

3-取代 2-吲哚酮类化合物的合成与抗肿瘤活性研究

熊 俭, 刘 婧, 姜凤超

(华中科技大学同济医学院药学院药物化学教研室, 武汉 430030)

[摘要] 目的 寻找新的具有血管内皮细胞生长因子受体酪氨酸激酶抑制活性的 3-取代 2-吲哚酮类化合物。方法 以 2-吲哚酮为原料, 利用缩合反应合成目标化合物, 并进行体外初步药理学评价。结果 设计并合成了 5 种化合物, 其中 4 种为首次发现, 体外初步药理学研究表明, 所合成的化合物均具有抑制 S-180 肿瘤细胞生长的活性, 其中化合物 II 活性最强。结论 3-取代 2-吲哚酮类化合物具有抑制 S-180 肿瘤细胞生长的活性, 化合物中吲哚环平面与相应的芳环平面之间处于垂直状态时活性较强。

[关键词] 酪氨酸激酶抑制剂; 3-取代 2-吲哚酮; 抗癌药物

[中图分类号] TQ460.1; R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2005)05-0380-04

Syntheses and Antitumor Activity Studies of 3-substituted 2-indolinone Derivatives

XIONG Jian, LIU Jing, JIANG Feng-chao (Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To find new antitumor 2-indolinone compounds targeted on tyrosine kinase receptor. **Method** Four new 3-substituted-2-indolinone compounds were designed and synthesized. The primary pharmacodynamic evaluations of these compounds in vitro were carried out. **Results** Five suitable compounds were designed and synthesized, and four of them were first found. All the compounds can inhibit the growth of S-180 tumor. The compound II had the most powerful activity. **Conclusion** The growth of S-180 tumor can be inhibited by 3-substituted-2-indolinone compounds. And the compound molecule with the indolinone plane vertical to the phenyl plane is the most active.

KEY WORDS Tyrosine Kinase inhibitor; 3-substituted-2-indolinone, Antitumor drug

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种肝素亲和的外分泌二聚体糖蛋白, 其分子量为 34 ~ 42 kD, 有促内皮细胞有丝分裂的作用, 并可引起血管通透性增加。在创伤和大多数肿瘤(包括实体瘤和血液系统瘤)的生长过程中有高度表达。VEGF 受体属于酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTKs)超家族, 主要包括 fms 样酪氨酸激酶(fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)和含激酶插入域的受体(kinase domain-containing receptor, KDR)。因此, 以 VEGF 受体为靶点的肿瘤血管生成抑制剂具有特异性高、不易产生耐受性、毒性小、抗癌谱广等优点, 成为近年来抗肿瘤药物开发的热点。

VEGF 受体的酪氨酸激酶域是 VEGF 信号传导的起点。大量实验研究证实, 阻断该位点可以有效地抑制 VEGF 介导的血管生成作用, 从而达到抑制肿瘤的效果。通过对 RTKs 与其抑制剂的复合物晶体结构分析研究发现, RTKs 的酪氨酸激酶域是一个理想的药物

作用靶点^[1]。笔者在本实验中以 2-吲哚酮为原料, 合成了 4 种 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂, 并进行了抑制肿瘤活性研究。

1 2-吲哚酮类化合物的设计

由于 RTKs 家族中酪氨酸激酶域的腺苷三磷酸(ATP)结合位点的三维结构的普遍性和多样性有利于药效基团的建立和合理药物的设计, 目前已报道的 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂均模拟了腺嘌呤结构, 可占据膜内酪氨酸激酶域的 ATP 结合位点, 是酶的 ATP 竞争性抑制剂。目前已报道的 40 多个蛋白激酶的晶体结构, 大部分是定向与 ATP 结合位点的抑制剂结合的复合物。

2-吲哚酮骨架类似于腺嘌呤结构, 能与受体激酶域的 ATP 结合位点结合, 占据 ATP 的腺嘌呤位置, 其相应的基团与蛋白骨架的某些序列可形成氢键, 2-吲哚酮上的取代基团有可能延伸到与结合位点毗邻的疏水口袋中。在各种不同的 RTKs 中, ATP 结合位点是高度保守的, 但是可容纳不同取代基的疏水口袋则有区别^[2], 这些基本数据为新型酪氨酸激酶抑制剂的设计提供了有利的线索。

鉴于上述原因, 在不改变 2-吲哚酮骨架结构的基础上, 通过在 2-吲哚酮 3-位上引入带有杂原子取代基的芳香基团, 有可能得到对 VEGF 受体酪氨酸激酶抑

[收稿日期] 2004-05-17 **[修回日期]** 2004-06-15

[作者简介] 熊 俭(1977 -), 女, 江西南昌人, 硕士, 主要从事药物开发研究。

[通讯作者] 姜凤超(1955 -), 男, 河南泌阳人, 教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤药物和老年病药物的研究。电话: 027-83692749, E-mail: fengchao@mails.tjmu.edu.cn。

制作用较佳的新的化合物,笔者设计了下列 4 种新化合物。

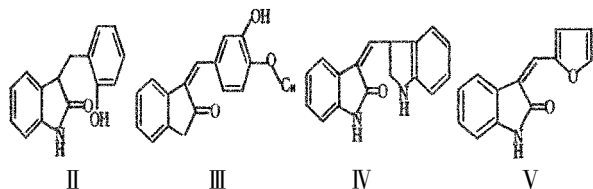


图 1 新合成化合物的分子结构图

2 目标化合物的合成与理化性质鉴别

分别利用 Shimadzu UV-260 紫外分光光度仪, Impact420 傅立叶红外分光光度计, $^1\text{H-NMR}$ JNM-F90Q, 观察频率: 200 MHz, XL-200 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱仪测定化合物的紫外光谱、红外光谱、 $^1\text{H-nmr}$ 、 $^{13}\text{C-nmr}$; 利用 X-5 控温型显微熔点测定仪测定化合物的熔点。以硅胶 G 羧甲基纤维素板为固定相, 苯-氯仿-乙醇(5 : 4 : 1)为流动相, 以 5% 硫酸-乙醇溶液为显色剂进行薄层层析分析。

2.1 3-吲哚醛的合成 参照文献[2]中的方法, 产率为 91.2%, 合成产物的熔点为 204.7 ~ 206.2 $^{\circ}\text{C}$, 文献[3]的参考值为 196.0 ~ 197.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 吲哚酮类衍生物的合成^[4] 以 2-吲哚酮为原料, 在有机碱(如哌啶等)的催化下, 与相应的醛经过醛酮缩合反应, 得到目标产物。以 3-[(3-羟基-4-甲氧基苯基)-次甲基]-2-吲哚酮的合成为例加以说明。① 3-[(3-羟基-4-甲氧基苯基)-次甲基]-2-吲哚酮(化合物 III)的合成: 将香草醛 6.3 g (0.040 mol), 2-吲哚酮 5.5 g (0.034 mol) 和甲醇 80 mL 置于 250 mL 三颈瓶中, 搅拌下加入 1.6 mL 哌啶, 加热回流搅拌反应 3 h, 冷却至室温, 0 $^{\circ}\text{C}$ 左右放置 2 h, 过滤, 固体用冷甲醇洗涤 3 次, 所得固体用热乙醇重结晶, 干燥, 得黄色粉末状固体 9.5 g, 产率为 56.0%, 合成产物的熔点为 232 ~ 233 $^{\circ}\text{C}$ 。同法制备 3-[(苯基)-次甲基]-2-吲哚酮(化合物 I)、3-[(2-羟基苯基)-次甲基]-2-吲哚酮(化合物 II)和 3-[(吲哚)-3-基-次甲基]-2-吲哚酮(化合

物 IV), 具体结果见表 1。② 3-(吡喃-2-基-次甲基)-2-吲哚酮的合成: 将吡喃甲醛 3 mL (3.5 g, 0.036 mol), 2-吲哚酮 5.5 g (0.034 mol) 和甲醇 80 mL 置于 250 mL 三颈瓶(带冷凝管和搅拌器)中, 搅拌下加入 1.6 mL 哌啶, 室温搅拌反应 30 min, 冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$, 过滤, 冷甲醇洗涤, 干燥, 用乙醇重结晶, 得到浅黄色粉末状固体 7.3 g, 熔点 169 ~ 170 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 吲哚酮类衍生物合成实验结果

化合物	取代基团	性状	熔点/ $^{\circ}\text{C}$	产率/%
I	苯基	黄色晶体	176.1 ~ 178.2	76.2
II	邻羟基苯基	橙黄色粉末	184.9 ~ 186.9	74.5
III	3-羟基-4-甲氧基苯基	橙黄色晶体	232.5 ~ 233.1	56.5
IV	3-吲哚基	黄色粉末	229.7 ~ 232.5	64.3
V	2-吡喃基	淡黄色粉末	167.5 ~ 169.1	76.2

2.3 目标化合物的理化性质鉴别 化合物 I ~ V 均为有色化合物, 难溶于水、苯、氯仿、乙醚等溶剂。微溶于乙醇、甲醇, 其中化合物 II 溶解度相对较大。采用 IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、UV 和薄层层析等方法对所得的化合物进行分析鉴定, 结果见表 2, 以苯-氯仿-乙醇(5 : 4 : 1)为展开剂, 在硅胶 G-CMC 板进行层析, 展开后各化合物均为均一的黄色斑点, 可直接观察, R_f 值见表 2。

2.3.1 紫外光谱分析^[5] 化合物 I ~ V 均为大共轭体系, 紫外吸收显著, 且随着芳香环上助色团-OH, -OCH₃ 的引入及共轭体系的增加, 化合物的最大吸收度(λ_{max})向长波方向移动。如 3-苯基次亚甲基-2-吲哚酮(I)的紫外吸收 λ_{max} 为 326.6 nm, 而化合物 II 的 λ_{max} 为 369.2 nm, 化合物 III 的 λ_{max} 为 355.6 nm。化合物 IV 苯环换成了吲哚环, P π 共轭体系大大增大, λ_{max} 显著向长波方向移动, IV 的 λ_{max} 为 404.6 nm。化合物 V 中的吡喃环较苯环富电子, 故其 λ_{max} 也红移, λ_{max} 为 351.6 nm^[3]。

2.3.2 红外光谱分析 化合物的红外图谱中, 均显示

表 2 3-取代 2-吲哚酮类衍生物的分析结果

化合物	IR (KBr 压片, V/cm^{-1})	最大紫外吸收波长/nm	$^{13}\text{C-nmr}$ (CDCl_3) $\delta/(\times 10^{-6})$	R_f 值
I	3 444($\nu_{\text{N-H}}$), 1 707($\nu_{\text{C=O}}$)	265.8(1.087), 326.6(1.352)	—	0.65
II	3 548($\nu_{\text{O-H}}$), 3 356($\nu_{\text{N-H}}$), 1 699($\nu_{\text{C=O}}$)	262.8(1.171), 355.6(1.144)	170.2(C_2), 156.1(C_1), 141.7(C_9), 133.7(C_3), 131.7(C_{10})	0.52
III	3 401($\nu_{\text{N-H}}$), 3 414($\nu_{\text{O-H}}$), 1 687($\nu_{\text{C=O}}$), 1 292($\nu_{\text{C-O}}$), 1 202($\nu_{\text{C-O}}$)	262.8(1.135), 369.2(1.403)	171.3(C_2), 168.3(C_2), 148.8(C_4), 142.1(C_3), 138.3(C_9), 129.3(C_3), 129.0(C_{10})	0.54
IV	3 387($\nu_{\text{N-H}}$), 1 669($\nu_{\text{N-H}}$)	263.6(1.098), 404.6(1.521)	172.0(C_2), 142.9(C_9), 136.4(C_3), 133.9(C_{10}), 126.8(C_3)	0.52
V	3 380($\nu_{\text{N-H}}$), 1 694($\nu_{\text{C=O}}$), 1 296($\nu_{\text{C-O}}$), 1 236($\nu_{\text{N-H}}$)	258.2(1.248), 351.6(1.021)	171.3(C_2), 155.2(C_1), 151.4(C_5), 146.7(C_3), 141.7(C_9), 129.3(C_{10})	0.65

出 2-吡啶酮骨架结构的 V_{NH} (3 356 ~ 3 401 cm^{-1}) 尖峰和 $V_{C=O}$ (1 669 ~ 1 707 cm^{-1}) 的强吸收峰, 3 185, 3 144, 3 066 cm^{-1} 处的芳杂环 V_{C-H} 的强吸收以及 1 640 ~ 1 550 cm^{-1} 区的多个芳杂环的骨架振动吸收, 进一步提供了旁证。此外不同的化合物也显示出相应基团的特征吸收, 如化合物 II 具有明显的 V_{OH} 吸收尖峰 (3 548 cm^{-1}) 以及相应的芳香环的吸收特征, 如化合物 II 的 V_{OH} 的吸收尖峰 (3 548 cm^{-1}) 以及相应的芳香环的特征吸收, 如 783.3 和 739.3 cm^{-1} 苯环邻位取代特征吸收等^[3]。

2.3.3 磁共振谱分析^[5] 化合物 II ~ V 进行¹³C nmr 谱分析, 化合物 II 的¹³C 谱分析结果见图 2。由于氧原子的作用, 化合物 II 的羰基碳 (δC_2) 的化学位移为 170.2×10^{-6} , 与羟基相连的苯环的 $\delta C_1'$ 为 156.1×10^{-6} , 与内酰胺相连的环的两个季碳原子分别为 δC_7 141.7 和 δC_3 133.7×10^{-6} , 环外双键的次甲基的 δC_{10} 为 131.7×10^{-6} , 其余高场峰为苯环和吡啶环上的碳峰。可能是由于邻位羟基的影响, 未发现明显的烯醇异构体。与之类似, 其他化合物的¹³C 图谱中均明显地显示羰基碳 (δC_2) 的化学位移 (约为 171×10^{-6}) 及其他取代基的化学位移, 如化合物 IV 中显示咪唑环与氧原子连接的两个碳原子的化学位移 155.2 ($C_{1'}$), 151.4 ($C_{4'}$) 等, 化合物 III 中具有连接甲氧基、羟基的两个碳原子的化学位移, 分别为 148.8 ($C_{4'}$), 142.1 ($C_{3'}$)。但因为存在烯醇异构体, 化合物 III 在 168.3×10^{-6} 处出现一个峰, 并且取代亚甲基上的两个碳峰的化学位移以及苯环和吡啶环上的碳峰位移也都不同 (见图 3)。从化合物 III¹H nmr 谱中, 除了在 2.14×10^{-6} (H_1) 和 4.94×10^{-6} (H_3) 出现羟基氢的化学位移, 8.16×10^{-6} (H_2) 处有氨基的化学位移外, 同时由于烯醇式的影响, 母体吡啶环的吸收也有变化, 从氨基的 2.14×10^{-6} 处的羟基氢的比例分析, 酮式和烯醇式的比例约为 3 : 1。¹H nmr 谱的结果从另一方面给其酮式-烯醇式的互变异构提供了旁证。

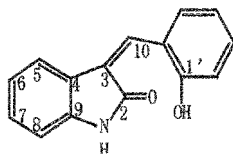


图 2 化合物 II 的磁共振分析结果

3 抗肿瘤活性实验

3.1 目标化合物的体外抗肿瘤活性实验 采用昆明种小白鼠接种 S-180 肿瘤细胞。取对数生长期的细胞按每孔 100 的剂量平行加入 96 孔板中, 每孔 10^6 个细胞, 其中 3 组 9 孔加入 0.9% 氯化钠注射液, 其他加入已配制好的相应的药物溶液, 每组设 3 个平行孔, 置于

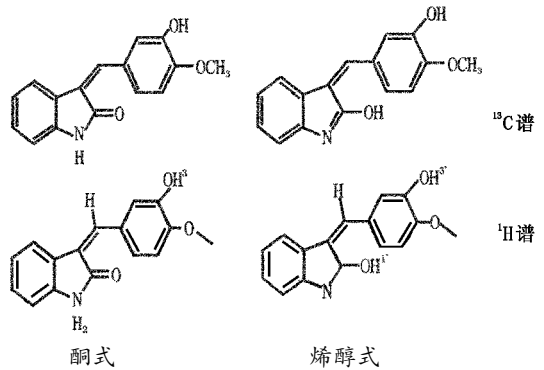


图 3 烯醇互变异构的化合物 III 的¹H, ¹³C 谱分析

37℃ 培养, 实验终止前 4 h 加入 5 mg · mL⁻¹ 噻唑蓝 (MTT) 液 10 μ L, 再培养 4 h, 弃去培养液加入 0.2 mL 二甲基亚砷 (DMSO), 待结晶溶解后在酶联检测仪上检测 570 nm 波长下每孔的吸光度 A, 以 0.9% 氯化钠注射液的数值为空白值 (即阴性 A 值), 再按下列公式求出生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{阴性 A 值} - \text{给药 A 值}) / \text{阴性 A 值} \times 100\%$$

3.2 抗肿瘤活性实验结果及分析 结果见表 3。由表 3 可知, 所有的 3-取代 2-吡啶酮类化合物均对 S-180 肿瘤细胞生长有抑制作用, 其中化合物 II 具有较强的活性, 超过了阳性对照药氟尿嘧啶 (0.005 g · L⁻¹ 时对肿瘤细胞的抑制率为 42.49%), 化合物 I 浓度较大时也具有较强烈的活性 (浓度为 1.0 g · L⁻¹ 时对肿瘤的抑制率为 51.35%)。

表 3 3-取代 2-吡啶酮类衍生物抑制 S-180 肿瘤细胞生长活性结果

药物	抑瘤率			
	1.0 g · L ⁻¹	0.1 g · L ⁻¹	0.01 g · L ⁻¹	0.001 g · L ⁻¹
I	51.35	24.15	21.95	13.35
II	38.21	34.56	51.14	44.25
III	29.65	36.08	26.78	20.12
IV	28.46	26.75	20.10	29.26
V	27.96	35.33	34.23	30.33

注: 阳性对照药氟尿嘧啶在 0.005 g · L⁻¹ 时对 S-180 肿瘤细胞的抑制率为 42.49%

4 讨论

在最终化合物合成时, 多数醛与 2-吡啶酮的缩合反应可以以相应的醇为溶剂, 在有机碱的催化下, 回流反应数小时即可得到较高产率的化合物。由于受电子效应的影响, 咪唑甲醛较为活泼, 在室温下就可进行反应, 且反应速度快, 15 min 左右即反应完全。

已有的构效关系研究表明, 此类化合物 C-3 位上的双键为反式构象时没有活性, 顺式构象是药效构象; 另外无论是吡啶酮内酰胺上的氮原子上的氢还是 10-

位碳上的氢被取代后均使化合物失去活性,表明 N-1 或乙烯基上的氢是维持该类化合物活性的关键之一^[2]。化合物 II 中苯环邻位羟基的存在,与吡啶酮上羰基之间微弱的氢键作用既有利于化合物保证以顺式构象为主,同时又避免酮式-烯醇式互变异构体产生。

同时结合化合物的动力学稳定的三维结构和活性实验结果分析表明,当吡啶酮的平面与芳香环的平面共平面时活性较低,而二者处于近于垂直状态时活性增加。化合物 III 由于其具有烯醇互变的结构,导致与氮原子连接的氢失去。另一方面,即使是酮式结构,吡啶酮环和苯环间共平面程度较大,这也可能导致活性下降(浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抗肿瘤活性为 36.08%)。而化合物 IV 中两个吡啶环基本上属于共平面(浓度为 $0.001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抑制肿瘤活性最高时只有 29.26%)。

笔者在本实验中合成了几种新化合物,其结构笔者均未见报道,与已报道的有活性的类似物相比,具有

结构简单、体外抑制肿瘤活性较强等优点,且有继续研究的价值。

【参考文献】

- [1] Li S, Ngoc T, Liang C X, *et al.* Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3-or-4-Carboxyethylpyrrol-s-yl)methylidene] indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases [J]. *J Med Chem*, 1999, 42, 5120-5130.
- [2] Moosa M. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors [J]. *Science*, 1997, 276: 955-960.
- [3] 王葆仁. 有机合成反应 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 682.
- [4] Tang P C. 3-heteroaryl-2-indolinone compounds for the treatment of disease [J]. *USP Pharm*, 1998, 11(8): 1998.
- [5] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 98-141.

热咳停颗粒的止咳与抗菌作用研究

张 庆, 张长弓

(华中科技大学同济医学院药学院生药系, 武汉 430030)

【摘要】 目的 研究热咳停颗粒的止咳和抗菌作用。方法 分别采用豚鼠氨水引咳法和电刺激猫喉上神经引咳法制作动物咳嗽模型, 研究热咳停颗粒 $5, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对豚鼠和猫的止咳作用; 采用腹腔接种肺炎球菌的方法制作感染小鼠模型, 分别在注射肺炎球菌前 1 h 和注射后 1.6, 12 h 给予小鼠热咳停颗粒药液灌胃, 测定热咳停颗粒对感染小鼠的保护作用。结果 热咳停颗粒 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显延长氨水诱导豚鼠咳嗽的潜伏期, 减少豚鼠的咳嗽次数(均 $P < 0.01$), 且止咳作用呈剂量依赖性。给予热咳停颗粒 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药后 1~3 h 猫的咳嗽阈值明显升高 ($P < 0.01$); $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 给药后 0.5~3.5 h 猫的咳嗽阈值明显升高 ($P < 0.01$)。热咳停颗粒对肺炎球菌腹腔攻击小鼠有一定的治疗作用, 随着剂量的增加, 小鼠感染肺炎球菌后 5 d 的存活率也增加。结论 热咳停颗粒有明显的镇咳和抗菌作用, 镇咳和抗菌作用与剂量相关, 剂量越高作用越显著, 作用时间也随之延长。

【关键词】 热咳停颗粒; 止咳作用; 抗菌作用

【中图分类号】 R286; R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-0781(2005)05-0383-03

Antitussive and Antibacterial Study of *Reketing* Granules

ZHANG Qing, ZHANG Chang-gong (Division of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective Study the antitussive and antibacterial effect of the *reketing* granules. **Method** ① The antitussive and antibacterial effects of *reketing* granules were studied in cough models of guinea pigs induced with ammonia and in cough models of cats induced with electronic stimulation to the superior larynx nerves. The effects of *reketing* granules in the doses of 5, 10, 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ were observed. ② The infection model mice were made by abdominal injection of certain *S. pneumoniae*. *reketing* granules in doses (crude herbs) 5, 10, 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ were fed to the model mice, i. g., 1 h before, and 1.6 h and 12 h after the injection of *S. pneumoniae*. Therefore, the infection-preventive effects of *reketing* granules were observed. **Results** ① The dose above 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ could prolong the time to cough induced by ammonia, and the cough frequency was decreased as the dose increased. ② The dose of 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly increase the voltage of the cats' cough threshold within 1.0~3.5 h after feeding *reketing* granules. The dose of 20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ crude drug could significantly increase the voltage of the cats' cough threshold within 0.5~3.5 h after feeding *reketing* granules. *Reketing* granules have certain therapeutic effect to *S. pneumoniae* infection. As the dose increased, the 5 d survival rate of infected mice increased.