

L-苯丙氨酸二肽衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究*

韦可心^{1,2,3}, 童 洋^{1,2,3}, 胡 磊^{2,3}, 姜欣怡^{1,2,3}, 肖银银^{2,3,4}, 梁光义^{1,2,3**}, 徐必学^{2,3**}

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 4. 遵义医学院, 贵州 遵义 563000)

[摘要] 目的: 探讨 L-苯丙氨酸二肽衍生物的合成及其抗肿瘤活性。方法: 以 L-酪氨酸或 L-苯丙氨酸为原料, 依次酰化反应、缩合反应、亲核取代及烷基化等反应合成得到苯丙氨酸二肽衍生物, 并用噻唑蓝 (MTT) 法测定其对前列腺癌细胞 (PC3)、人慢性髓原白血病细胞 (K562)、人红白细胞白血病细胞 (HEL) 3 类肿瘤细胞株的抗肿瘤活性。结果: 共合成了 3a~3h 共 8 个未见文献报道的苯丙氨酸二肽衍生物, MTT 结果显示, 部分衍生物对 K562 细胞株具有一定抑制作用, 衍生物 3b, 3e, 3f 对 PC3 和 K562 有较好的抑制作用。结论: 合成了 8 个新的苯丙氨酸二肽衍生物, 其对 K562 及 PC3 肿瘤细胞株具有一定的抑制作用。

[关键词] 苯丙氨酸二肽; 衍生物; 结构设计; 合成; 抗肿瘤活性; 癌细胞株, 人前列腺, 白血病

[中图分类号] R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)05-0531-07

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.05.008

Synthesis and Anti-tumor Activities of L-Phenylalanine Dipeptide Derivatives

WEI Kexin^{1,2,3}, TONG Yang^{1,2,3}, HU Lei^{2,3}, JIANG Xinyi^{1,2,3},
XIAO Yinyin^{2,3,4}, LIANG Guangyi^{1,2,3}, XU Bixue^{2,3}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, Guizhou, China; 3. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China; 4. Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To synthesize L-phenylalanine dipeptide derivatives and study their inhibitory effects on tumor cells. **Methods:** Starting from L-tyrosine or L-phenylalanine, L-phenylalanine dipeptide derivatives were synthesized via acetylation, condensation, nucleophilic substitution and/or alkylation. The cell proliferation inhibiting activities of the derivatives were evaluated by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method. **Results:** A total of 8 3a~3h phenylalanine dipeptide derivatives were synthesized. Some of the target compounds showed certain inhibitory effect against leukemia cell lines K562 and HEL *in vitro*. Furthermore, the derivatives 3b, 3e and 3f had preferably inhibitory effect on prostate cancer cell line PC3 and K562 cells *in vitro*. **Conclusions:** Phenylalanine dipeptide derivatives possess good inhibitory effects on the leukemia and prostate cancer cells and are worth of further research.

[Key words] phenylalanine dipeptide; derivatives; structural design; synthesis; anti-tumor activity; cancer cell line; human prostate; leukemia

*[基金项目] 黔人项目资助合同(2014)7 号; 国家自然科学基金资助项目(81360472)

** 通信作者 E-mail: guangyi_liang@126.com; bixue_xu@126.com

网络出版时间: 2018-05-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180517.1756.023.html>

恶性肿瘤作为全球主要的公共卫生问题之一,严重危害人类健康^[1-2]。近年来,全世界恶性肿瘤发病率和死亡率均呈上升态势。统计数据显示,2015 年中国癌症总发病 429.16 万例,总死亡 281.42 万例^[3-5],提示癌症防治仍将是世界医学领域关注的热点^[6-7]。研究表明,一些含有苯丙氨酸、丝氨酸或丙氨酸残基的二肽类化合物表现出了抗肿瘤的活性^[8-9],本课题组在前期工作中发现部分苯丙氨酸二肽衍生物(化学结构通式见图 1)能通过增加细胞内活性氧簇(ROS)的水平,上调 P38MAPK 通路的活性,进而稳定 P53、激活 P21 转录的机制来阻止肿瘤细胞在 DNA 合成 G1/S 期的增殖,从而表现出较好的抗肿瘤活性^[10-11]。本研究拟进一步设计合成一系列苯丙氨酸二肽衍生物、并测试其体外抗肿瘤活性,以获得更多具有结构多样性的苯丙氨酸二肽类化合物的抗肿瘤活性特征,为深入开展该类化合物在抗肿瘤药物方面的研究提供参考。

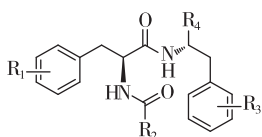


图 1 苯丙氨酸二肽衍生物的化学结构通式

Fig. 1 Chemical structure of phenylalanine dipeptide derivatives

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器与试剂

研究的肿瘤细胞株为人前列腺癌细胞(PC3)、人慢性髓原白血病细胞(K562)、人红白细胞白血病细胞(HEL)3 类肿瘤细胞株,核磁共振谱以 TMS 为内标,以 CDCl₃ 或 DMSO-*d*₆ 为溶剂,用 Inova-400 MHz 型超导核磁共振仪(美国 Varian 公司)测定;质谱用 HP-5793 质谱仪测定(美国 Hewlett-Packard 公司),柱色谱用硅胶(300~400 目)及高效薄层板均为青岛海洋化工厂产品。合成所用 *L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸、氯乙酰氯、*L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐及 *L*-苯丙氨酸醇为上海瀚鸿化工科技有限公司产品,其余试剂均为市售分析纯或化学纯产品,除特别说明外,未经处理直接使用。

1.2 方法

1.2.1 合成路线 见图 2。

1.2.2 中间体 1a、1b 的合成 分别取 *L*-酪氨酸或

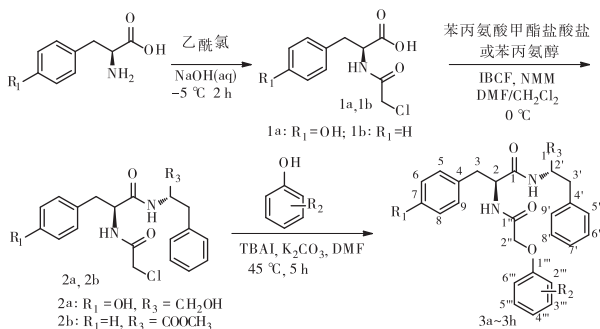


图 2 目标化合物 3a~3h 的合成

Fig. 2 Synthesis of target compounds 3a~3h

L-苯丙氨酸装于 250 mL 反应瓶中,加入 2.0 mol/L NaOH 水溶液(2.0 eq),溶解后、冰盐浴冷却至 -5°C 左右搅拌,然后缓慢滴加氯乙酰氯(1.5 eq),滴毕,继续搅拌待反应自然升至室温,2 h 后,以浓盐酸调节 pH2~3、静置,大量白色固体析出时过滤,滤饼以蒸馏水洗涤至 pH 呈中性,白色固体于 65°C 干燥数 h,即可分别得白色粉末状化合物 1a 和 1b (产率为 67.2%~89.3%)。

1.2.3 中间体 2a、2b 的合成 取 1a 12.7 g(49.29 mmol) 和 *L*-苯丙氨酸 8.94 g(59.15 mmol) 于 500 mL 反应瓶中,依次加入无水 DMF 40 mL、无水 CH₂Cl₂ 60 mL 和 NMM 16.53 mL(147.9 mmol),冰浴冷却下,缓慢滴加 IBCF 6.61 mL(52.25 mmol) 和无水 CH₂Cl₂ 20 mL 混合液;滴毕,继续搅拌 8 h 至 TLC 检测反应完全,加少量水终止反应;减压回收 CH₂Cl₂,加入蒸馏水 500 mL 和乙酸乙酯 500 mL,萃取,所得乙酸乙酯层依次以水 200 mL、1.0 mol/L HCl 200 mL、饱和 NaHCO₃ 溶液 200 mL 以及饱和 NaCl 溶液 200 mL 洗涤至 pH 呈中性,有机层经无水 MgSO₄ 干燥,减压回收溶剂,所得固体经氯仿-甲醇重结晶,即得白色粉末化合物 2a。采用相同的合成方法,以 1b 为原料即可合成得 2b。2a 为 *N*-(*N*-乙酰氯-*L*-酪氨酸)-*L*-苯丙氨酸,白色粉末,产率:58.7%。结构为 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 9.13 (s, 1H, 7-OH), 8.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 1'-CONH), 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.28~7.07 (m, 5H, H-5'~9'), 6.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-5, 9), 6.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-6, 8), 4.74 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 1'-OH), 4.45~4.34 (m, 1H, H-2), 4.00 (s, 2H, H-2''), 3.89~3.76 (m, 1H, H-2'), 3.31~3.14 (m, 2H, H-1'), 2.88~2.75 (m, 2H, H-3), 2.68~2.54 (m, 2H, H-3')。2b 为 *N*-(*N*-乙酰

氯-*L*-苯丙氨酸)-*L*-苯丙氨酸甲酯,白色粉末,产率:74.2%。结构为¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 1-CONH), 8.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.28 ~ 7.10 (m, 10H, H-5 ~ 9, H-5' ~ 9'), 4.58 ~ 4.49 (m, 1H, H-2), 4.49 ~ 4.40 (m, 1H, H-2'), 4.00 ~ 3.91 (m, 2H, H-2''), 3.56 (s, 3H, -COOCH₃), 3.07 ~ 2.87 (m, 4H, H-3, 3')。

1.2.4 目标化合物 3a ~ 3h 的合成 (1) *N*-{*N*-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-酪氨酰基}-*L*-苯丙氨酸醇(3a)的合成,取合成的2a 300 mg (0.78 mmol)加无水 DMF 8 mL 溶解完全,加入四丁基碘化铵 (TBAI) 85 mg (0.23 mmol) 及 K₂CO₃ 318 mg (2.30 mmol), 于 45 °C 搅拌,再加入 4-氟-3-三氟甲基苯酚 114 μL (0.92 mmol), 以氩气作保护气体, TLC 检测至反应完全; 加入蒸馏水 200 mL 和乙酸乙酯 200 mL, 萃取, 所得乙酸乙酯层依次以饱和 Na₂CO₃ 溶液 100 mL 和饱和 NaCl 溶液 100 mL 洗涤, 有机层经无水 MgSO₄ 干燥, 浓缩, 所得固体经硅胶柱层析纯化[*V*(氯仿):*V*(甲醇) = 50:1], 即得白色粉末状化合物 3a (266.7 mg, 产率为 65%)。结构为 ESI-MS *m/z*: 535.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.14 (s, 1H, 7-OH), 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 1-CONH), 7.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.33 (t, *J* = 9.70 Hz, 1H, H-5'''), 7.24 ~ 7.02 (m, 7H, H-5' ~ 9', 2'', 6''), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-5, 9), 6.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-6, 8), 4.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, 1'-OH), 4.47 (s, 2H, H-2''), 4.45 ~ 4.36 (m, 1H, H-2), 3.86 ~ 3.75 (m, 1H, H-2'), 3.29 ~ 3.12 (m, 2H, H-1'), 2.83 ~ 2.73 (m, 2H, H-3), 2.68 ~ 2.51 (m, 2H, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 170.40 (C-1), 166.65 (C-1''), 155.79 (C-7), 153.89 (C-1'''), 139.02 (C-4'), 130.18 (C-4), 129.17 (C-5, 9), 128.11 (C-5', 9'), 127.60 (C-6', 8'), 125.94 (C-7'), 123.74 (-CF₃), 120.34 (C-5'''), 118.23 (C-2'''), 118.00 (C-3'''), 114.82 (C-6, 8), 113.34 (C-6'''), 67.21 (C-2''), 62.18 (C-1'), 53.85 (C-2), 52.50 (C-2'), 37.11 (C-3), 36.36 (C-3')。(2) *N*-{*N*-[2-(3,5-双三氟甲基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-酪氨酰基}-*L*-苯丙氨酸醇(3b)的合成,取合成的2a 281 mg (0.72 mmol)、TBAI 80 mg (0.22 mmol)、K₂CO₃ 298 mg (2.16 mmol) 及 3,5-双三氟甲基苯酚 195 mg (0.85 mmol) 为原料, 参照化合物 3a 的制备方法

得到白色粉末状化合物 3b (220 mg, 产率: 74%)。结构为 ESI-MS *m/z*: 585.0 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.17 (s, 1H, 7-OH), 8.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1-CONH), 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.67 ~ 7.55 (m, 3H, H-2'', 4'', 6''), 7.24 ~ 7.06 (m, 5H, H-5' ~ 9'), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-5, 9), 6.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-6, 8), 4.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, 1'-OH), 4.69 (s, 2H, H-2''), 4.52 ~ 4.40 (m, 1H, H-2), 3.93 ~ 3.79 (m, 1H, H-2'), 3.33 ~ 3.15 (m, 2H, H-1'), 2.88 ~ 2.78 (m, 2H, H-3), 2.75 ~ 2.56 (m, 2H, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 170.42 (C-1), 166.48 (C-1''), 158.78 (C-1'''), 155.83 (C-7), 139.05 (C-4'), 131.70 (C-3''', 5'''), 130.14 (C-4), 129.21 (C-5, 9), 128.13 (C-5', 9'), 127.59 (C-6', 8'), 125.95 (C-7'), 124.54 (2 × -CF₃), 116.01 (C-2''', 6'''), 114.85 (C-6, 8), 114.38 (C-4'''), 67.17 (C-2''), 62.20 (C-1'), 54.05 (C-2), 52.54 (C-2'), 37.09 (C-3), 36.36 (C-3')。(3) *N*-{*N*-[2-(2,6-二甲氧基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-酪氨酰基}-*L*-苯丙氨酸醇(3c)的合成,取 2a 300 mg (0.77 mmol)、TBAI 85.5 mg (0.23 mmol)、K₂CO₃ 318 mg (2.30 mmol) 及 2,6-二甲氧基苯酚 140 mg (0.91 mmol) 为原料, 参照化合物 3a 的制备方法得到白色粉末状化合物 3c 269.1 mg, 产率为 69.5%。ESI-MS *m/z*: 509.1 [M + H]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.12 (s, 1H, 7-OH), 8.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 1-CONH), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.25 ~ 7.08 (m, 5H, H-5' ~ 9'), 7.02 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4'''), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3''', 5'''), 6.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-5, 9), 6.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-6, 8), 4.77 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, 1'-OH), 4.51 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz, H-2), 4.29 ~ 4.15 (m, 2H, H-2''), 3.86 (d, 1H, *J* = 5.5 Hz, H-2'), 3.71 (s, 6H, -(CH₃)₂), 3.37 ~ 3.13 (m, 2H, H-1'), 2.87 ~ 2.78 (m, 2H, H-3), 2.69 ~ 2.54 (m, 2H, H-3'); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 169.92 (C-1), 167.94 (C-1''), 155.79 (C-1), 152.11 (C-2''', 6'''), 139.06 (C-1'''), 136.13 (C-4'), 130.26 (C-5, 9), 129.11 (C-5', 9'), 128.12 (C-6', 8'), 127.06 (C-4), 125.97 (C-7'), 124.24 (C-4'''), 114.77 (C-6, 8), 105.32 (C-3''', 5'''), 71.99 (C-2''), 62.33 (C-1'), 55.82 (-CH₃), 53.22 (C-2), 52.50 (C-2'), 37.94 (C-2), 36.37 (C-3')。(4) *N*-{*N*-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯氧基)-乙

酰基]-*O*-二甲氨基乙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(3d)的合成,取 3a 300 mg (0.56 mmol)溶解于 15 mL 1,4-二氧六环中,再加入 K_2CO_3 543.0 mg (3.93 mmol),二甲氨基氯乙烷盐酸盐 97.0 mg (0.67 mmol)和蒸馏水 0.5 mL,氩气保护下,于 88 °C 搅拌反应 5 h 至 TLC 检测反应完全。将反应液冷却至室温,加入蒸馏水(100 mL)和乙酸乙酯(100 mL),萃取,有机层以水洗涤至中性,无水 $MgSO_4$ 干燥,减压回收溶剂,所得残留物经硅胶柱层析[$V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=20:1$],即得白色固体化合物 3d(163.2 mg,产率:48.4%)。ESI-MS m/z : 606.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.02 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, 1-CONH), 7.76 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, 1'-CONH), 7.33 (t, $J=9.70$ Hz, 1H, H-5'''), 7.24 ~ 7.02 (m, 7H, H-5' ~ 9', 2'', 6'''), 6.91 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-5, 9), 6.54 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-6, 8), 4.78 (t, $J=5.4$ Hz, 1H, 1'-OH), 4.62 ~ 4.54 (m, 1H, H-2), 4.37 (s, 2H, H-2''), 4.14 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, -OCH₂CH₂N), 4.05 ~ 3.85 (m, 1H, H-2'), 3.49 ~ 3.32 (m, 2H, H-1'), 3.16 ~ 3.03 (m, 2H, H-3), 2.78 ~ 2.61 (m, 2H, H-3'); ^{13}C -NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 170.51 (C-1), 166.76 (C-1''), 157.65 (C-7), 153.90 (C-1'''), 139.13 (C-4'), 130.29 (C-4), 129.28 (C-5, 9), 128.20 (C-5', 9'), 127.71 (C-6', 8'), 126.05 (C-7'), 120.44 (C-5'''), 118.35 (C-2'''), 118.12 (C-3'''), 114.93 (C-6, 8), 113.45 (C-6'''), 67.32 (C-2''), 65.55 (-OCH₂CH₂N), 62.29 (C-1'), 58.64 (-OCH₂CH₂N), 53.96 (C-2), 52.61 (C-2'), 46.34 (-N(CH₃)₂), 37.22 (C-3), 36.36 (C-3')。(5) *N*-[*N*-[2-(3,5-双三氟甲基-苯氧基)-乙酰基]-*O*-二甲氨基乙基-*L*-酪氨酰基]-*L*-苯丙氨酸醇(3e)的合成,取 3b 300 mg (0.51 mmol)、二甲氨基氯乙烷盐酸盐(88.7 mg, 0.616 mmol)及 K_2CO_3 496.5 mg (3.59 mmol)为原料,参照化合物 3d 的制备方法得到白色粉末状化合物 3e 188.4 mg,产率为 58.7%。ESI-MS m/z : 656.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.25 (d, $J=8.5$ Hz, 1H, 1-CONH), 7.91 (d, $J=8.3$ Hz, 1H, 1'-CONH), 7.76 ~ 7.64 (m, 3H, H-2''', 4''', 6'''), 7.34 ~ 7.16 (m, 5H, H-5' ~ 9'), 6.96 (d, $J=8.2$ Hz, 2H, H-5, 9), 6.57 (d, $J=8.3$ Hz, 2H, H-6, 8), 4.78 (t, $J=5.5$ Hz, 1H, 1'-OH), 4.69 (s, 2H, H-2''), 4.52 ~ 4.40

(m, 1H, H-2), 4.23 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, -OCH₂CH₂N), 3.93 ~ 3.79 (m, 1H, H-2'), 3.33 ~ 3.15 (m, 2H, H-1'), 2.88 ~ 2.78 (m, 2H, H-3), 2.75 ~ 2.56 (m, 2H, H-3'), 2.33 (t, $J=5.9$ Hz, 2H, -OCH₂CH₂N), 2.04 (s, 6H, -N(CH₃)₂); ^{13}C -NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 171.20 (C-1), 165.78 (C-1''), 157.90 (C-1'''), 154.76 (C-7), 137.85 (C-4'), 132.44 (C-3''', 5'''), 130.06 (C-4), 129.62 (C-5, 9), 128.43 (C-5', 9'), 127.80 (C-6', 8'), 125.90 (C-7'), 124.54 (2 \times -CF₃), 116.01 (C-2''', 6'''), 114.75 (C-6, 8), 114.38 (C-4'''), 67.17 (C-2''), 65.33 (-OCH₂CH₂N), 62.20 (C-1'), 56.60 (-OCH₂CH₂N), 54.05 (C-2), 52.54 (C-2'), 46.88 (-N(CH₃)₂), 37.09 (C-3), 36.36 (C-3')。(6) *N*-[*N*-[2-(对甲氧乙基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-苯丙氨酸酰基]-*L*-苯丙氨酸甲酯(3f)的合成,取 2b 300 mg (0.74 mmol)于反应瓶中,加 8 mL 无水 DMF 溶解,再加入 TBAI 82.5 mg (0.22 mmol)、 K_2CO_3 309 mg (2.23 mmol)及对甲氧乙基苯酚 136 mg (0.90 mmol),氩气保护下,于 45 °C 搅拌至 TLC 检测反应完全,将反应液分散至蒸馏水 200 mL 和乙酸乙酯 200 mL 中,萃取,有机层依次以饱和 Na_2CO_3 溶液 100 mL 和饱和 NaCl 溶液 100 mL 洗涤至中性,无水 $MgSO_4$ 干燥,浓缩,所得固体经硅胶柱层析纯化[$V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=50:1$],即得白色粉末状化合物 3f 224 mg,产率为 58.3%。ESI-MS m/z : 519.1 $[M+H]^+$; 1H -NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.60 (d, $J=7.6$ Hz, 1H, 1-CONH), 8.03 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, 1'-CONH), 7.31 ~ 7.13 (m, 10H, H-5 ~ 9, 5' ~ 9'), 7.08 (d, $J=8.6$ Hz, 2H, H-3''', 5'''), 6.71 (d, $J=8.7$ Hz, 2H, H-2''', 6'''), 4.68 ~ 4.56 (m, 1H, H-2), 4.54 ~ 4.45 (m, 1H, H-2'), 4.35 (s, 2H, H-2''), 3.58 (s, 3H, -COOCH₃), 3.46 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, H-8'''), 3.21 (s, 3H, 4'''-CH₂CH₂OCH₃), 3.07 ~ 2.89 (m, 3H, H-3, 3'a), 2.89 ~ 2.75 (m, 1H, H-3'b), 2.71 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, H-7'''); ^{13}C -NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 171.78 (C-1), 171.01 (-COOMe), 167.47 (C-1''), 156.08 (C-1'''), 137.42 (C-4), 137.01 (C-4'), 131.70 (C-4'''), 129.77 (C-3''', 5'''), 129.21 (C-5, 9), 129.12 (C-5', 9'), 128.33 (C-6', 8'), 128.09 (C-6, 8), 126.66 (C-7), 126.37 (C-7'), 114.40 (C-2''', 6'''), 73.04 (C-8'''), 66.65 (C-2''), 57.84 (8'''-OCH₃), 53.71 (C-2), 53.09 (C-2'), 51.95 (-

COOCH₃), 37.53 (C-3), 36.65 (C-3'), 34.51 (C-7''). (7) *N*-[*N*-[2-(4-叔丁基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-苯丙氨酰基]-*L*-苯丙氨酸甲酯(3g)的合成, 取 2b 300 mg(0.74 mmol)、TBAI 82.5 mg(0.22 mmol)、K₂CO₃ 309 mg(2.23 mmol)及 4-叔丁基苯酚135 mg(0.9 mmol)为原料, 参照化合物 3f 的制备方法得到白色粉末状化合物 3g 295 mg, 产率为 76.8%。ESI-MS *m/z*: 517.2 [M + H]⁺; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 8.61(d, J = 7.5 Hz, 1H, 1-CONH), 8.04(d, J = 8.6 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.30 ~ 7.11(m, 12H, H-5 ~ 9, 5' ~ 9', 3'', 5''), 6.70(d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2'', 6''), 4.67 ~ 4.57(m, 1H, H-2), 4.56 ~ 4.46(m, 1H, H-2'), 4.36(s, 2H, H-2''), 3.58(s, 3H, -COOCH₃), 3.11 ~ 2.66(m, 4H, H-3, 3'), 1.23(s, 9H, 4'''-C(CH₃)₃); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 171.79(C-1), 171.02(-COOMe), 167.51(C-1''), 155.46(C-1'''), 143.28(C-4'''), 137.45(C-4), 137.02(C-4'), 129.22(C-5, 9), 128.34(C-5', 9'), 128.09(C-6, 8), 126.66(C-7), 126.33(C-7'), 126.10(C-3'', 5''), 114.05(C-2'', 6''), 66.61(C-2''), 53.71(C-2), 53.07(C-2'), 51.96(-COOCH₃), 37.53(C-3), 36.65(C-3'), 33.83(-C(CH₃)₃), 31.37(-C(CH₃)₃)。 (7) *N*-[*N*-[2-(2,6-二甲氧基-苯氧基)-乙酰基]-*L*-苯丙氨酰基]-*L*-苯丙氨酸甲酯(3h)的合成, 取 2b 300 mg(0.74 mmol)、TBAI 82.5 mg(0.22 mmol)、K₂CO₃ 309 mg(2.23 mmol)及 2,6-二甲氧基苯酚139 mg(0.9 mmol)为原料, 参照化合物 3f 的制备方法得到白色粉末状化合物 3h 258 mg, 产率为 67.5%。ESI-MS *m/z*: 521.2 [M + H]⁺; ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 8.70(d, J = 7.7 Hz, 1H, 1-CONH), 8.13(d, J = 8.7 Hz, 1H, 1''-CONH), 7.30 ~ 6.99(m, 11H, H-5 ~ 9, 5' ~ 9', 4''), 6.66(d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3'', 5''), 4.69(dd, J = 13.5, 8.2 Hz, 1H, H-2), 4.52(dd, J = 14.2, 8.2 Hz, 1H, H-2'), 4.22(q, J = 15.7 Hz, 1H, H-2''), 3.70(s, 6H, 2'', 6'''-O(CH₃)₂), 3.60(s, 3H, -COOCH₃), 3.11 ~ 2.86(m, 3H, H-3, 3'a), 2.76(dd, J = 13.7, 8.1 Hz, 1H, H-3' b); ¹³C-NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 171.71(C-1), 170.44(-COOCH₃), 168.10(C-1''), 152.06(C-2'', 6''), 136.93(C-1'''), 136.87(C-4), 136.10(C-4'), 129.30(C-5, 9), 129.06(C-

6, 8), 128.29(C-5', 9'), 127.96(C-6', 8'), 126.63(C-7), 126.35(C-7'), 124.22(C-4'''), 105.35(C-3'', 5''), 71.89(C-2''), 55.83(2 × -OCH₃), 53.54(C-2'), 52.57(C-2), 51.96(-COOCH₃), 38.38(C-3), 36.67(C-3')。

1.2.5 目标化合物 3a ~ 3h 的体外抗肿瘤活性测试 采用噻唑蓝(MTT)法, 按标准操作将冻存细胞复苏, 进行细胞培养和传代, 取 PC3、K562、HEL3 类肿瘤细胞株对数生长期的细胞配置成细胞悬液后, 接种于 96 孔板中, 每孔 90 μL(约 8 000 个细胞/孔), 于 37 ℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中培养 12 h。取化合物用二甲基亚砜(DMSO)溶解后, 用含无血清的培养液配制成浓度为 5 μmol/L 的溶液, 给药, 继续培养 72 h 后加入 MTT 溶液培养 4 h, 终止培养, 弃去孔板中的上清液并加入 DMSO, 低速震荡至完全溶解, 酶联免疫检测仪于 490 nm 处检测各孔吸光(OD)值, 重复检测 3 次, 计算抑制率^[12-14]。细胞增殖抑制率(%) = [(对照组平均 OD 值-给药组平均 OD 值)/对照组平均 OD 值] × 100%

2 结果

2.1 3a ~ 3h 的苯丙氨酸二肽衍生物合成及结构确证

以 *L*-酪氨酸或 *L*-苯丙氨酸为起始原料, 首先通过与氯乙酰氯的酰化反应得到中间体 1a 和 1b, 再与 *L*-苯丙氨酸或 *L*-苯丙氨酸甲酯盐酸盐在 NMM 和 IBCF 的条件下缩合, 得到中间体 2a 和 2b, 继而将 2a 和 2b 分别在相转移催化剂 TBAI 的作用下、与不同取代的苯酚发生亲核取代反应, 而后对部分含有酚羟基的化合物进行烷基化反应, 最终得到目标化合物 3a ~ 3h, 其结构见表 1。该合成路线简便易操作且安全高效, 通过此方法, 合成了 8 个的苯丙氨酸二肽衍生物, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 和 ESI-MS 等进行结构确证, 均为未见文献报道的苯丙氨酸二肽衍生物。

2.2 合成的化合物对 PC3、K562、HEL 肿瘤细胞株的增殖抑制活性

MTT 结果显示, MTT 结果显示, 部分衍生物对白血病细胞株具有一定抑制作用, 衍生物 3b, 3e, 3f 对 PC3 和 K562 有较好的抑制作用。见表 1。

表 1 化合物 3a~3h 的结构及其对 PC3、K562 及 HEL 肿瘤细胞株的抑制率
Tab.1 The structures of target compounds 3a~3h and their inhibitory effects on the proliferation of cancer cells PC3, K562 and HEL

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	抑制率(%)		
				PC3	K562	HEL
3a	OH	3'''-CF ₃ , 4'''-F	CH ₂ OH	7.45	27.24	7.24
3b	OH	3'''-CF ₃ , 5'''-CF ₃	CH ₂ OH	46.10	28.41	3.14
3c	OH	2'''-OCH ₃ , 6'''-OCH ₃	CH ₂ OH	5.28	9.40	2.30
3d	-O(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	3'''-CF ₃ , 4'''-F	CH ₂ OH	20.68	27.50	26.08
3e	-O(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	3'''-CF ₃ , 5'''-CF ₃	CH ₂ OH	40.24	30.50	5.43
3f	H	4'''-CH ₂ CH ₂ OCH ₃	COOCH ₃	39.24	49.51	23.30
3g	H	4'''-C(CH ₃) ₃	COOCH ₃	35.26	30.81	3.13
3h	H	2'''-OCH ₃ , 6'''-OCH ₃	COOCH ₃	12.41	5.70	11.65
Doxorubicin				93.60	94.70	80.20

注:抑制率测试化合物浓度为 5 μmol/L

3 讨论

近年来由于城市化、工业化、老龄化及全球化进程的加剧,加上生态环境恶化、生活方式改变、生物学因素和遗传学因素的影响,全世界恶性肿瘤发病率和死亡率均呈上升态势。目前临床上使用的抗肿瘤药物的种类较多且作用机制各不相同,但在长期临床使用后发现,这些药物有着选择性差以及存在严重的毒副作用等缺点^[6-7]。研究表明,某些二肽类衍生物具有多种生物活性,包括:抗炎、抗疟、抗血栓形成等^[15-17],同时,一些含有苯丙氨酸、丝氨酸或丙氨酸残基的二肽类化合物还表现出抗肿瘤的活性^[8-9]。本课题组从苗族药马蹄金(*Dichondra repens* Forst.)中提取分离得到的一种天然活性成分苯丙氨酸二肽类化合物马蹄金素[N-(N-苯甲酰基-L-苯丙氨酰基)-O-乙酰基-L-苯丙氨醇]^[18-20]能通过增加细胞内 ROS 的水平,上调 P38MAPK 通路的活性,进而稳定 P53、激活 P21 转录的机制来阻止肿瘤细胞在 DNA 合成 G1/S 期的增殖,从而表现出较好的抗肿瘤活性^[10-11]。

为进一步探索苯丙氨酸二肽衍生物在抗肿瘤方面的活性,本文在课题组前期研究基础上,通过引入三氟甲基、叔丁基、以及 2'',6''-二甲氧基取代等,设计并合成了 8 个苯丙氨酸二肽衍生物,其体外抗肿瘤活性筛选结果显示,部分衍生物对白血病细胞株具有一定抑制作用,衍生物 3b、3e、3f 对人前列腺癌细胞株 PC3 和人慢性髓原白血病细胞株 K562 有一定的抑制作用。可为深入开展该类化合物在抗肿瘤药物方面的研究提供了一些参考。

4 参考文献

[1] 吴菲, 林国桢, 张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21 (2): 81-85.

[2] EDIRIWICKREMA A, SALTZMAN W M, Nanotherapy for cancer: targeting and multifunctionality in the future of cancer therapies [J]. Acs Biomater Sci Eng, 2015, 1 (2): 64-78.

[3] CHEN W, ZHENG R, ZENG H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27 (1): 2-12.

[4] 段纪俊, 陈万青, 张思维. 中国恶性肿瘤死亡率的国际比较 [J]. 中国社会医学杂志, 2009, 26 (6): 377-378.

[5] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. Ca-Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115.

[6] SHEWACH D S, KUCHTA R D. Introduction to cancer chemotherapeutics [J]. Chem Rev, 2009, 109 (7): 2859-2861.

[7] RIEDL S, LEBER R, RINNER B, et al. Human lactoferricin derived dipeptides deploying loop structures induce apoptosis specifically in cancer cells through targeting membranous phosphatidylserine [J]. BBA-Biomembranes, 2015, 1848 (11): 2918-2931.

[8] BERGEL F, STOCK J A. Cytoactive amino-acid and peptide derivatives. Part I. Substituted phenylalanines [J]. J Chem Soc, 1954, 2:2409-2417.

[9] SURESHBABU A R, DHAMODHARAN V, RAGHU-NATHAN R. Cytotoxic N-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl) (Fmoc)-dipeptides: structure-activity relationships and synergistic studies [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45

- (6): 2494–2502.
- [10] XU B X, WANG N, PAN W D, et al. Synthesis and anti-tumor activity evaluation of Matijin-Su derivatives [J]. Bioorg Chem, 2014, 56 (5): 34–40.
- [11] 胡磊, 陈小敏, 童洋, 等. *L*-苯丙氨酸二肽衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药学杂志, 2016, 25(21): 1831–1838.
- [12] 李惠斌, 蔡景龙, 潘博, 等. 成纤维细胞体外培养、冻存及复苏的实验研究 [J]. 中国美容医学杂志, 2005, 14 (4): 394–396.
- [13] 张春燕, 刘晏杰. 体外培养人肺腺癌细胞液氮冻存及复苏培养 [J]. 实用肿瘤学杂志, 1992 (2): 27–28.
- [14] 李衍忠, 赵萍, 詹晓平, 等. 新型吡咯类氨基酸缀合物的合成与抗肿瘤活性测定 [J]. 有机化学, 2015, 35 (1): 167–174.
- [15] SASHIDHARA K V, ROSAIAH J N, TYAGI E, et al. Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera*, as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44 (1): 432–436.
- [16] VALE N, NOGUEIRA F, DO ROSÁRIO V E, et al. Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential antimalarial prodrugs [J]. Eur J Med Chem, 2009, 44 (6): 2506–2516.
- [17] ZHAO M, BI L, BI W, et al. Synthesis of new class dipeptide analogues with improved permeability and antithrombotic activity [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14 (14): 4761–4774.
- [18] 曲莉莎, 曾万玲, 梁光义. 马蹄金的解热利胆作用及其对免疫功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30 (2): 146–147.
- [19] 曲莉莎, 曾万玲, 谢达莎, 等. 马蹄金提取物镇痛、抗炎及抑菌作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (4): 374–377.
- [20] 杨秀虾, 梁光义, 徐必学, 等. 马蹄金素衍生物体外抗肿瘤实验研究 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10 (5): 16–18.
- (2018-02-05 收稿, 2018-05-04 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌

(上接第 530 页)

- [12] CHEN G, GONG M, YAN M, et al. Sevoflurane induces endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in hippocampal neurons of aging rats [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e57870.
- [13] KARAMAN T, KARAMAN S, DOGRU S, et al. Short-term and long-term effects of dexamethasone on cognitive dysfunction Induced by sevoflurane in adult rats [J]. Turk J Anaesthesiol Reanim, 2017, 45: 158–163.
- [14] 张邓新, 陈莺, 季永, 等. 七氟烷对小鼠短期记忆功能和海马突触短时程增强的影响 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2012, 21(10): 884–886.
- [15] MENZIES, F M A. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2015, 16(6): 345–357.
- [16] ZHOU Y, WANG Q, ZHOU H, et al. Autophagy activation prevents sevoflurane-induced neurotoxicity in H4 human neuroglioma cells [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2016, 37(5): 580–588.
- [17] GHOSH S, BANERJEE S, SIL P C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 83: 111–124.
- [18] WANG J, LIU Y, LI X H, et al. Curcumin protects neuronal cells against status-epilepticus-induced hippocampal damage through induction of autophagy and inhibition of necroptosis [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016(1): 1–9.
- (2018-02-03 收稿, 2018-04-30 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 冉海勇