二茂铁杂环类化合物的合成及抗三阴性乳腺癌活性研究

谭娟，陈灵，彭安林，肖静，张恩景(武汉大学附属同仁医院 武汉市第三医院药学部，武汉 430060)

摘要：目的 设计、合成杂环二茂铁衍生物，并研究其抗三阴性乳腺癌活性。**方法** 以二茂铁查耳酮为先导化合物，对其进行结构改造，合成了一系列含有杂环的二茂铁衍生物，并通过 CCK8 试剂盒测试化合物抗乳腺癌活性。**结果** 合成了 28 个二茂铁衍生物，其结构均通过 ^{1}H-NMR 和 MS 加以确证。初步的生物活性测试结果表明，所合成的二茂铁衍生物对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞有较强的选择性和抑制活性，其中咪唑杂环化合物抗肿瘤活性强于相应的吡唑类和嘧啶化合物。尤其是 **28a**[IC_{50}=(1.6±0.23)μmol·L^{-1}]对 MDA-MB-231 的抑制活性分别是先导化合物 **3**[IC_{50}=(10.7±1.41)μmol·L^{-1}]和他莫昔芬[IC_{50}=(13.7±1.17)μmol·L^{-1}]的 6 和 10 倍，同时这些二茂铁衍生物对正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 均没有毒性。**结论** 本研究为开发具有抗三阴性乳腺癌活性的化合物提供了信息和依据。

关键词：二茂铁衍生物；合成；抗三阴性乳腺癌

中图分类号：R914.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2018)03-0345-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.03.009

引用本文：谭娟, 陈灵, 彭安林, 等. 二茂铁杂环类化合物的合成及抗三阴性乳腺癌活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(3): 315-351.

Synthesis of Ferrocenyl Heterocyclic Derivatives and Anti-triple Negative Breast Cancer Screening

TAN Juan, CHEN Ling, PENG Anlin, XIAO Jing, ZHANG Enjing(*Department of Medicine, Wuhan Third Hospital, TongRen Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design and synthesis of ferrocenyl heterocyclic derivatives and investigate anti-triple negative breast cancer activity. **METHODS** A series of ferrocenyl derivatives were designed and synthesized from ferrocenyl chalcone, and their anti-breast cancer activities were evaluated by CCK8 assay. **RESULTS** Twenty-eight ferrocenyl heterocyclic derivatives were synthesized and the structures had been confirmed by ^{1}H-NMR and MS spectra. The preliminary biological results showed that all synthesized ferrocenyl derivatives showed selective anticancer activity that were more potent against MDA-MB-231 cells than MCF-7, which also showed moderate inhibitory activity, against MDA-MB-231 cell lines, and imidazole heterocyclic compounds had more potent anti-tumor than corresponding pyrazole and pyrimidine derivatives, specifically, compound **28a** [IC_{50}=(1.6±0.23)μmol·L^{-1}] showed about 6 and 10-fold potency than lead compound **3** [IC_{50}=(10.7±1.41)μmol·L^{-1}] and tamoxifen [IC_{50}=(13.7±1.17)μmol·L^{-1}], against MDA-MB-231 cell lines, and these ferrocenyl derivatives were not toxic to normal cells. **CONCLUSION** This study provides information and basis for development of ferrocenyl derivatives with anti-triple negative breast cancer activity.

KEY WORDS: ferrocenyl derivatives; synthesis; anti-triple negative breast cancer

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer，TNBC)是乳腺癌中恶性程度较高的类型，约占乳腺癌病理类型的 10%~20%[1]。在治疗上由于缺乏 TNBC 有效的特异性靶点，因此传统的靶向药物对之无效。对 TNBC 来说，其复发率和转移率特别高，这也是该种类型乳腺癌有较高死亡率的原因[2]。临床上对于 TNBC 的治疗，主要是以铂类、蒽环类、紫杉醇类为基础的化疗[3]，但其全身药物的不良反应严重，药物毒性大，严重影响了患者的生活质量。因此，开发出新型、高效、低毒的抗 TNBC 药物已成为医疗界迫切的需要，同时也是当今学术界和制药界的研究热点[4]。

近年来研究发现，查耳酮作为一类重要的天然产物也表现出了抗乳腺癌活性[5]，同时对正常细胞没有毒性。本课题组设计、合成了一系列的查耳酮，并对 TNBC 展现出了中等的抑制活性(图 1，化合物 **1**，IC_{50}>29 μmol·L^{-1})[6]；随后，笔者对该类查耳酮化合物进行结构修饰，引入二茂铁(图 1，化合物 **2**)基团构建了一系列的二茂铁查耳酮，显著地提高对 TNBC 的抑制活性，其中化合物 **3**[图 1，IC_{50}=(10.7±1.41)μmol·L^{-1}]展现出了最强活性[7]，但与他莫昔芬相比，大部分二茂铁类查耳酮抗乳腺癌活性仍然较低。因此，拟进一步对二茂铁查耳酮进行结构优化，以期望得到抗 TNBC 活

作者简介：谭娟，女，硕士生 Tel: (027)65399485 E-mail: juantan@126.com

性更强、毒性更低的新型二茂铁查耳酮衍生物。

参考查耳酮的结构改造经验发现，将查耳酮α,β-不饱和酮修饰成杂环后能提高抗肿瘤活性[8-11]。因此，笔者拟构建一系列杂环类二茂铁衍生物，其合成过程见图 2~3。首先，以 1-二茂铁基-3-(4-氯苯基)-2-丙烯酮(化合物 **3**)为先导化合物，将其修饰成嘧啶(化合物 **4~10**)杂环后能够显著提高其抗乳腺癌活性；接着，将化合物 **3** 修饰成二氢吡咯杂环化合物 **11~17** 后，其抗 TNBC 活性较嘧啶类化合物进一步提高，其中 *N*-1 位为 4-F 苯基取代的化合物 **17a** 活性强于其他取代基的化合物，而将化合物 **17a** 的二氢吡咯环氧化成吡咯环(化合物 **18**)后却降低了抗肿瘤活性；随后，保留了 *N*-1 位上 4-F 苯基，合成了 4-醛基二茂铁化合物 **21**，并通过 Claisen-Schmidt 羟醛缩合反应合成了另一系列具有咪唑杂环的二茂铁类查耳酮 **22~28**。通过生物活性研究发现，这类咪唑杂环化合物对 TNBC 的抑制活性强于二氢吡咯杂环类，其中化合物 **28a** [IC_{50}=(1.6±0.23)μmol·L^{-1}]展现出了最强的抑制活性，是先导化合物 **3** 的 6 倍。

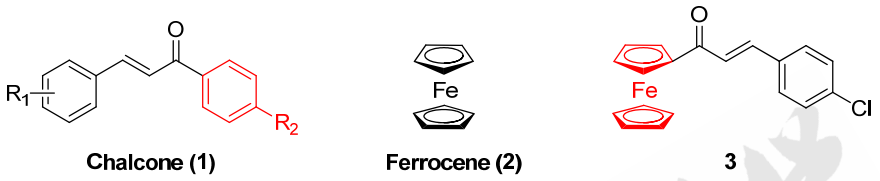


图 1　化合物 **1~3** 的化学结构

Fig. 1　Structures of compounds **1**–**3**

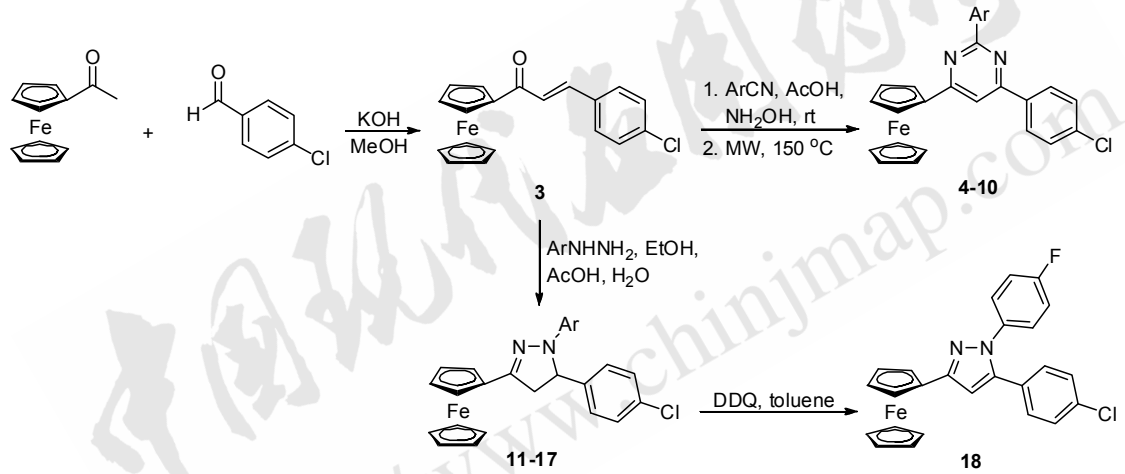


图 2　二茂铁类化合物 **4~18** 的合成路线

Fig. 2　Synthetic route of ferrocenyl compounds **4**–**18**

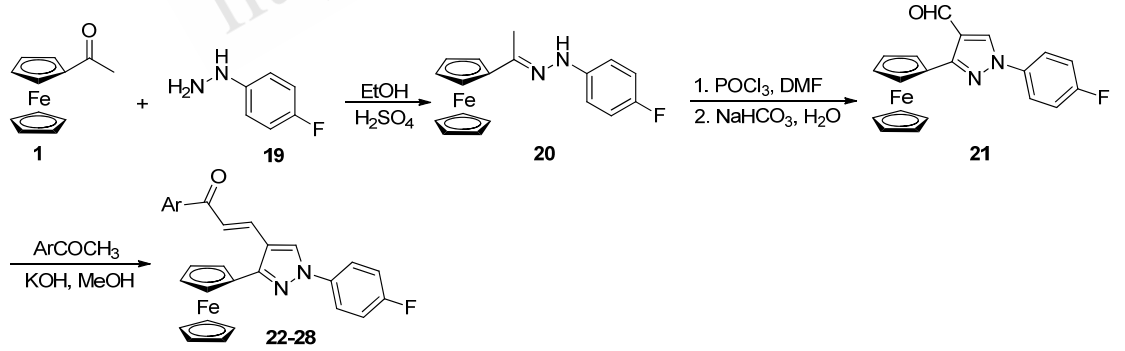


图 3　二茂铁类化合物 **22~28** 的合成路线

Fig. 3　Synthetic route of ferrocenyl compounds **22**–**28**

1 仪器和试剂

1.1 仪器

BrukerAM-400Hz 型核磁共振仪(TMS 内标)；XR4 显微熔点测定仪(上海光学仪器厂)；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市予华仪器有限责任公司)；FA(N)/JA(N)系列 MINQI∧O 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)；1106 型元素分析仪(意大利 Carlo Erba 公司)；HP1100 质谱仪(美国 Agilent 公司)；GF254 硅胶薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 试剂

乙酰基二茂铁(北京百灵威科技有限公司，纯度>98%)；对氯苯甲醛(北京百灵威科技有限公司，纯度>98%)；苯肼衍生物(阿拉丁试剂有限公司，纯度>95%)；苯甲氰衍生物(阿拉丁试剂有限公司，纯度>95%)；合成使用的其他试剂均为分析纯；水为蒸馏水。

2 合成方法

2.1 1-二茂铁基-3-(4-氯苯基)-2-丙烯酮(**3**)

称取单乙酰基二茂铁(4.347 g，12.4 mmol)和对氯苯甲醛(1.736 g，12.4 mmol)溶解到 50 mL 甲醇中，将反应瓶置于冰浴中，冷却后缓慢加入 KOH (3.484 g，62.1 mmol)，撤除冰浴后在室温下反应 12 h，用 10%盐酸调节溶液 pH 3，析出红色沉淀，过滤，滤饼在真空干燥箱中干燥过夜即得到化合物 **3**，产率：78%，m.p. 158~160 ℃；^{1}H-NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 7.64 (d，J = 15.6 Hz，1H)，7.49 (d，J = 8.4 Hz，2H)，7.30 (d，J = 8.4 Hz，2H)，6.99 (d，J = 16.0 Hz，1H)，4.83 (s，2H)，4.52 (s，2H)，4.13 (s，5H)。

2.2 嘧啶类化合物 **4**~**10** 的合成

称取二茂铁查耳酮(化合物 **3**，0.421 g，1.2 mmol)、苯甲氰衍生物(1.2 mmol)、羟胺(0.041 g，1.2 mmol)溶解到 5 mL 醋酸中，室温反应 2.5 h 后，将反应液在微波(600 W，180 ℃)中反应 5 min，将反应液冷却至室温，加入 15 mL 饱和的 NaCl 溶液，用乙酸乙酯萃取(3×30 mL)，有机层用无水硫酸钠干燥，减压除去溶剂，经柱层析(石油醚-乙酸乙酯，4∶1)得到相应的嘧啶类化合物 **4**~**10**，其收率、理化常数及波谱数据见表 1~2。

2.3 二氢吡唑类化合物 **11**~**17** 的合成

氩气保护下，将二茂铁查耳酮(化合物 **3**，0.386 g，1.1 mmol)和苯肼衍生物(1.1 mmol)溶解到无乙醇(10 mL)、醋酸(6 mL)与水(2 mL)的混合溶剂中，加入回流反应 6 h，将反应液冷却至室温，倒入 20 mL 冰水中，析出红色的沉淀，过滤，滤饼真空干燥，甲醇重结晶得到相应的二氢吡唑类化合物 **11**~**17**，其收率、理化常数及波谱数据见表 1~2。

2.4 1-(4-氟苯基)-3-二茂铁基-5-(4-氟苯基)-1*H*-吡唑(化合物 **18**)的合成

称取化合物 **17a**(0.279 g，0.6 mmol)和二氯二氰基苯醌(DDQ，0.091 g，0.4 mmol)溶解到苯(20 mL)中，加热至回流反应 4 h，将反应液冷却至室温，减压除去溶剂，经柱层析(石油醚-乙酸乙酯，2∶1)得到吡唑化合物 **18**，其收率、理化常数及波谱数据见表 1~2。

2.5 1-(4-氟苯基)-2-(1-二茂铁亚乙基)肼(化合物 **20**)的合成

氩气保护下，称取乙酰二茂铁(化合物 **1**，0.386 g，1.1 mmol)和 4-氟苯肼(1.1 mmol)溶解到无乙醇(20 mL)中，缓慢滴加 1 mL 浓硫酸，室温反应 12 h，用 10% NaOH 溶液调节 pH 8，析出红色的沉淀，过滤，滤饼真空干燥，甲醇重结晶得到化合物 **20**，产率为 84%，m.p. 184~186 ℃；^{1}H-NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 7.53 (d，J = 8.4 Hz，2H)，7.29 (d，J = 8.0 Hz，2H)，7.08 (d，J = 8.0 Hz，2H)，6.88 (d，J = 8.4 Hz，2H)，4.72 (s，2H)，4.22 (s，5H)，4.11 (s，2H)，2.97 (s，3H)。

2.6 1-(4-氟苯基)-3-苯基-1*H*-咪唑-4-苯甲醛(化合物 **22**)的合成

冰浴下，称取化合物 **19**(0.386 g，4.1 mmol)溶解到 $POCl_3$ (0.5 mL，6.1 mmol)和 DMF(10 mL)的溶液中，加热至 60 ℃反应 6 h，反应液冷却至室温后倒入 50 mL 的冰水中，用 10% NaOH 溶液调节 pH 7，析出红色的沉淀，过滤，滤饼真空干燥，甲醇重结晶得到化合物 **21**，产率: 71%，m.p. 169~172 ℃；^{1}H-NMR (400 MHz，$CDCl_3$) δ 7.61 (d，J = 8.0 Hz，2H)，7.28 (d，J = 8.0 Hz，2H)，6.84 (s，1H)，4.71 (s，2H)，4.24 (s，5H)，4.13 (s，2H)。

2.7 咪唑类化合物 **22**~**28** 的合成

称取化合物 **20**(0.598 g，2.3 mmol)和相应的芳乙酮(1.6 mmol)溶于 20 mL 无水甲醇中，室温搅拌 10 min 后，将反应液置于冰浴中冷却，缓慢加入 10 mL 20%的 KOH 溶液，反应液呈红色。在室温下继续反应 12 h，用 20%的盐酸调节 pH 3 后，部分产物以沉淀析出后过滤，滤饼在真空干燥箱中

干燥；如加盐酸调节 pH 后未能析出沉淀则用乙酸乙酯(3×25 mL)萃取，合并有机层，无水硫酸钠干燥，减压除去溶剂，经柱层析(石油醚-乙酸乙酯，4∶1~1∶1)得到化合物 **22**~**28**，其收率、理化常数及波谱数据见表 1~2。

3 结果与讨论

3.1 化合物的合成

在目标化合物 **4**~**10** 的合成中，该反应是经过两步反应进行，如图 4 所示，首先苯甲氰化合物与羟胺反应生成胺肟中间体 I，接着在微波的环境下与化合物 **3** 反应制得嘧啶类化合物 **4**~**10**。目标化合物 **18** 是通过氧化相应的二氢吡唑类化合物 **17** 制备的；在合成咪唑类化合物 **22**~**28** 时，其中关键中间体 **21** 是通过采用 $POCl_3$-DMF 试剂经过 Vilsmeier-Haack 反应制得的。

表 1 目标化合物 **4**~**18**，**22**~**28** 的理化常数和质谱数据

Tab. 1 Physical contants and MS of synthesized compounds **4**–**18**, **22**–**28**

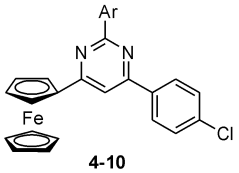
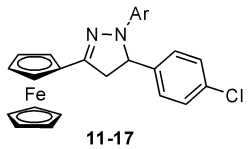
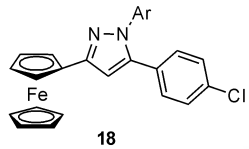
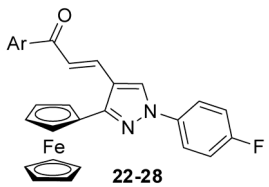
结构式	化合物	Ar	产率/%	m.p./℃	物理特性	元素分析(%，Calcd)			MS(ESI) *m/z*
						C	H	N	$[M+H]^+$ (Calcd)
 **4-10**	**4**	Ph	74.5	215~218	红色固体	69.74 (69.28)	4.17 (4.25)	5.91 (6.21)	451 (451.74)
	5	4-MePh	86.2	226~229	红色固体	69.91 (69.77)	4.39 (4.55)	5.87 (6.03)	465 (465.77)
	6	4-OMePh	79.7	208~210	红色固体	67.52 (67.45)	4.55 (4.40)	5.71 (5.83)	481 (481.77)
	7	4-OHPh	65.9	236~234	红色固体	67.15 (66.91)	4.23 (4.10)	5.72 (6.00)	467 (467.74)
	8	4-ClPh	73.3	241~244	红色固体	64.52 (64.36)	3.71 (3.74)	5.35 (5.77)	486 (486.19)
	9	4-BrPh	71.9	225~227	红色固体	59.03 (58.96)	3.66 (3.43)	5.07 (5.29)	530 (530.64)
	10a	4-FPh	75.6	218~223	红色固体	67.04 (66.62)	3.55 (3.87)	5.86 (5.98)	469 (469.73)
	10b	3-FPh	77.1	236~238	红色固体	66.87 (66.62)	3.93 (3.87)	5.74 (5.98)	469 (469.73)
	10c	2-FPh	80.2	225~227	红色固体	67.05 (66.62)	3.96 (3.87)	5.62 (5.98)	469 (469.73)
 **11-17**	**11**	Ph	76.5	186~188	红色固体	68.27 (68.13)	4.92 (4.80)	6.05 (6.36)	441 (441.75)
	12	4-MePh	84.3	179~181	红色固体	68.85 (68.67)	4.89 (5.10)	6.01 (6.16)	441 (455.78)
	13	4-OMePh	83.9	182~185	红色固体	66.62 (66.33)	4.78 (4.92)	5.83 (5.95)	471 (471.77)
	14	4-OHPh	68.4	194~196	红色固体	65.89 (65.74)	4.74 (4.63)	6.02 (6.13)	457 (457.75)
	15	4-ClPh	75.5	190~192	红色固体	63.28 (63.19)	4.55 (4.24)	5.77 (5.90)	476 (476.19)
	16	4-BrPh	73.2	201~204	红色固体	57.93 (57.78)	3.72 (3.88)	5.15 (5.39)	520 (520.64)
	17a	4-FPh	70.8	207~209	红色固体	65.66 (65.46)	4.18 (4.39)	6.04 (6.11)	459 (459.74)
	17b	3-FPh	77.6	196~199	红色固体	65.72 (65.46)	4.06 (4.39)	6.09 (6.11)	459 (459.74)
	17c	2-FPh	71.7	194~197	红色固体	65.69 (65.46)	4.25 (4.39)	6.01 (6.11)	459 (459.74)
 **18**	**18**	4-FPh	82.1	218~221	红色固体	65.71 (65.60)	4.22 (4.18)	6.04 (6.12)	457 (457.72)
 **22-28**	**22**	Ph	84.6	226~228	红色固体	70.84 (70.60)	4.36 (4.44)	5.62 (5.88)	477 (477.33)
	23	4-MePh	81.1	233~236	红色固体	71.35 (71.03)	4.59 (4.73)	5.58 (5.71)	491 (491.35)
	24	4-OMePh	76.8	237~239	红色固体	68.93 (68.79)	4.42 (4.58)	5.36 (5.53)	507 (507.36)
	25	4-OHPh	70.3	241~243	红色固体	68.52 (68.31)	4.47 (4.30)	5.45 (5.69)	493 (493.32)
	26	4-ClPh	72.7	247~249	红色固体	65.98 (65.84)	3.85 (3.95)	5.23 (5.48)	511 (511.77)
	27	4-BrPh	73.5	226~228	红色固体	60.85 (60.57)	3.51 (3.63)	4.89 (5.05)	556 (556.22)
	28a	4-FPh	78.4	213~211	红色固体	68.32 (68.03)	4.17 (4.08)	5.42 (5.67)	495 (495.32)
	28b	3-FPh	74.8	245~242	红色固体	68.45 (68.03)	4.11 (4.08)	5.47 (5.67)	495 (495.32)
	28c	2-FPh	75.7	218~220	红色固体	68.39 (68.03)	4.22 (4.08)	5.39 (5.67)	495 (495.32)

表 2　目标化合物 **4~18**，**22~28** 的核磁氢谱数

Tab. 2　The ^{1}H-NMR data of target compounds **4–18**, **22–28**

化合物	^{1}H-NMR (400 MHz, Acetone-d_6)
4	8.28 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.22 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.96 (1H, s), 7.50-7.55 (3H, m), 7.47 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.73 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.09 (s, 5H).
5	8.25 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 8.21 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.94 (1H, s), 7.52 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.42 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 4.69 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 4.12 (s, 5H), 2.32 (3H, s).
6	8.26 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 8.23 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.92 (1H, s), 7.55 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.47 (2H, d, *J*= 8.4 Hz), 4.71 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 4.17 (s, 5H), 3.84 (3H, s).
7	8.18 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.11 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.91 (1H, s), 7.57 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.00 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.69 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.14 (s, 5H).
8	8.35 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 8.26 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.96 (1H, s), 7.91 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.53 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.74 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.19 (s, 5H).
9	8.28 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.23 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.95 (1H, s), 7.73 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.55 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.69 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.15 (s, 5H).
10a	8.21 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.17 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.93 (1H, s), 7.52 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.28 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.11 (s, 5H).
10b	8.02 (1H, s), 8.19 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.95 (1H, s), 7.84 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.51-7.59 (4H, m), 4.74 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.09 (s, 5H).
10c	8.23 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.91 (1H, s), 7.79-7.84 (2H, m), 7.49-7.57 (3H, m), 7.34 (1H, t, *J*=8.0 Hz), 4.78 (s, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.12 (s, 5H).
11	7.42 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.21-7.36 (5H, m), 7.07 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 5.57 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.0 Hz), 4.59 (s, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.33 (s, 2H), 4.17 (s, 5H), 3.87 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=11.6 Hz), 3.09 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=4.4 Hz).
12	7.47 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.26 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.01 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 6.84 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 5.52 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.4 Hz), 4.65 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 4.11 (s, 5H), 3.82 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=11.2 Hz), 3.06 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=4.8 Hz), 2.33 (s, 3H).
13	7.43 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.28 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.05 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 6.81 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 5.45 (1H, dd, J_1=11.2 Hz, J_2=4.0 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 4.18 (s, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=11.6 Hz), 3.05 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=4.0 Hz).
14	7.41 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.24 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.02 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 6.93 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 5.49 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.8 Hz), 4.58 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 4.13 (s, 5H), 3.79 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=11.2 Hz), 3.07 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=4.4 Hz).
15	7.68 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.46 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.35 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.29 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 5.40 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.0 Hz), 4.51 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 4.10 (s, 5H), 3.18 (1H, dd, J_1=18.4 Hz, J_2=4.4 Hz), 3.82 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=11.6 Hz).
16	7.82 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.49 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.25 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.39 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 5.51 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.4 Hz), 4.57 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 4.16 (s, 5H), 3.79 (1H, dd, J_1=17.2 Hz, J_2=11.2 Hz), 3.22 (1H, dd, J_1=18.0 Hz, J_2=4.0 Hz).
17a	7.44 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.27 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.16 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 6.72 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 5.57 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.8 Hz), 4.65 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 4.19 (s, 5H), 3.72 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=11.6 Hz), 3.19 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=4.8 Hz).
17b	7.42 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.27-7.35 (3H, m), 7.13 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.02-6.94 (2H, s), 5.55 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.0 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 4.17 (s, 5H), 3.79 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=11.2 Hz), 3.21 (1H, dd, J_1=17.2 Hz, J_2=4.4 Hz).
17c	7.45 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.33 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.16-7.22 (2H, m), 6.96 (1H, t, *J*=7.6 Hz), 6.78-6.84 (1H, m), 5.55 (1H, dd, J_1=11.6 Hz, J_2=4.0 Hz), 4.61 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 4.16 (s, 5H), 3.79 (1H, dd, J_1=17.6 Hz, J_2=11.2 Hz), 3.21 (1H, dd, J_1=17.2 Hz, J_2=4.4 Hz).
18	7.56 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.39 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.11 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 6.87 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 6.81 (1H, s), 4.63 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 4.14 (s, 5H).
22	9.42 (1H, s), 8.17 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.87 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.70 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.68 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.62 (2H, t, *J*=8.0 Hz), 7.43 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.41 (1H, t, *J*=8.0 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.21 (s, 5H), 4.15 (s, 2H).
23	9.41 (1H, s), 8.14 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.84 (1H, d, *J*=15.2 Hz), 7.68 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.52 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.45 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.39 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.64 (s, 2H), 4.24 (s, 5H), 4.13 (s, 2H), 2.43 (s, 3H).
24	9.40 (1H, s), 8.16 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.87 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.65 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.48 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.42 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.26 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 4.72 (s, 2H), 4.22 (s, 5H), 4.11 (s, 2H), 3.83 (s, 3H).
25	9.42 (1H, s), 8.17 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.85 (1H, d, *J*=15.2 Hz), 7.67 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.45 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.43 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.31 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.67 (s, 2H), 4.26 (s, 5H), 4.14 (s, 2H).
26	9.41 (1H, s), 8.13 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 8.03 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.87 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.67 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.64 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.44 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.61 (s, 2H), 4.19 (s, 5H), 4.12 (s, 2H).
27	9.43 (1H, s), 8.18 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 8.01 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.86 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.62 (1H, d, *J*=15.2 Hz), 7.58 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.43 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 4.62 (s, 2H), 4.24 (s, 5H), 4.15 (s, 2H).
28a	9.45 (1H, s), 8.14 (2H, d, *J*=8.8 Hz), 7.93 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.88 (1H, d, *J*=15.2 Hz), 7.70 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.65 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.44 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 4.65 (s, 2H), 4.21 (s, 5H), 4.16 (s, 2H).
28b	9.41 (1H, s), 8.16 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.87 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.71~7.76 (2H, m), 7.68 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.64 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.48 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.23 (1H, s), 4.62 (s, 2H), 4.26 (s, 5H), 4.15 (s, 2H).
28c	9.44 (1H, s), 8.19 (2H, d, *J*=8.0 Hz), 7.94 (1H, t, *J*=8.0 Hz), 7.86 (1H, d, *J*=15.2 Hz), 7.73 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.66 (1H, d, *J*=15.6 Hz), 7.60-7.64 (1H, m), 7.52 (2H, d, *J*=8.4 Hz), 7.41 (1H, t, *J*=8.4 Hz), 4.65 (s, 2H), 4.24 (s, 5H), 4.17 (s, 2H).

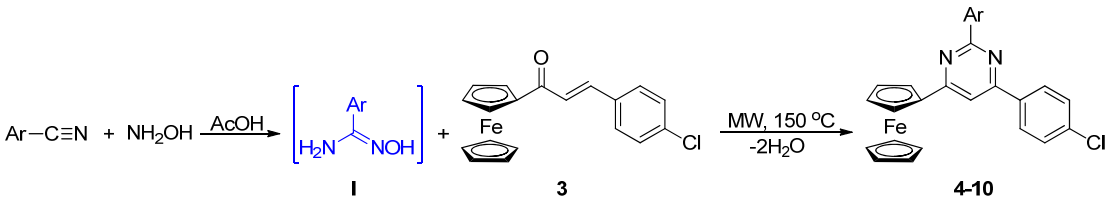


图 4　二茂铁类化合物 **4~10** 的合成过程

Fig. 4　Synthetic route of ferrocenyl compounds **4–10**

3.2　结构表征

所合成的二茂铁类化合物均经 ^{1}H-NMR 和 MS 分析确证。在化合物 **4~10** 的核磁共振氢谱中，在 7.9 ppm 附近出现一个单峰归属于嘧啶环上氢的特征信号；在化合物 **11~18** 氢谱中，其二氢吡唑环上的三个烷基氢信号分别在 5.5，3.8 和 3.0 ppm 附近出现，而用 DDQ 将二氢吡唑环氧化成吡唑环后，3 个烷基氢信号消失，并在 6.8 ppm 附近出现一个芳香质子的信号，归属于吡唑环上的氢质子信号；在化合物 **22~38** 氢谱中，出现一对反式双键的信号(J>15.0 Hz)，归属于化合物中 α,β-不饱和酮的双键质子特征信号。通过 MS 分析发现化合物测得的分子量与理论值一致，这说明所合成的化合物是目标产物。

3.3　生物活性

选取 MCF-7、MDA-MB-231 这 2 种人乳腺癌细胞株和正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 为测试细胞株，以他莫昔芬为阳性对照药，采用 CCK8 试剂盒测试合成的二茂铁衍生物抗乳腺癌活性。取对数生长期的 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞悬浮于含 10%胎牛血清的无酚红 DMEM 培养基中，铺至 96 孔细胞培养板中。待细胞完全贴壁后，弃去原培养液，加入待测查耳酮，其浓度梯度为 1×10^{-9}，5×10^{-8}，1×10^{-8}，5×10^{-7}，1×10^{-7}，5×10^{-6}，1×10^{-6}，5×10^{-5}，1×10^{-5}，1×10^{-4} mol·L^{-1}。药物处理培养 3 d 后，每孔加入 5 μL CCK8，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中继续孵育 4 h。使用酶标仪在 490 nm 波长测定每孔的吸光度(OD)值，分析实验结果，并计算出 IC_{50}，结果见表 3。同时，为了考察目标化合物的毒性，测试了目标化合物对正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 的抑制作用，并计算出这些化合物的治疗指数(*in vitro* therapeutic index，IVTI)。化合物的 IVTI 值越高，安全性越大[12]，结果见表 3。

表 3　目标化合物 **4~18**，**22~28** 对 2 种乳腺癌和 MCF-10A 细胞株的增殖抑制活性(n=3)

Tab. 3　Antiproliferative activities of target compounds **4–18**, **22–28** on two breast cancer and MCF-10A cell lines (n=3)

化合物	IC_{50}/μmol·L^{-1}			IVTI [IC_{50}(MDA-MB-231)/IC_{50}(MCF-10A)]
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A	
3	25.5±1.83	10.7±1.41	>100	>9.3
4	19.7±2.17	9.4±1.25	>100	>10.6
5	15.9±1.44	7.5±0.96	94.8±8.27	12.6
6	17.4±1.59	10.3±1.07	>100	>9.7
7	18.2±2.07	7.1±0.69	>100	>14.0
8	15.1±1.74	5.3±0.53	>100	>18.8
9	16.8±1.86	5.9±0.64	>100	>16.9
10a	14.6±1.55	3.8±0.36	>100	>26.3
10b	15.2±1.43	4.4±0.58	>100	>22.7
10c	14.9±1.68	5.2±0.74	>100	>19.2
11	17.2±1.76	6.7±1.25	>100	>14.9
12	13.8±1.52	5.6±0.96	>100	>17.8
13	12.9±0.97	8.4±0.92	>100	>11.9
14	16.5±2.14	7.0±0.85	>100	>14.0
15	15.1±1.82	4.6±0.39	>100	>21.7
16	13.3±1.66	4.2±0.58	96.7±9.62	23.0
17a	10.4±1.54	3.1±0.27	>100	>32.2
17b	12.8±1.39	3.5±0.55	>100	>28.5
17c	11.7±1.75	4.7±0.61	>100	>21.2
18	14.1±1.59	3.3±0.74	>100	>30.3
22	13.5±0.82	5.4±0.29	>100	>18.5
23	16.1±2.17	3.3±0.45	>100	>30.3
24	10.9±0.96	6.9±0.78	>100	>14.4
25	12.4±1.53	5.6±0.52	>100	>17.8
26	9.7±1.18	3.1±0.54	>100	>32.2
27	10.3±1.25	2.7±0.33	>100	>37.0
28a	7.2±0.86	1.6±0.23	>100	>62.5
28b	9.5±0.71	1.9±0.19	>100	>52.6
28c	7.8±0.83	2.2±0.17	>100	>45.4
他莫昔芬	19.3±1.35	16.5±1.43	13.7±1.17	0.8

3.4 构效关系研究

从上述活性结果可以发现：①目标二茂铁衍生物对荷尔蒙依赖型乳腺癌 MCF-7 细胞和 TNBCMDA-MB-231 细胞均有较强抑制活性，并显著强于先导化合物 **3**。同时，这些二茂铁衍生物对 MDA-MB-231 细胞展现出了更强的选择性和抑制活性，其抑制 MDA-MB-231 的活性(IC_{50}< 11 μmol·L^{-1})均显著地强于阳性药物他莫昔芬(IC_{50}=16.5 μmol·L^{-1})；②芳环(Ar)上的取代基对活性影响较大，总的来说，芳环含有吸电子基取代的化合物抗肿瘤活性强于相应的给电子基化合物，尤其是 4-F 取代的化合物 **28a** [IC_{50}=(1.6±0.23)μmol·L^{-1}]对 MDA-MB-231 展现出了最强的抑制活性，甚至是阳性药物他莫昔芬的 10 倍，而进一步将化合物 **28a** 芳环上的 F 从对位转移到间位[化合物 **28b**，IC_{50}=(1.9±0.19)μmol·L^{-1}]或邻位[化合物 **28c**，IC_{50}=(2.2±0.17)μmol·L^{-1}]均降低了抗癌活性，这些结果说明芳环上的对取代能够提高抗肿瘤活性。事实上，在嘧啶类化合物和二氢吡咯类化合物中，也有着同样的规律，即 4-F 取代化合物的抗肿瘤活性强于其相应的间位和邻位取代衍生物；③除了取代基外，化合物中的杂环对抗肿瘤活性也有较大的影响，其中咪唑杂环类化合物抗肿瘤活性强于相应的二氢吡咯、吡咯和嘧啶杂环化合物；④所合成的二茂铁衍生物对正常的乳腺上皮细胞没有毒性并有较高的治疗指数(IVTI>9)，而他莫昔芬[IC_{50}=(13.7±1.17)μmol·L^{-1}]却展现出了较强的细胞毒性，其 IVTI 值仅为 0.8。

4 结论

本实验以前期获得的二茂铁查耳酮为先导化合物，对其进行结构修饰，合成了一系列具有不同杂环的二茂铁衍生物，这些目标化合物抗乳腺癌活性均强于其先导化合物，并对 TNBCMBA-MD-231 细胞展现出了较强的选择性和抑制活性，其中化合物 **28a** 对 MBA-MD-231 展现出了最强的活性，分别是先导化合物和他莫昔芬的 6 和 10 倍；此外，这些二茂铁衍生物对正常的乳腺上皮细胞 MCF-10A 没有毒性。这些结果说明，对查耳酮的 α,β-不饱和酮进行修饰能够提高其抗肿瘤活性，这为今后发展新型、高效、低毒的抗 TNBC 药物提供了新的思路。

REFERENCES

[1] BURNETT J P, LIM G, LI Y, et al. Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells [J]. Cancer Lett, 2017(394): 52-64.

[2] COSTA R, SHAH A N, SANTA-MARIA C A, et al. Targeting epidermal growth factor receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development [J]. Cancer, 2017(53): 111-119.

[3] XU Y, GAO X. Influence of the medication administration sequence of docetaxel and epirubicin on the therapeutic effect during chemotherapy for breast cancer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 33(6): 745-747.

[4] CHI Q Q, GENG W Q, ZHANG H, et al. Preparation and characteristics of glaucocalyxin A-loaded nanoliposomes and its inhibition of triple negative breast cancer（TNBC）[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(23): 2724-2731.

[5] WANG Y CHAN F L, CHEN S, et al. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase [J]. Life Sci, 2005, 77(1): 39-51.

[6] TAN J. Synthesis of chalcone derivatives and anti-breast cancer screening [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 318-325.

[7] CHEN S L, TAN J. Synthesis of ferrocenyl chalcone compounds and their anti-breast cancer activities [J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2015, 30(8): 913-916.

[8] KAPLANCIKI Z A, TURAN-ZITOUNI G, OZDEMIR A, et al. Synthesis and antinociceptive activities of some pyrazoline derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44(6): 2606-2610.

[9] LEBLANC R, DICKSON J, BROWN T, et al. Synthesis and cytotoxicity of epoxide and pyrazole analogs of the combretastatins [J]. Bioorg Med Chem, 2005, 13(21): 6025-6034.

[10] KERR D J, HAMEL E, JUNG M K, et al. The concise synthesis of chalcone, indanone and indenone analogues of combretastatin A4 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 15(9): 3290-3298.

[11] LEE L, DAVIS R, VANDERHAM J, et al. 1,2,3,4-Tetrahydro-2-thioxopyrimidine analogs of combretastatin-A4 [J]. Eur J Med Chem, 2008, 43(9): 2011-2015.

[12] MULLER P K, MOLTON M N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 751-761.

收稿日期：2017-04-27

(本文责编：蔡珊珊)