

# 新型吡咯烷-查尔酮类衍生物的设计、合成及抗宫颈癌活性研究

杨争, 刘正叶, 木合布力·阿布力孜\*, 艾孜提艾力·艾海提, 玉苏普瓦吉木·阿力木江, 廖波儿, 赛力克阿拉·阿里汗 (新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**摘要:** 目的 设计、合成系列新型氮杂查尔酮类衍生物并研究其抗宫颈癌活性和作用机制。方法 以甘草查尔酮为先导化合物, 以 VEGFR-2 和 P-gp 为靶点, 采用活性亚结构拼接原理, 设计并合成一系列新型查尔酮类衍生物, 利用  $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  和 HR-MS 对结构进行表征。采用 MTT、ELISA、联合顺铂用药、Western blotting 和分子对接试验, 初步评价了目标化合物对宫颈癌和顺铂耐药宫颈癌细胞的增殖抑制活性及作用机制。结果 化合物 **7h** 具有一定的抗肿瘤活性和逆转顺铂耐药作用, 对 VEGFR-2 及下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的磷酸化具有一定的抑制作用, 并在 0.5, 1.0, 1.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度内对 P-gp 蛋白表达量与空白组相比无显著性差异。结论 化合物 **7h** 的抗宫颈癌活性和逆转顺铂耐药作用, 可能与其抑制了 VEGFR-2 和 P-gp 靶点有关。

**关键词:** 先导化合物; 查尔酮类衍生物; 宫颈癌; 顺铂耐药宫颈癌; 新型分子靶向

中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)04-0439-13

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230818

引用本文: 杨争, 刘正叶, 木合布力·阿布力孜, 等. 新型吡咯烷-查尔酮类衍生物的设计、合成及抗宫颈癌活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(4): 439-451.

## Design, Synthesis and Anti-cervical Cancer Activity of Novel Pyrrolidine-chalcone Derivatives

YANG Zheng, LIU Zhengye, MOURBOUL Ablise\*, AIZITIAILI Aihaiti, YUSUPUWAJIMU Alimujiang, LIAO Boer, SAILIKEALA Alihan (College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To design and synthesize a series of novel azachalcone derivatives and study of their anti-cervical cancer activity and mechanism of action. **METHODS** A series of novel chalcone derivatives were designed and synthesized by using glycyrrhiza chalcone as the lead compound and VEGFR-2 and P-gp as the target sites using the active substructure splicing principle, and the structures were characterized by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and HR-MS. MTT, ELISA, co-dosing with cisplatin, Western blotting and molecular docking assays were used to preliminarily evaluate the proliferation inhibitory activity and mechanism of action of the target compounds on cervical cancer and cisplatin-resistant cervical cancer cells. **RESULTS** Compound **7h** showed some antitumor activity and reversal of cisplatin resistance, and had some inhibitory effects on phosphorylation of VEGFR-2 and downstream PI3K/AKT signaling pathway proteins, with no significant differences on P-gp protein expression compared with the blank group in the concentration range of 0.5, 1.0, 1.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION** The anti-cervical cancer activity and reversal of cisplatin resistance of compound **7h** may be related to its inhibition of VEGFR-2 and P-gp targets.

**KEYWORDS:** lead compound; chalcone derivatives; cervical cancer; cisplatin-resistant cervical cancer; novel molecular targeting

2020 年全球新增宫颈癌病例为 60.4 万例, 占当年总患癌病例的 3.1%, 死亡人数为 34.2 万人, 占总患癌病例中死亡人数的 3.4%<sup>[1]</sup>。目前顺铂仍是宫颈癌化疗首选药物, 但因存在选择性低, 不良反应大, 肿瘤多药耐药和易复发等疑难问题, 最终导致治疗失败<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular

endothelial growth factor, VEGF) 和血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 在宫颈癌前病变和侵袭性癌中高表达, 与临床病理参数恶化密切相关, 因此, 靶向 VEGF/VEGFR-2 信号通路被认为是治疗宫颈癌的有效策略<sup>[3-4]</sup>。肿瘤多药耐药 (multi

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160654, 81960625); 新疆维吾尔自治区重点实验室项目 (XJDX1713); 新疆维吾尔自治区科技计划项目 (2022D01C210); 新疆维吾尔自治区教育厅研究生科研创新项目 (XJ2022G168)

作者简介: 杨争, 男, 博士生, 讲师 E-mail: 511699248@qq.com \*通信作者: 木合布力·阿布力孜, 男, 博士, 教授 E-mail: 1784383217@qq.com

resistance, MDR) 是导致肿瘤治疗失败和复发的主要原因, 而肿瘤细胞过度表达 ABCB1 [ 又称 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp)] 又是引起 MDR 较为明确的原因<sup>[5]</sup>。目前宫颈癌多药耐药已被广泛证明是由 P-gp 的上调引起, 其中宫颈癌顺铂耐药就是因肿瘤细胞高表达 P-gp 引起<sup>[6]</sup>。因此, 在解决顺铂化疗毒性的同时更需要关注顺铂耐药的疑难问题。

天然活性成分查尔酮微量存在于甘草、红花等药用植物中<sup>[7]</sup>, 其  $\alpha, \beta$ -不饱和结构显示出不同的药理特性<sup>[8]</sup>。研究发现, 含氮查尔酮衍生物 **1** 和 **2** 对 VEGFR-2 激酶具有潜在的抑制活性, 这与肿瘤细胞增殖及血管生成密切相关<sup>[9-10]</sup>。将查尔酮的  $\alpha, \beta$  不饱和和丙烯酮取代索拉非尼的脲基团可提高其细胞毒活性, 其中化合物 **4** 对 HepG2、MCF-7 和 PC-3 细胞有较好的细胞毒作用, 其  $IC_{50}$  值分别为  $0.56 \pm 0.83$ ,  $3.88 \pm 1.03$ ,  $3.15 \pm 0.81 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是索拉非尼的 1.03~6.14 倍, 显示出较好的抗肿瘤活性。另外, 化合物 **3**, **4** 和 **5** 对 VEGFR-2 的  $IC_{50}$  值分别为 0.72, 3.2,  $1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[11]</sup>。查尔酮通过调节 ABCG2/P-gp/BCRP 来介导常规化疗药物耐药性的能力, 是肿瘤细胞内药物蓄积的重要原因<sup>[12-13]</sup>。研究表明, 查尔酮衍生物 **6** 与阿霉素联用后, 作为 P-gp 药物外排泵的竞争性抑制剂, 增加了耐药细胞中阿霉素的浓度, 从而增加了阿霉素对耐药细胞的抗肿瘤活性<sup>[14]</sup>。见图 1。

虽然天然查尔酮具有一定的抗肿瘤活性, 且结构简单、易于合成, 但是水溶性差、生物利用度低、热力学性质不稳定和细胞选择性低等缺点限制了其成药性。含氮杂环是抗肿瘤药物设计中的重要药效团, 大多数新型分子靶向抗肿瘤药物的化学结构中均含有氮杂环的修饰<sup>[15]</sup>。通过引入含氮杂环可以增强母体化合物的生物活性及亲水性<sup>[16-17]</sup>。吡咯烷侧链作为一种活性优异的分子结构片段, 存在于部分生物活性分子及上市药物结构中<sup>[18]</sup>。研究发现, 许多 MDR 调节剂的一个共同特点是至少有 1 个碱性氮<sup>[14]</sup>。因此认为, 查尔酮母核与其他含氮杂环类抗肿瘤基团杂交产生的氮杂查尔酮衍生物, 在提高抗肿瘤活性及克服肿瘤耐药性等方面具有较好的研究潜力<sup>[19]</sup>。

目前化疗毒性和肿瘤多药耐药仍是宫颈癌治疗失败的主要原因。课题组前期研究发现, 查尔酮类衍生物具有显著的抗宫颈癌活性作用, 且对正常细胞的毒性较小, 其中羟基、甲氧基、对二

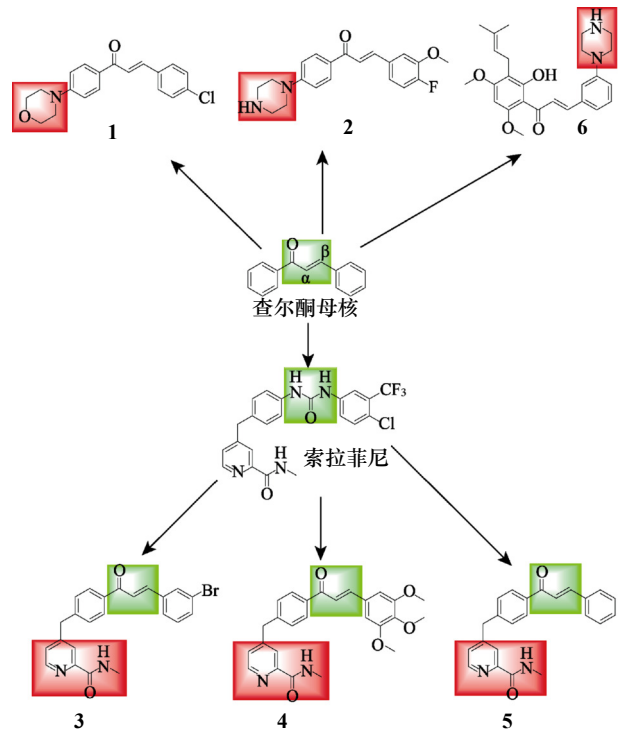


图 1 含氮查尔酮衍生物化学结构

Fig. 1 Chemical structures of nitrogen-containing chalcone derivatives

氨基和卤素等基团的引入, 显著增强了查尔酮衍生物的抗宫颈癌活性作用<sup>[20]</sup>。研究发现, 含多个羟基的查尔酮衍生物异甘草素能够抑制 VEGF/VEGFR-2 信号转导, 提高细胞凋亡率, 且不良反应小<sup>[21]</sup>。在乳腺癌耐药蛋白选择性抑制剂的研究中发现, 查尔酮的甲氧基化在抑制效力和细胞毒性中起到关键作用<sup>[22]</sup>。含碱性的 N 原子, 特别是叔胺基可以是烷基叔胺、哌嗪、取代的吡咯、哌啶、吡嗪、咪唑或吡啶等形式, 在生理 pH 值下叔氮原子可形成阳离子, 并通过氢键作用力增强与 P-gp 的结合, 这一特征可能是 MDR 逆转剂所必需的<sup>[23]</sup>。因此, 本研究采用活性亚结构拼接原理, 在查尔酮母核上合理引入含氮杂环吗啉环和吡咯烷及羟基、甲氧基、对二甲氨基和对二乙氨基活性基团, 设计、合成系列新型含氮杂环查尔酮衍生物。通过抗宫颈癌活性、构效关系分析和机制初探, 筛选出抗宫颈癌活性和逆转宫颈癌顺铂耐药活性较显著的候选化合物, 为基于 VEGFR-2 和 P-gp 双靶点新型抑制剂的设计提供一条思路。

## 1 仪器与试剂

AS 3120 超声波清洗器 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); EL204-2C 型电子分析天平 (瑞士梅特

勒公司); X-4 型显微熔点仪 (上海精密科学仪器有限公司); ZF-7 型暗箱紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司); Bruker Avance III 400 HD 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); Scientific Q Exactive 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo 公司); SOPTOP 型倒置显微镜 (宁波舜宇仪器公司); Victor nivo 多功能酶标仪 (珀金埃尔默有限公司); 200~300 目柱色谱硅胶 (青岛海洋化工)。

顺铂对照品 (上海 MACKLIN 公司, 货号: D798888; 纯度: 99.5%); 索拉菲尼对照品 (上海 aladdin, 货号: S125098; 纯度  $\geq 99\%$ ); 实验室合成所用试剂及原料药均用市售分析纯商品; 胎牛血清 (美国 Sigma, 货号: F2442); 青霉素/链霉素溶液 (货号: SV30010)、胰酶 (货号: SH30042.01)、DMEM 培养基 (货号: SH30243.01B) 均购自美国 HyClone; 人磷酸化血管内皮细胞生长因子受体 2(p-VEGFR2)ELISA 检测试剂盒 (上海优选生物科技有限公司, 货号: YX-E160716); 人宫颈癌细胞 HeLa 和 Siha、人正常宫颈上皮细胞 H8、人脐静脉内皮细胞 HUEVC 和人宫颈癌顺铂耐药细胞 HeLa/DDP 均由新疆医科大学中心实验室提供; VEGFR-2、p-VEGFR-2、 $\beta$ -actin (英国 abcam 公司, 货号分别为 ab134191, ab194806, ab198991); PI3K、P-PI3K、Akt、P-Akt、MDR1/ABCB1 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号分别为 4257, 17366, 4691, 4060, 13342); Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP (美国 Affinity Bioscience 公司, 货号: S0001); 高效 RIPA 裂解液 (北京 Solarbio 公司, 货号: R0010); BCA 测定试剂盒 (北京 Solarbio 公司, 货号: PC0020)。

## 2 方法

### 2.1 目标化合物的合成

以间苯二酚为起始原料, 在氯化锌和冰乙酸

反应条件下, 经亲核取代得中间体 **1**; 在碳酸钾和丙酮中, 中间体 **1** 经酚羟基保护生成中间体 **2**; 在冰乙酸和氯甲基甲醚存在下, 中间体 **2** 经 Blanc 氯甲基化反应生成中间体 **3**; 在二氯甲烷和三乙胺反应条件下, 中间体 **3** 与吗啉环和吡咯烷经烷基化反应生成中间体 **4** 和 **5**; 最后通过 Claisen-Schmidt 反应原理, 将中间体 **4** 和 **5** 分别与苯甲醛类衍生物反应, 得到新型含氮杂环查尔酮类衍生物 (**6a~6h**, **7a~7h**)。合成路线见图 2。

**2.1.1** 1-(2,4-二羟基苯基)乙酮 (**1**) 的合成<sup>[24]</sup> 将 11.10 g (100 mmol) 间苯二酚和 7.8 g (57 mmol) 无水  $ZnCl_2$  粉末加到盛有 15 mL 冰乙酸的 100 mL 三颈瓶中, 加热搅拌, 温度控制在 110~115  $^{\circ}C$ , 反应 3 h, 冷却后得到黏稠液体, 用吸管将黏稠液体滴入 30 mL 冰蒸馏水中, 橘红色晶体逐渐析出, 抽滤, 用冰蒸馏水洗涤, 50  $^{\circ}C$  干燥, 得橘红色固体 9.2 g (60.47 mmol), 产率 60.47%, mp: 143.5~144.5  $^{\circ}C$ ;  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  12.65 (s, 1H, -OH), 10.57 (s, 1H, -OH), 7.65 (d,  $J=8.8$  Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (dd,  $J=8.8, 2.4$  Hz, 1H, Ar-H), 6.28 (d,  $J=2.4$  Hz, 1H, Ar-H), 2.53 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$ -NMR (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  202.93, 165.35, 164.81, 133.83, 113.23, 108.51, 102.85, 26.39。 HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $C_8H_8O_3^+$  (M+H)<sup>+</sup> 153.054 62, found 153.054 70。

**2.1.2** 1-(2-羟基-4-甲氧基苯基)乙烷-1-酮 (**2**) 的合成<sup>[25]</sup> 在 500 mL 圆底烧瓶中加入 50.00 g (329 mmol) 中间体 **1**, 加入 150 mL 丙酮使之溶解, 加入 67.62 g (490 mmol) 无水碳酸钾, 充分搅拌后用滴液漏斗滴加 66.76 g (530 mmol) 硫酸二甲酯。50  $^{\circ}C$  恒温搅拌, 逐渐析出白色固体。TLC 监测反应进程, 6 h 后停止反应。抽滤, 取棕红色液

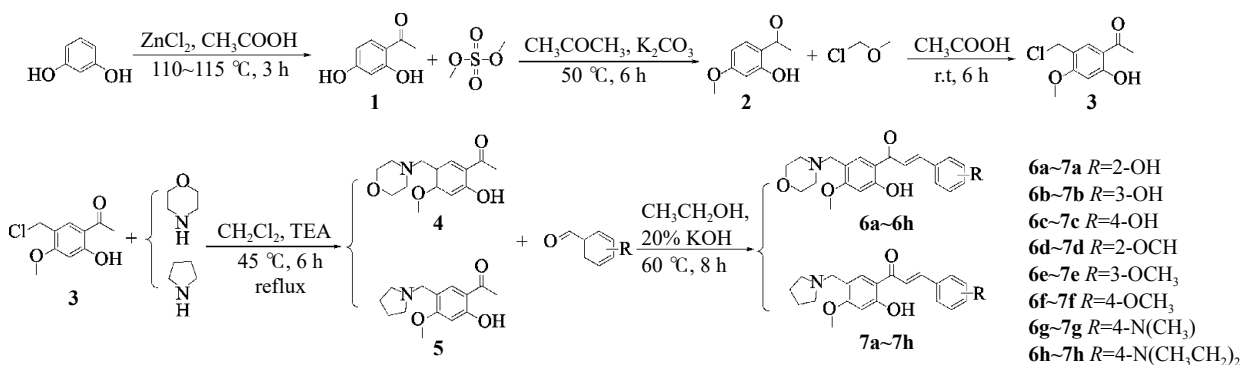


图 2 查尔酮类衍生物 **6a~6h** 和 **7a~7h** 的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of chalcone derivatives **6a~6h** and **7a~7h**

体, 旋蒸出丙酮, 收集剩余反应液于 4 °C 析晶, 抽滤, 干燥, 得 35.60 g (214 mmol) 橙黄色片状固体, 产率 65.05%, mp: 47.9~48.8 °C; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ12.74(s, 1H, -OH), 7.61(d, *J*=8.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.44(d, *J*=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.41(dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 3.86(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 2.54(s, 3H, -CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ202.58, 166.10, 165.24, 132.31, 113.89, 107.57, 101.14, 100.83, 55.53, 26.17。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>(M+H)<sup>+</sup>167.070 27, found 167.070 37。

**2.1.3** 1-(5-(氯甲基)-2-羟基-4-甲氧基苯基)乙烷-1-酮 (**3**) 的合成 在 100 mL 圆底烧瓶中加入 25.0 g (150 mmol) 中间体 **2**, 加入 50 mL 冰乙酸使之溶, 然后用滴液漏斗滴加氯甲基甲醚 25.0 g (311 mmol), 室温搅拌 3 h, 开始有白色固体析出, 反应至 6 h 时, 反应液呈凝固状态, 静置, 抽滤, 滤饼用冰无水乙醇洗涤, 50 °C 干燥, 得白色针晶状固体 15.99 g (74.5 mmol), 产率为 49.67%, mp: 115.4~116.3 °C; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ12.84(s, 1H, -OH), 7.68(d, *J*=1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.42(s, 1H, Ar-H), 4.59(d, *J*=1.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.91(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 2.57(s, 3H, -CH<sub>3</sub>)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ202.54, 165.79, 163.77, 133.02, 117.73, 113.33, 99.72, 56.06, 41.34, 26.26。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>ClO<sub>3</sub><sup>+</sup>(M+H)<sup>+</sup> 215.046 95, found 215.046 81。

**2.1.4** 1-(2-羟基-4-甲氧基-5-((吗啉甲基)苯基))乙烷-1-酮 1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)乙酮 (**4**) 的合成 在 100 mL 三颈瓶中加入 1.6 g (7.45 mmol) 中间体 **3**, 加入 25 mL 二氯甲烷使之溶, 加入 1.3 g (14.9 mmol) 吗啉环, 滴加 2 mL 三乙胺。45 °C 加热回流搅拌 6 h, 反应液颜色变深, 析出白色固体, 停止反应。用稀 HCl 调溶液 pH 值至 2~3, 分离取水层加碳酸钾, 调 pH 值至 9~10, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 蒸干乙酸乙酯, 放置得黄白色固体 2.01 g (7.57 mmol), 收率为 72.19%, mp: 92.4~93.6 °C; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ12.73(s, 1H, -OH), 7.68(s, 1H, Ar-H), 6.40(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.72(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.46(s, 2H,

-CH<sub>2</sub>-), 2.57(s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.49(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ202.72, 164.45, 164.41, 132.63, 117.51, 113.25, 99.16, 67.03(2C), 55.78, 55.77, 53.52 (2C), 26.28。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>(M+H)<sup>+</sup> 266.138 68, found 266.138 64。

**2.1.5** 1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)乙酮 (**5**) 的合成 合成方法与中间体 **4** 相同, 黄色固体, 收率为 91.14%, mp: 71.3~72.4 °C; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ12.74(s, 1H, -OH), 7.66(s, 1H, Ar-H), 6.39(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.57(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.57(s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.56~2.49(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.80(dt, *J*=4.8, 4.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ202.77, 164.32, 164.13, 132.41, 119.27, 113.19, 99.18, 55.75, 54.14(2C), 53.23, 26.32, 23.49(2C)。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>(M+H)<sup>+</sup> 250.143 77, found 250.144 03。

**2.1.6** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(2-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6a**) 的合成 在 100 mL 三颈瓶中加入 0.531 g (2 mmol) **4** 和 0.733 g (6 mmol) 2-羟基苯甲醛, 加入 20 mL 无水乙醇使之溶解, 加入 10 mL 20% 氢氧化钾溶液至反应体系, 至于磁力搅拌锅 60 °C 加热搅拌。TLC 监测反应进程, 8 h 后终止反应, 蒸干无水乙醇, 用乙酸乙酯溶解剩余物, 乙酸乙酯层用饱和 NaCl 溶液洗涤 3 次后, 蒸干乙酸乙酯, 用无水乙醇重结晶, 得暗红色油状物 0.47 g, 收率为 54.60%; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ13.44(s, 1H, -OH), 10.28(s, 1H, -OH), 8.12(d, *J*=15.8 Hz, 1H, β-H), 8.02(s, 1H, Ar-H), 7.77~7.69(m, 2H, α-H, Ar-H), 7.22(ddd, *J*=8.4, 7.4, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.00(dd, *J*=8.4, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.76(t, *J*=7.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.55(s, 1H, Ar-H), 3.84(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.62~3.51(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.42(d, *J*=7.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.38(ddd, *J*=11.4, 5.8, 2.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ192.67, 165.61, 164.53, 160.87, 141.54, 132.63, 132.59, 130.31, 121.90, 119.55, 118.23, 117.68, 117.41, 113.71, 99.92, 66.69(2C), 56.41, 55.93, 53.56(2C)。 HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup>(M+H)<sup>+</sup> 370.164 90, found

370.164 98。

采用同法合成化合物 **6b-6h** 和 **7a-7h**, 理化性质和波谱数据见“2.1.7~2.1.21”项下。

**2.1.7** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(3-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6b**) 的合成 橘红色固体粉末, 收率为 51.12%, mp: 210.3~211.6 °C, <sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ13.43(s, 1H, -OH), 9.70(s, 1H, -OH), 8.11(s, 1H, Ar-H), 7.87(d, *J*=15.4 Hz, 1H, α-H), 7.74(d, *J*=15.4 Hz, 1H, β-H), 7.33(d, *J*=7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.33~7.18(m, 2H, Ar-H), 6.91(dt, *J*=7.8, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.57(s, 1H, Ar-H), 3.87(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.58(q, *J*=5.4, 4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.39(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.41(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ192.25, 165.65, 165.06, 158.24, 144.76, 136.29, 133.49, 130.37, 121.53, 120.65, 118.50, 117.76, 115.75, 113.45, 99.87, 66.69(2C), 56.50, 55.98, 53.48(2C)。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 370.164 90, found 370.165 25。

**2.1.8** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(4-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6c**) 合成 黄色固体粉末, 收率为 48.79%, mp: 204.1~205.2 °C, <sup>1</sup>H-NMR(400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ13.68(s, 1H, -OH), 10.19(s, 1H, -OH), 8.10(s, 1H, Ar-H), 7.84~7.71(m, 4H, α,β-H, Ar-H), 6.88(d, *J*=8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.55(s, 1H, Ar-H), 3.86(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.57(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.46(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.41(t, *J*=9.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ192.27, 165.71, 164.83, 160.90, 145.17, 133.36, 131.79(2C), 126.13, 117.75, 117.55, 116.35(2C), 113.38, 99.86, 66.68(2C), 56.44, 56.07, 53.48(2C)。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 370.164 90, found 370.165 07。

**2.1.9** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(2-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6d**) 的合成 黄色固体粉末, 收率为 85.07%, mp: 136.2~137.5 °C; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ13.57(s, 1H, -OH), 8.19(d, *J*=15.8 Hz, 1H, β-H), 7.88(d, *J*=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.72(d, *J*=15.8 Hz, 1H, α-H), 7.64(dt, *J*=7.8, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.44~7.34(m, 1H, Ar-H), 7.03(td, *J*=7.8, 2.4 Hz,

1H, Ar-H), 6.95(dd, *J*=8.4, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.45(s, 1H, Ar-H), 3.94(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.86(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.74(dt, *J*=5.4, 2.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.49(d, *J*=2.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.51(dd, *J*=6.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ192.50, 165.92, 164.38, 158.90, 139.95, 131.95, 131.61, 129.49, 123.85, 121.11, 120.82, 117.35, 113.60, 111.31, 99.44, 67.13(2C), 55.97, 55.78, 55.59, 53.58(2C)。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 384.180 55, found 384.180 97。  
**2.1.10** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(3-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6e**) 的合成 黄色固体粉末, 收率为 76.11%, mp: 121.2~123.3 °C, <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ13.44(s, 1H, -OH), 7.85~7.78(m, 2H, β-H, Ar-H), 7.58(d, *J*=15.8 Hz, 1H, α-H), 7.35(t, *J*=7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.31~7.22(m, 1H, Ar-H), 7.17(t, *J*=2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.98(dd, *J*=8.4, 2.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.45(s, 1H, Ar-H), 3.87~3.86(m, 6H, 2×-OCH<sub>3</sub>), 3.74(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.49(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.51(t, *J*=4.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ191.83, 166.02, 164.63, 159.97, 144.22, 136.21, 131.67, 130.03, 121.17, 120.75, 117.56, 116.25, 113.75, 113.47, 99.48, 67.10(2C), 55.89, 55.81, 55.37, 53.55(2C)。 HRMS(ESI) *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup> 384.180 55, found 384.180 76。

**2.1.11** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)-3-(4-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**6f**) 的合成 橘红色固体粉末, 收率为 77.23%, mp: 172.2~173.4 °C, <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, Chloroform-*d*) δ13.57(s, 1H, -OH), 7.91~7.82(m, 2H, β-H, Ar-H), 7.64~7.61(m, 2H, Ar-H), 7.48(d, *J*=15.4Hz, 1H, α-H), 6.98~6.95(m, 2H, Ar-H), 6.45(s, 1H, Ar-H), 3.87(d, *J*=2.4 Hz, 6H, 2×-OCH<sub>3</sub>), 3.75(dd, *J*=6.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.50(d, *J*=2.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.56~2.48(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。 <sup>13</sup>C-NMR(101 MHz, Chloroform-*d*) δ191.93, 165.93, 164.43, 161.83, 144.22, 131.60, 130.40(2C), 127.57, 117.93, 117.36, 114.51(2C), 113.52, 99.49, 67.10(2C), 55.95, 55.79,

55.45, 53.55(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{26}NO_5^+(M+H)^+$  384.180 55, found 384.180 91。

**2.1.12** (*E*)-3-(4-(二甲基氨基)苯基)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)丙-2-烯-1-酮的 (**6g**) 合成 紫色固体粉末, 收率为 80.10%, mp: 174.8~175.8 °C,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.80(s, 1H, -OH), 7.91~7.83(m, 2H, Ar-H,  $\beta$ -H), 7.61~7.53(m, 2H, Ar-H), 7.40(d,  $J=15.4$ Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.73~6.66(m, 2H, Ar-H), 6.44(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75(q,  $J=4.4$ Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.49(d,  $J=8.4$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.05[s, 6H, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.51(q,  $J=7.4$ , 5.8 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 191.94, 165.77, 164.05, 152.17, 145.36, 131.49, 130.65(2C), 122.55, 117.00, 114.70, 113.70, 111.85(2C), 99.45, 67.12(2C), 56.01, 55.75, 53.55(2C), 40.12(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{29}N_2O_4^+(M+H)^+$  397.212 18, found 397.212 10。

**2.1.13** (*E*)-3-(4-(二乙基氨基)苯基)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吗啉甲基)苯基)丙-2-烯-1-酮的 (**6h**) 合成 深紫色固体粉末, 收率为 70.77%, mp: 170.7~171.9 °C,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.85(s, 1H, -OH), 7.88~7.85(m, 2H, Ar-H,  $\beta$ -H), 7.56~7.52(m, 2H, Ar-H), 7.38(d,  $J=15.4$  Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.70~6.66(m, 2H, Ar-H), 6.44(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.75(q,  $J=4.8$  Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 3.49(d,  $J=7.8$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.42[q,  $J=7.4$  Hz, 4H, -N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], 2.56~2.47(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO), 1.21(t,  $J=7.4$  Hz, 6H, 2 $\times$ -CH<sub>3</sub>)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 191.92, 165.80, 165.74, 149.88, 145.44, 131.42, 131.01(2C), 121.77, 116.95, 114.03, 113.73, 111.34(2C), 99.45, 67.13(2C), 56.01, 55.73, 53.56(2C), 44.57(2C), 12.63(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{25}H_{33}N_2O_4^+(M+H)^+$  425.243 48, found 425.243 23。

**2.1.14** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(2-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮的 (**7a**) 合成 黄色油状物, 收率为 75.11%,  $^1H$ -NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 13.56(s, 1H, -OH), 10.26(s, 1H, -OH), 8.13(d,  $J=15.4$  Hz, 1H,  $\beta$ -H), 8.06(s, 1H, Ar-H), 7.94(d,  $J=15.4$  Hz,

1H,  $\alpha$ -H), 7.85(dd,  $J=7.8$ , 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.29(ddd,  $J=8.4$ , 7.4, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.97(d,  $J=8.4$  Hz, 1H, Ar-H), 6.88(ddd,  $J=8.4$ , 7.4, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.56(s, 1H, Ar-H), 3.86(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.59(d,  $J=0.8$ Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.57~2.41(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.69(dt,  $J=4.4$ , 2.4Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 192.58, 165.59, 164.49, 158.06, 140.32, 132.68, 132.52, 129.85, 121.76, 120.38, 119.79, 116.80, 113.50, 112.62, 99.78, 56.51, 56.42, 53.75(2C), 23.52(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{21}H_{24}NO_4^+(M+H)^+$  354.169 98, found 354.169 95。

**2.1.15** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(3-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮的 (**7b**) 合成 红褐色油状物, 收率为 64.82%,  $^1H$ -NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 13.36(s, 1H, -OH), 9.31(s, 1H, -OH), 7.83(s, 1H, Ar-H), 7.59(d,  $J=15.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 7.49(d,  $J=15.8$  Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.04~7.00(m, 1H, Ar-H), 6.95(t,  $J=7.8$  Hz, 1H, Ar-H), 6.69(t,  $J=2.4$  Hz, 1H, Ar-H), 6.55(dd,  $J=8.4$ , 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.35(s, 1H, Ar-H), 3.57(d,  $J=8.4$  Hz, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.24(d,  $J=1.8$  Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.25~2.18(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.42(t,  $J=4.4$  Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 192.14, 165.69, 162.61, 158.00, 140.89, 136.27, 130.26, 129.93, 121.93, 121.34, 120.49, 117.33, 115.79, 114.02, 99.66, 56.57(2C), 53.95, 53.68, 23.50(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{21}H_{24}NO_4^+(M+H)^+$  354.169 98, found 354.170 04。

**2.1.16** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(4-羟基苯基)丙烷-2-烯-1-酮的 (**7c**) 的合成 暗黄色油状物, 收率为 14.40%,  $^1H$ -NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 13.61(s, 1H, -OH), 9.56(s, 1H, -OH), 8.11(s, 1H, Ar-H), 7.83~7.75(m, 2H,  $\alpha,\beta$ -H), 7.38~7.30(m, 2H, Ar-H), 6.88~6.80(m, 2H, Ar-H), 6.53(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.59(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.50~3.43(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.69(dp,  $J=6.8$ , 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ 192.26, 165.66, 162.84, 158.16, 145.17,

132.96, 131.78(2C), 129.73, 117.72, 116.35 (2C), 115.60, 113.97, 99.69, 56.52, 56.40, 53.96(2C), 23.57(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{21}H_{24}NO_4^+$  (M+H) $^+$  354.169 98, found 354.169 95。

**2.1.17** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(2-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**7d**) 的合成 暗黄色固体粉末, 收率为 77.19%, mp: 110.6~111.9 °C,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.61(s, 1H, -OH), 8.20(d,  $J$ =15.8 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.89(s, 1H, Ar-H), 7.75(d,  $J$ =15.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 7.66(dt,  $J$ =7.8, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.41~7.30(m, 1H, Ar-H), 7.00(t,  $J$ =7.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.93(d,  $J$ =8.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.44(s, 1H, Ar-H), 3.91(m, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.85(m, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.63(d,  $J$ =1.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.62~2.49(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.81(dt,  $J$ =4.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 192.55, 165.86, 164.13, 158.84, 139.73, 131.89, 131.72, 129.37, 123.86, 121.15, 120.77, 118.77, 113.60, 111.23, 99.33, 55.77, 55.52, 54.05(2C), 53.21, 23.51(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{26}NO_4^+$  (M+H) $^+$  368.185 63, found 368.185 94。

**2.1.18** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(3-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**7e**) 的合成 黄色固体粉末, 收率为 77.19%, mp: 122.8~123.9 °C,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.46(s, 1H, -OH), 7.88~7.80(m, 2H,  $\beta$ -H, Ar-H), 7.60(d,  $J$ =15.8 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 7.35(t,  $J$ =7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.26(d,  $J$ =8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.17(t,  $J$ =2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.97(dd,  $J$ =8.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.45(s, 1H, Ar-H), 3.87(d,  $J$ =1.4 Hz, 6H, 2 $\times$ -OCH<sub>3</sub>), 3.61(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.61~2.57(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.81(dt,  $J$ =4.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 191.91, 165.93, 164.42, 159.95, 144.13, 136.28, 131.55, 129.96, 121.27, 120.93, 119.37, 116.29, 113.66, 113.46, 99.41, 55.82, 55.39, 54.15(2C), 53.28, 23.53(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{26}NO_4^+$  (M+H) $^+$  368.185 63, found 368.185 91。

**2.1.19** (*E*)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)-3-(4-甲氧基苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**7f**) 的

合成 红棕色固体粉末, 收率为 72.24%, mp: 74.5~75.6 °C,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.61(s, 1H, -OH), 7.89(s, 1H, Ar-H), 7.85(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.71~7.60(m, 2H, Ar-H), 7.53(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.98~6.91(m, 2H, Ar-H), 6.44(s, 1H, Ar-H), 3.86~3.85(m, 6H, 2 $\times$ -OCH<sub>3</sub>), 3.64(d,  $J$ =1.4 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.60(d,  $J$ =6.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.82(dt,  $J$ =4.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 192.02, 165.85, 164.14, 161.76, 144.14, 131.67, 130.48(2C), 127.62, 118.76, 118.13, 114.44(2C), 113.55, 99.38, 55.78, 55.41, 54.05(2C), 53.17, 23.49(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{26}NO_4^+$  (M+H) $^+$  368.185 63, found 368.186 04。

**2.1.20** (*E*)-3-(4-(二甲基氨基)苯基)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**7g**) 的合成 棕红色油状物, 收率为 53.52%;  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.89(s, 1H, -OH), 7.99(s, 1H, Ar-H), 7.86(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.61~7.59(m, 2H, Ar-H), 7.48(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.71~6.67(m, 2H, Ar-H), 6.43(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.72(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.02[s, 6H, -N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2.69(ddd,  $J$ =12.4, 6.8, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.85(dt,  $J$ =4.4, 3.4 Hz, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N)。  $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 192.05, 165.87, 163.66, 152.14, 145.48, 132.02, 130.84(2C), 129.07, 122.60, 114.85, 113.84, 111.81(2C), 99.39, 55.78, 53.86(2C), 52.92, 40.08(2C), 23.44(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{23}H_{29}N_2O_3^+$  (M+H) $^+$  381.217 27, found 381.217 07。

**2.1.21** (*E*)-3-(4-(二乙基氨基)苯基)-1-(2-羟基-4-甲氧基-5-(吡咯烷-1-基甲基)苯基)丙烷-2-烯-1-酮 (**7h**) 的合成 暗红色油状物, 收率为 53.40%,  $^1H$ -NMR(400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ 13.93(s, 1H, -OH), 7.99(d,  $J$ =2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.86(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\beta$ -H), 7.67~7.55(m, 2H, Ar-H), 7.47(d,  $J$ =15.4 Hz, 1H,  $\alpha$ -H), 6.68~6.60(m, 2H, Ar-H), 6.44(s, 1H, Ar-H), 3.85(s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.71(s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.40[q,  $J$ =6.8 Hz, 4H, -N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], 2.70~2.64(m, 4H, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N), 1.85

(p,  $J=3.8$  Hz, 4H,  $-C_4H_8N$ ), 1.20(t,  $J=7.4$  Hz, 6H,  $2\times-CH_3$ )。 $^{13}C$ -NMR(101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ 192.06, 165.84, 163.60, 149.86, 145.57, 131.99, 131.20(2C), 129.41, 121.87, 117.32, 114.24, 111.30(2C), 99.40, 55.77, 53.84(2C), 52.93, 44.54(2C), 23.45(2C), 12.62(2C)。HRMS(ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{25}H_{33}N_2O_3^+$  (M+H) $^+$  409.248 57, found 409.248 66。

## 2.2 生物活性测试

**2.2.1 抗宫颈癌活性测试** 采用 MTT 法测试目标化合物对 HeLa、SiHa 和 H8 细胞的抑制活性, 根据细胞生长周期快慢程度, 将这 3 种细胞分别以  $1.5\times 10^4$ ,  $2.5\times 10^4$ ,  $4\times 10^4\cdot mL^{-1}$  的密度接种于 96 孔板中, 以每孔 200  $\mu L$ (每孔 3 000~8 000 个), 在 37  $^{\circ}C$  含 5%CO $_2$  培养箱培养 24 h, 此时 3 种细胞的密度均在 70% 左右。将旧培养液置换成浓度梯度为 1, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu mol\cdot L^{-1}$  的化合物和阳性药的培养基, 每孔 200  $\mu L$ , 培养 48 h。加入 5  $mg\cdot mL^{-1}$  MTT 溶液, 每孔 20  $\mu L$ , 培养 4 h, 弃去旧液, 加入 DMSO 溶液, 每孔 150  $\mu L$ , 震荡 10 min, 在 490 nm 条件下测定 OD 值, 计算抑制率。抑制率= $[(OD_{\text{对照}}-OD_{\text{药物}})/(OD_{\text{对照}}-OD_{\text{空白}})]\times 100\%$ 。统计抑制率, 并计算 IC $_{50}$  值, 实验结果用  $\bar{x}\pm s$  表示。以顺铂和索拉菲尼为阳性对照, 目标化合物和阳性药对同一种细胞都是在同一细胞数量水平上进行测试。

**2.2.2 抗 HUEVC 细胞活性测试** 采用 MTT 法对查尔酮、化合物 7h 和阳性药索拉菲尼进行体外抗 VEGF 刺激的人脐静脉内皮细胞系 HUVEC 研究, 以 50  $ng\cdot mL^{-1}$  的 VEGF 作为 HUVEC 细胞膜表面 VEGFR-2 受体的启动引子, 测定它们对 VEGFR-2 的抑制作用, 实验方法同“2.2.1”项下。

**2.2.3 体外 VEGFR-2 抑制试验** 采用人 p-VEGFR-2 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (Human p-VEGFR2 ELISA Kit instruction) 以 HeLa 细胞为体外实验模型, 对查尔酮、化合物 7h 和阳性药索拉菲尼进行体外抑制 VEGFR-2 活性评价, 用于检测 p-VEGFR-2 的表达。按照试剂盒说明书操作, 最后用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值)。抑制率= $[(OD_{\text{对照}}-OD_{\text{药物}})/(OD_{\text{对照}}-OD_{\text{空白}})]\times 100\%$ 。统计抑制率, 并计算 IC $_{50}$  值, 实验结果用  $\bar{x}\pm s$  表示。采用 Western blotting 来验证 7h 对 VEGFR-2 及下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白磷

酸化表达量的影响, 并以索拉菲尼为阳性对照。操作步骤: ①蛋白提取, 取对数生长期的 HeLa/DDP 细胞以  $3\times 10^5$  个 $\cdot mL^{-1}$  的密度均匀接种于 6 孔板, 置于细胞培养箱 24 h 后, 用 7h 处理细胞 24 h 提取蛋白。②蛋白定量, 按照 BCA 试剂盒说明书进行蛋白定量, 绘制标准曲线, 根据所测样品的吸光值, 计算样品实际蛋白浓度。③上样蛋白制备、制胶、电泳 (80 V, 30 min; 120 V, 60 min), 湿转 (300 mA, 3.5 h)、封闭 (BSA, 2 h)、洗膜 (每次 10 min, 3 次)、抗体孵育 (一抗过夜, 二抗 1 h) 和显色 (30 s) 的流程完成实验。

**2.2.4 体外抗 HeLa/DDP 细胞活性** 取化合物 7h 对 HeLa/DDP 细胞的抑制活性 $<10\%$  的 3 个浓度范围 0.5, 1.0, 1.5  $\mu mol\cdot L^{-1}$ , 分别与顺铂联合给药, 进行抗 HeLa/DDP 细胞活性测定。另外, 测定 7h 在以上 3 种浓度范围内对 HeLa/DDP 细胞中 P-gp 蛋白表达量的影响, 并以 P-gp 抑制剂维拉帕米 (6  $\mu mol\cdot L^{-1}$ ) 为阳性对照, 空白组为不含化合物浓度的完全培养基。MTT 测定方法同“2.2.1”项下, Western blotting 方法同“2.2.3”项下。

**2.2.5 分子对接试验** 将查尔酮和化合物 7h 分别与 VEGFR-2 和 P-gp 蛋白靶点进行分子对接研究, 蛋白晶体结构主要从 RCSB Protein Data Bank 数据库中获取, 小分子由 ChemOffice 18.0 绘制成 3D 格式, 经 MM-2 能量优化后保存为“pdb”格式备用。应用 Autodock Tools 1.5.6 软件进行格式转化和选择活性口袋, 以查尔酮和 7h 为配体, 与 VEGFR-2 和 P-gp 晶体结构进行分子对接, 蛋白晶体用 PyMOL 1.7.6 软件去除原文件中的水分子和配体, 加上极性氢原子和电荷, 最后通过软件显示结果图谱。

**2.2.6 统计学分析** 采用 Graphpad Prism 7.0 和 SPSS 23 软件进行数据分析, 符合正态分布的数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 目标化合物的合成

本研究以间苯二酚为起始原料, 经亲核取代、酚羟基保护、氯甲基化、氮烷基化和 Claisen-Schmidt 反应原理, 通过 5 步反应得到化合物 6a~6h 和 7a~7h, 产率为 14.40%~85.07%, 经  $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR 和 HR-MS 确证为目标化合物。

### 3.2 体外抗宫颈癌活性

化合物 **7a~7h** 对 HeLa 和 SiHa 细胞的增殖抑制活性要显著高于 **6a~6h**，其中化合物 **7h** 对 HeLa 和 SiHa 细胞的增殖抑制活性较强，且对正常细胞 H8 的毒性较小，抗肿瘤活性显著优于先导化合物查尔酮、阳性药顺铂和索拉菲尼 ( $P < 0.05$ )，结果见表 1。在查尔酮母核上引入吡咯烷等基团后，显著增强了抗宫颈癌活性作用，这可能与 VEGFR-2 的抑制有关，还需进一步验证。

表 1 化合物 **6a~6h** 和 **7a~7h** 的抗肿瘤活性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Tab. 1 Anticancer activity of compounds **6a~6h** and **7a~7h** ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

化合物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>		
	HeLa	SiHa	H8
<b>6a</b>	60.60±3.46	54.26±1.46	>100
<b>6b</b>	>100	53.13±5.13	>100
<b>6c</b>	69.06±7.74	78.58±5.56	68.99±6.62
<b>6d</b>	>100	77.96±9.34	>100
<b>6e</b>	96.92±4.47	>100	46.89±2.03
<b>6f</b>	80.03±6.85	82.80±7.04	>100
<b>6g</b>	57.11±4.99	>100	>100
<b>6h</b>	>100	>100	>100
<b>7a</b>	20.62±3.53	26.59±0.65	30.55±0.26
<b>7b</b>	21.15±0.53	14.56±0.27	20.97±0.16
<b>7c</b>	25.16±0.54	26.34±0.44	33.23±0.81
<b>7d</b>	20.86±0.40	12.50±1.69	17.94±1.14
<b>7e</b>	63.06±0.77	73.85±7.47	82.03±5.07
<b>7f</b>	36.36±0.89	21.26±0.38	41.85±2.42
<b>7g</b>	20.78±0.31	19.50±0.41	29.77±1.94
<b>7h</b>	8.10±0.45 <sup>(1)(2)(3)</sup>	8.87±0.46 <sup>(1)(2)(3)</sup>	26.71±2.01 <sup>(2)(3)</sup>
查尔酮	74.01±4.48	66.45±2.88	77.71±6.85
顺铂	13.60±1.63	20.70±1.85	24.75±1.37
索拉菲尼	10.78±0.15	14.99±1.20	18.41±1.04

注：与查尔酮比较，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ；与顺铂比较，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ；与索拉菲尼比较，<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with chalcone, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with cisplatin, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; compared with sorafenib, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ .

### 3.3 构效关系分析

当查尔酮 A 环被吗啉环取代，B 环被 -OH、-OCH<sub>3</sub>、4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 和 4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 取代后，所得化合物 **6a~6h** 对 HeLa 和 SiHa 细胞的抑制活性均不显著，说明亲水性活性基团吗啉环可能不是查尔酮衍生物的抗宫颈癌活性基团。

当查尔酮 A 环被吡咯烷取代，B 环取代基类型保持不变，所得化合物 **7a~7h** 的抗宫颈癌活性

显著高于吗啉环取代的 **6a~6h** 系列。其中，**7a~7c** 抗 HeLa 和 SiHa 细胞活性强弱顺序分别为 2-OH > 3-OH > 4-OH 和 3-OH > 4-OH > 2-OH，即 B 环上引入 3-OH 对 SiHa 细胞的抑制活性显著提高；**7d~7f** 抗 HeLa 和 SiHa 细胞活性强弱顺序分别为 2-OCH<sub>3</sub> > 3-OCH<sub>3</sub> > 4-OCH<sub>3</sub> 和 2-OCH<sub>3</sub> > 4-OCH<sub>3</sub> > 3-OCH<sub>3</sub>，即 B 环上引入 2-OCH<sub>3</sub> 的衍生物显著提高了抗肿瘤活性；**7g** 和 **7h** 抗 HeLa 和 SiHa 细胞活性显示，4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> > 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。通过构效关系分析发现，查尔酮的 A 环被吡咯烷修饰，B 环被 4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 取代后，所得衍生物 **7h** 对宫颈癌细胞的增殖抑制活性较其他化合物和阳性药显著提高，且毒性较小。因此，吡咯烷和 4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 可能是查尔酮衍生物的活性必须基团。

### 3.4 体外抗 HUEVC 细胞活性

化合物 **7h** 抗 HUEVC 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 (12.25±0.88) μmol·L<sup>-1</sup> 与索拉菲尼接近，但显著强于先导物查尔酮 ( $P < 0.05$ )。这说明 **7h** 可能具有抑制 HUEVC 细胞上 VEGFR-2 受体的潜力。结果见表 2。

表 2 体外抗 HUEVC 细胞活性作用

Tab. 2 *In vitro* HUEVC cell inhibitory assay

化合物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
查尔酮	77.51±4.20
<b>7h</b>	12.25±0.88 <sup>(1)(2)</sup>
索拉菲尼	9.20±1.22

注：与查尔酮比较，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ；与索拉菲尼比较，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with chalcone, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with sorafenib, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ .

### 3.5 体外 VEGFR-2 抑制试验

VEGFR-2 激酶被认为是一个具有开发潜在抗肿瘤药物的重要靶点<sup>[26]</sup>。因此，以人 p-VEGFR-2 ELISA 和索拉菲尼为参考药物的比色法，进一步研究了在 HeLa 细胞中查尔酮和 **7h** 对 VEGFR-2 的抑制能力。结果显示，**7h** 对 VEGFR-2 激酶的 IC<sub>50</sub> 值为 (1.19±0.13) μmol·L<sup>-1</sup>，弱于索拉菲尼，但显著强于先导化合物查尔酮 ( $P < 0.05$ )。另外，Western blotting 结果显示，**7h** 在 8 μmol·L<sup>-1</sup> 时能够明显抑制 VEGFR-2、PI3K 和 AKT 的磷酸化，且显著高于索拉菲尼 ( $P < 0.05$ )，同时在 4 μmol·L<sup>-1</sup> 时对 PI3K 和 AKT 的抑制作用与索拉菲尼相当。结果见表 3 和图 3。

### 3.6 体外抗 HeLa/DDP 细胞活性

MDR 是指在化疗过程中长期使用 1 种抗肿瘤

表 3 体外 VEGFR-2 激酶抑制试验

Tab. 3 *In vitro* VEGFR-2 inhibitory assay

化合物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
查尔酮	>20
<b>7h</b>	1.19±0.13 <sup>1)2)</sup>
索拉菲尼	0.56±0.04

注: 与查尔酮比较, <sup>1)</sup>P<0.05; 与索拉菲尼比较, <sup>2)</sup>P<0.05。

Note: Compared with chalcone, <sup>1)</sup>P<0.05; compared with sorafenib, <sup>2)</sup>P<0.05.

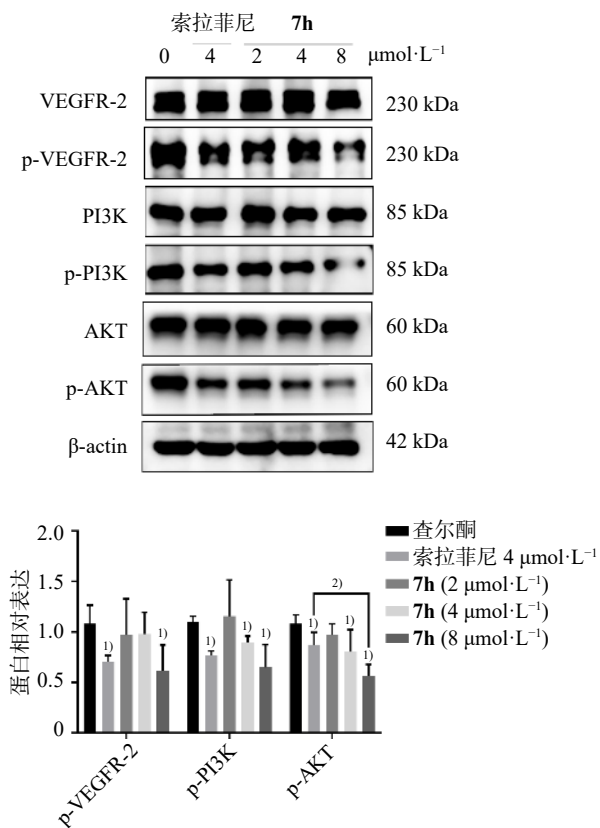


图 3 化合物 7h 对 HeLa 细胞 VEGFR-2 及 PI3K/AKT 信号通路蛋白的影响

与查尔酮比较, <sup>1)</sup>P<0.05; 与索拉菲尼组比较, <sup>2)</sup>P<0.05。

Fig. 3 Effect of compound 7h on VEGFR-2 and PI3K/AKT signaling pathway proteins in HeLa cells

Compared with chalcone, <sup>1)</sup>P<0.05; compared with sorafenib group, <sup>2)</sup>P<0.05.

药物后对正在使用的抗肿瘤药物和其他结构类型和作用机制各不同的抗肿瘤药物同时产生交叉耐药性<sup>[27]</sup>。因此, 本研究进一步考察了阳性药紫杉醇和阿霉素对 HeLa/DDP 细胞增殖抑制活性作用。紫杉醇和阿霉素对 HeLa/DDP 细胞株产生了低度到中度的耐药性, 耐药指数 RI 分别为 6.21 和 3.93, 结果见表 4, 说明 HeLa/DDP 细胞除对顺铂耐药外, 对紫杉醇和阿霉素也产生了一定的耐药性, 具备了一定的多药耐药宫颈癌细胞特

性。但是索拉菲尼对 HeLa/DDP 细胞并未产生明显的耐药性, RI 值为 1.15, 这说明分子靶向抗肿瘤药物可能对 P-gp 蛋白有一定的抑制作用, 从而使药物不被外排而在细胞内蓄积。

化合物 7h 对 HeLa/DDP 细胞株的 IC<sub>50</sub> 值为 (9.33±0.70) μmol·L<sup>-1</sup>, 与亲本细胞 HeLa 相比较 RI 值为 1.15, 几乎无耐药性产生, 抗顺铂耐药宫颈癌活性较其他化合物和阳性药显著。为了减少耐药性逆转剂的影响, 在细胞逆转耐药测定中, 选用的联用浓度通常是对抑制肿瘤细胞增殖率 ≤10% 时的浓度<sup>[28]</sup>。化合物 7h 浓度为 0.5, 1.0, 1.5 μmol·L<sup>-1</sup> 对 HeLa/DDP 细胞株的抑制率均 <10%, 分别与顺铂联合使用后, 顺铂的 RI 分别降低为 5.84, 3.68 和 1.95, 这与单用顺铂的 RI 7.36 相比, 有较明显的逆转效果, 并与阳性药维拉帕米的逆转效果相当, 结果见表 4。

表 4 体外抗 HeLa/DDP 细胞活性作用

Tab. 4 *In vitro* anti-HeLa/DDP cell activity

化合物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>		
	HeLa	HeLa/DDP	RI
顺铂	13.60±1.63	100.03±7.94	7.36
紫杉醇	20.10±1.05	124.87±5.30	6.21
阿霉素	10.60±0.50	41.63±2.05	3.93
索拉菲尼	10.78±0.15	12.40±0.54	1.15
查尔酮	74.01±4.48	91.00±6.22	1.23
<b>7h</b>	8.10±0.45 <sup>1)2)</sup>	9.33±0.70 <sup>1)2)</sup>	1.15
顺铂+维拉帕米(6 μmol·L <sup>-1</sup> )	13.97±0.73	35.12±4.14	2.51
顺铂+7h(0.5 μmol·L <sup>-1</sup> )	14.11±1.42	82.43±6.21 <sup>2)</sup>	5.84
顺铂+7h(1.0 μmol·L <sup>-1</sup> )	15.05±1.93	55.39±4.39 <sup>2)</sup>	3.68
顺铂+7h(1.5 μmol·L <sup>-1</sup> )	14.55±1.56	28.32±3.07 <sup>2)</sup>	1.95

注: 与查尔酮比较, <sup>1)</sup>P<0.05; 与索拉菲尼比较, <sup>2)</sup>P<0.05。

Note: Compared with chalcone, <sup>1)</sup>P<0.05; compared with sorafenib, <sup>2)</sup>P<0.05.

Western blotting 结果显示, 化合物 7h 浓度为 0.5, 1.0, 1.5 μmol·L<sup>-1</sup>, 与空白组和维拉帕米相比对 P-gp 的蛋白表达量无显著性差异, 这说明 7h 逆转宫颈癌顺铂耐药的原因可能是抑制了 P-gp 的转运功能, 导致顺铂在细胞内的蓄积浓度增高, 进而增强了其抗宫颈癌活性作用。结果见图 4。

### 3.7 分子对接试验

查尔酮和化合物 7h 与 VEGFR-2 和 P-gp 蛋白结合的最低能量分别为 -38.40, -35.59, -35.47, -35.05 kJ·mol<sup>-1</sup>, 结果见表 5。7h A 环上的吡咯烷

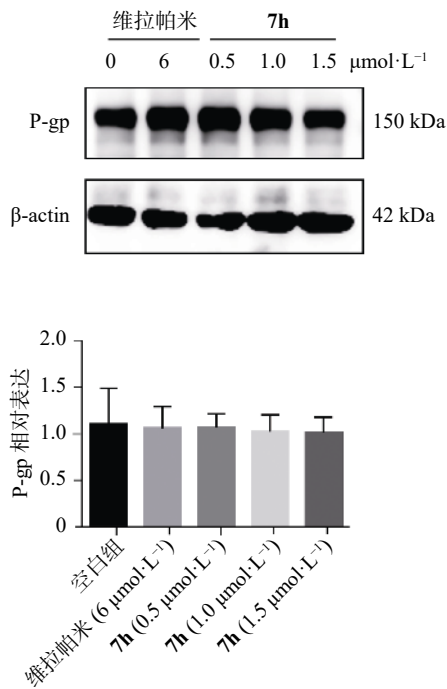


图4 化合物7h对HeLa/DDP细胞中P-gp表达量的影响  
Fig. 4 Effect of compound 7h on the expression of P-gp in HeLa/DDP cells

和B环上的4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>能够与VEGFR-2活性口袋内的PHE-52(C)、LYS-62(B)、VAL-110(B)和CYS-50(C)等氨基酸残基形成强烈的疏水性相互作用力。在P-gp蛋白活性口袋内,7h的羰基氧和2-羟基分别与GLN-32(D)形成氢键作用力。另外,7h A环上的吡咯烷和B环的4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>能够与PHE-240(C)、ILE-203(C)、LEU-236(C)和PHE-233(C)等氨基酸残基形成强烈的疏水性相互作用力。以上相互作用力的形成可能有助于提高7h与VEGFR-2和P-gp靶点结合的稳定性。见图5。

表5 蛋白质的基本信息和对接预测的最小结合能  
Tab. 5 Basic protein information and minimum binding energy for docking prediction

培养基	蛋白质	PDB ID	最小结合能/kJ·mol <sup>-1</sup>	
			化合物	氢键
查尔酮	VEGFR-2	4ASD	-38.40	-
	P-gp	7O9W	-35.59	1
7h	VEGFR-2	4ASD	-35.47	-
	P-gp	7O9W	-35.05	2

#### 4 讨论

目前寻找抑制肿瘤的新型药物,已成为国内外防治肿瘤的重点工作<sup>[29]</sup>。在课题组前期研究基础上,本次研究基于VEGFR-2和P-gp靶点,以

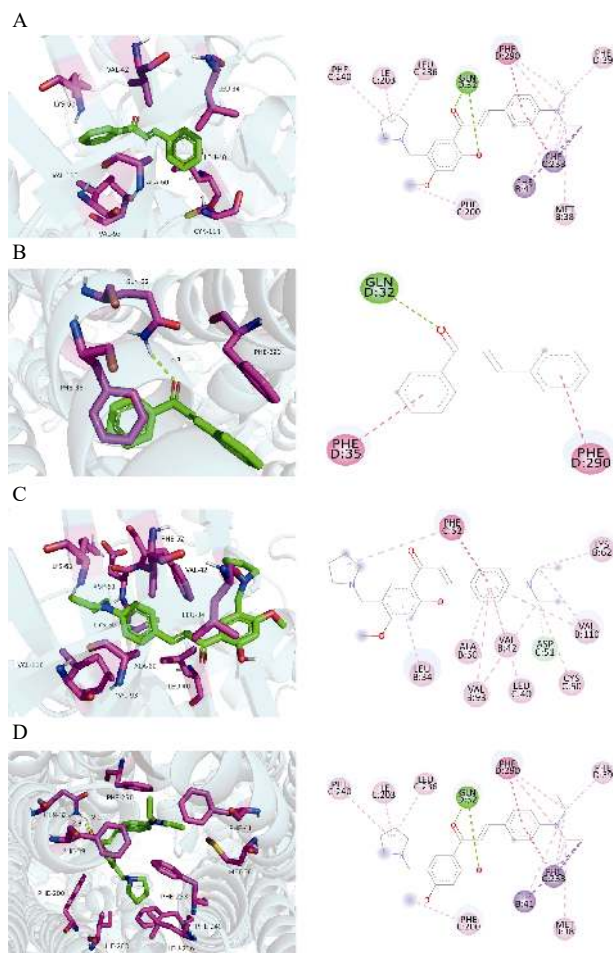


图5 查尔酮与VEGFR-2(A)和P-gp(B)蛋白的分子对接示意图及化合物7h与VEGFR-2(C)和P-gp(D)蛋白的分子对接示意图

Fig. 5 Schematic molecular docking of chalcone with VEGFR-2(A), P-gp(B) proteins and schematic molecular docking of compound 7h with VEGFR-2(C) and P-gp(D) proteins

甘草查尔酮为先导化合物骨架,采用活性亚结构拼接原理,以间苯二酚为起始原料,经亲核取代、酚羟基保护、氯甲基化、氮烷基化和Claisen-Schmidt反应原理,经5步反应合成了系列新型查尔酮衍生物。在合成反应中,中间体1通过重结晶得到,此步骤加入蒸馏水的量是反应液的3倍量时析出的产率较高,若加入蒸馏水量过多,将影响中间体1的析出速度和最终产率。在中间体3的合成过程中,冰乙酸的加入量不可过多,否则会导致产物不易析出或析出较少,影响最终产率。在Claisen-Schmidt反应中苯甲醛类衍生物的加入量应是中间体4和5的3倍量,这样不仅使反应速率加快,且能够最大限度地消耗中间体4和5,从而使目标化合物便于纯化分离,进一步

提高产率。

目前在多种恶性实体肿瘤细胞中 VEGFR-2 呈高度表达, 包括卵巢癌、乳腺癌和宫颈癌等肿瘤细胞, 因而抑制 VEGFR-2 途径将是一种有效的抗肿瘤血管生成和抗肿瘤反应策略<sup>[30-31]</sup>。通过体外抗宫颈癌活性实验和初步的构效关系分析发现, 化合物 **7h** 对 HeLa 和 SiHa 细胞的增殖抑制活性显著高于其他化合物和阳性药, 且对人宫颈正常上皮细胞 H8 的毒性较小; **7h** 的抗 HUVEC 细胞活性和对 VEGFR-2 激酶的抑制作用较索拉菲尼弱, 但显著高于先导化合物查尔酮, 说明吡咯烷和 4-N(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 基团的引入可能增强了 **7h** 对 VEGFR-2 的抑制作用。Western blotting 结果也显示 **7h** 在 8 μmol·L<sup>-1</sup> 时对 VEGFR-2 及 PI3K/AKT 信号通路蛋白的磷酸化有较显著的抑制作用。MDR 是指化疗过程中长期使用 1 种抗肿瘤药物后对正在使用的抗肿瘤药物和其他结构类型和作用机制各不相同的抗肿瘤药物同时产生交叉耐药性<sup>[27]</sup>。**7h** 对顺铂耐药细胞 HeLa/DDP 的增殖抑制活性与 HeLa 细胞无显著性差异, 而顺铂对 HeLa/DDP 细胞表现出中等程度的耐药性。当 **7h** 0.5, 1.0, 1.5 μmol·L<sup>-1</sup> 与顺铂联合应用后, 能够不同程度地逆转 HeLa/DDP 细胞对顺铂的耐药性。另外, **7h** 在 0.5, 1.0, 1.5 μmol·L<sup>-1</sup> 对 P-gp 蛋白的表达量与空白组相比无显著性差异, 说明 **7h** 可能抑制了 P-gp 对顺铂的外排转运功能, 导致顺铂在细胞内的蓄积浓度增高, 进而增强了其抗宫颈癌活性作用。此外, **7h** 能够与 VEGFR-2 和 P-gp 靶点的氨基酸残基形成强烈的疏水性相互作用力和氢键作用力, 从而使结合更稳定。

本研究表明, 化合物 **7h** 对宫颈癌和顺铂耐药宫颈癌细胞具有一定的增殖抑制活性, 且对正常细胞的毒性相对较小。在与顺铂联合用药后能够逆转 HeLa/DDP 细胞对顺铂的耐药性, 使耐药指数显著下降。初步的作用机制表明, **7h** 的抗宫颈癌活性和逆转顺铂耐药作用, 可能与其抑制了 VEGFR-2 和 P-gp 双靶点的活性有关。本研究为新型分子靶向查尔酮类抗宫颈癌和抗肿瘤多药耐药创新药物的研究提供了思路和实验基础。

## REFERENCES

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

- [2] LIU X S, XING Y, LI M Y, et al. Licochalcone A inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cell by targeting programmed cell death-ligand 1 via the NF-κB and Ras/Raf/MEK pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(273): 113989.
- [3] CHEN B H, ZHANG C X, DONG P P, et al. Molecular regulation of cervical cancer growth and invasion by VEGFa[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11587-11593.
- [4] HAMMES L S, TEKMAL R R, NAUD P, et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor(CIN) lesions and invasive disease[J]. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3): 445-451.
- [5] LONG W Q, ZHANG L J, WANG Y X, et al. Research progress and prospects of autophagy in the mechanism of multidrug resistance in tumors[J]. *J Oncol*, 2022(2022): 7032614.
- [6] WAGNER W, KANIA K D, BLAUZ A, et al. The lactate receptor(HCAR1/GPR81) contributes to doxorubicin chemoresistance via ABCB1 transporter up-regulation in human cervical cancer HeLa cells[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2017, 68(4): 555-564.
- [7] RAJENDRAN G, BHANU D, ARUCHAMY B, et al. Chalcone: A promising bioactive scaffold in medicinal chemistry[J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(10): 1250.
- [8] DHALIWAL J S, MOSHAWIH S, GOH K W, et al. Pharmacotherapeutics applications and chemistry of Chalcone derivatives[J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 7062.
- [9] GUO F J, FENG L, HUANG C, et al. Prenylflavone derivatives from *Broussonetia papyrifera*, inhibit the growth of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Phytochem Lett*, 2013, 6(3): 331-336.
- [10] AHMED M F, SANTALI E Y, EL-HAGGAR R. Novel piperazine-chalcone hybrids and related pyrazoline analogues targeting VEGFR-2 kinase; design, synthesis, molecular docking studies, and anticancer evaluation[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36(1): 307-318.
- [11] WANG M, XU S, WU C J, et al. Design, synthesis and activity of novel sorafenib analogues bearing chalcone unit[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(22): 5450-5454.
- [12] ROBEY R W, PLUCHINO K M, HALL M D, et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(7): 452-464.
- [13] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer[J]. *Nature*, 2019, 575(7782): 299-309.
- [14] YIN H H, DONG J J, CAI Y C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of chalcones as reversers of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. *Eur J Med Chem*, 2019(180): 350-366.
- [15] GAO F, HUANG G, XIAO J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship[J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(5): 2049-2084.
- [16] VERGELLI C, CICIANI G, CILIBRIZZI A, et al. Synthesis of five and six-membered heterocycles bearing an

- arylpiperazinylalkyl side chain as orally active antinociceptive agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(19): 6237-6245.
- [17] SAFRYGIN A V, IRGASHEV R A, SLEPUKHIN P A, et al. ChemInform abstract: Synthesis of 5-aryl-2-hydroxy-2-(trifluoromethyl)furan-3(2H)-ones and their reactions with aromatic 1, 2-diamines, hydrazine and hydroxylamine[J]. *ChemInform*, 2016, 47(6): 227-233.
- [18] FAGAN V, JOHANSSON C, GILEADI C, et al. A chemical probe for Tudor domain protein Spindlin1 to investigate chromatin function[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(20): 9008-9025.
- [19] OUYANG Y, LI J J, CHEN X Y, et al. Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 894.
- [20] REN B Z, ABLISE M, YANG X C, et al. Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -methyl-chalcone for anti-cervical cancer activity[J]. *Med Chem Res*, 2017, 26(9): 1871-1883.
- [21] WANG Z Y, WANG N, HAN S W, et al. Dietary compound isoliquiritigenin inhibits breast cancer neoangiogenesis via VEGF/VEGFR-2 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68566.
- [22] VALDAMERI G, GAUTHIER C, TERREUX R, et al. Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: Critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(7): 3193-3200.
- [23] LEI Y, ZHANG J H, ZHANG M, et al. Advances of P-glycoprotein inhibitors[J]. *Guangzhou Chem Ind(广州化工)*, 2016, 44(6): 27-30.
- [24] LING X L, HUANG C S, LIU H X, et al. Convenient synthesis of natural product Dorspoinsettifolin[J]. *J Guangxi Univ(广西大学学报:自然科学版)*, 2011, 36(3): 493-495.
- [25] LIN X M, LI Y L, SHI Y, et al. Synthesis of novel 5-N-alkyl-substituted *Chalcone* derivatives[J]. *Chin J Synth Chem(合成化学)*, 2010, 18(4): 460-461.
- [26] RIZVI S U, SIDDIQUI H L, NISAR M, et al. Discovery and molecular docking of quinoyl-thienyl chalcones as anti-angiogenic agents targeting VEGFR-2 tyrosine kinase[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(2): 942-944.
- [27] LI X M, LI M D, HUANG M Y, et al. The multi-molecular mechanisms of tumor-targeted drug resistance in precision medicine[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2022(150): 113064.
- [28] ZHANG S C, MA M, XU L L. Reversal effect of apatinib on P-gp-mediated multidrug resistance of human breast cancer and its mechanisms[J]. *Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究)*, 2018, 45(4): 210-214.
- [29] ZOU C Y, MEN J Y, WANG Y, et al. Design and synthesis of novel asperphenamate derivatives and evaluation of autophagy induction and cathepsin inhibitory effects[J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2021, 38(12): 1262-1271.
- [30] ZHU J H, WANG L L, WANG X B, et al. Expression of VEGFR2 and miR-21 in non-small cell lung cancer and relationship[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2023, 42(7): 467-473.
- [31] QIU H F, LI J, LIU Q L, et al. Apatinib, a novel tyrosine kinase inhibitor, suppresses tumor growth in cervical cancer and synergizes with Paclitaxel[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(10): 1235-1244.

收稿日期: 2023-03-15  
(本文责编: 蔡珊珊)