acid inhibits aortic inflammation induced by $\text{PM}_{2.5}$ through regulating TLRs signaling pathway in mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(5): 642-647.
- [9] HEMAISWARYA S, DOBLE M. Combination of phenylpropanoids with 5-fluorouracil as anti-cancer agents against human cervical cancer (HeLa) cell line[J]. Phytomedicine, 2013, 20(2): 151-158.
- [10] ROY N, NARAYANANKUTTY A, NAZEEM P A, et al. Plant phenolics ferulic acid and P-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(8): 4019-4023.
- [11] SUDHAGAR S, SATHYA S, ANURADHA R, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor by ferulic acid and 4-vinylguaiaicol in human breast cancer cells[J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(2): 257-262.
- [12] ROSE P W, PRLIĆ A, BI C, et al. The RCSB Protein Data Bank: Views of structural biology for basic and applied research and education[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(database issue): D345-D356.
- [13] YUN C H, BOGGON T J, LI Y, et al. Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity[J]. Cancer Cell, 2007, 11(3): 217-227.

收稿日期: 2020-11-11

(本文责编: 曹粤锋)