

含磺酰胺基团氨基甲酸去氢枞醇酯衍生物的合成及体外抗肿瘤活性

王德荣, 庞富华, 钱 威, 李芳耀*

(桂林医学院 药学院 广西药物分子发现与成药性优化重点实验室 广西药物分子筛选与成药性评价工程研究中心 广西高校医药生物技术与转化医学重点实验室, 广西 桂林 541199)

摘要: 去氢枞酸经还原、酯化和氨基化 3 步反应合成了 19 个 *N*-(氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯类化合物 (IV a~IV s), 经 FTIR、¹HNMR、¹³CNMR 和 ESI-MS 对其结构进行了确认。以 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 为阳性对照, 采用四甲基偶氮唑盐比色法评价了 IV a~IV s 对 T-24、HepG2、MCF-7、MGC-803 和 Hela 5 种肿瘤细胞株的体外抗肿瘤活性。利用 Hoechst-33258 染色、细胞集落形成、细胞周期分布、细胞凋亡和蛋白质印迹实验探究了 *N*-[(2-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV d) 初步作用机制。结果表明, 部分化合物抗肿瘤活性优于 5-FU, 其中, 化合物 IV d 对 T-24 细胞的细胞毒性活性最好, 其半抑制浓度为 (14.64±0.46) μmol/L, 可明显抑制 T-24 细胞的生长, 阻滞其细胞周期于 S 期 (即 DNA 合成期); IV d 通过线粒体介导的内源性 Caspase 途径, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Caspase3、Caspase9 的表达水平, 上调促凋亡蛋白 Bax、Cleaved Caspase9、Cleaved Caspase9 的表达水平, 从而诱导和促进 T-24 发生凋亡。磺酰胺结构的引入能够改善去氢枞酸衍生物的抗肿瘤活性。

关键词: 去氢枞酸; 去氢枞醇; 氨基甲酸酯; 抗肿瘤活性; 凋亡; 医药原料

中图分类号: R914; R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2024) 11-2493-11

Synthesis and *in vitro* antitumor activity of sulfonamide-substituted dehydroabietyl carbamate derivatives

WANG Derong, PANG Fuhua, QIAN Wei, LI Fangyao*

(Guangxi Key Laboratory of Drug Discovery and Optimization, Guangxi Engineering Research Center for Pharmaceutical Molecular Screening and Druggability Evaluation, Key Laboratory of Medical Biotechnology and Translational Medicine, School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China)

Abstract: Nineteen kinds of *N*-(aminosulfonyl)dehydrofirinyl carbamate compounds were synthesized from dehydroabietic acid *via* reduction, esterification and amination three step reaction, and characterized by FTIR, ¹HNMR, ¹³CNMR, and ESI-MS. The antitumor activity of IV a~IV s against T-24, HepG2, MCF-7, MGC-803 and Hela tumor cell lines was evaluated using 5-fluorouracil as positive control by tetramethylazolium salt colorimetric assay, followed by analysis on the preliminary mechanism of *N*-[(2-bromophenyl)sulfamyl]dehydrofirinyl carbamate (IV d) *via* Hoechst-33258 staining, cell colony formation, cell cycle distribution, cell apoptosis and western blot assay. The results showed that some compounds exhibited superior antitumor activity in comparison with positive drugs, with compound IV d displaying the best activity against T-24 cells with a half inhibitory concentration of (14.64±0.46) μmol/L, arresting the cell cycle in the S phase thus significantly inhibiting the growth of T-24 cells. In addition,

收稿日期: 2023-10-26; 定用日期: 2023-12-25; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230912

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFAA026277); 桂林市科学研究与技术开发计划项目 (20210227-1); 广西林产化学与工程重点实验室开放课题资助项目 (GXFK2202); 广西药物分子发现与成药性优化重点实验室课题 (GKLPMDDO-2022-P02); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助项目; 桂林医学院硕士研究生科研项目 (GYK2023017); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202310601037)

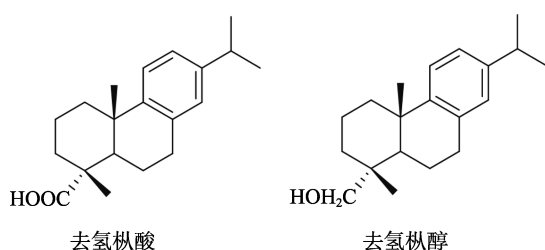
作者简介: 王德荣 (1999—), 男, 硕士生, E-mail: wdr2890661650@163.com。联系人: 李芳耀 (1979—), 男, 教授, E-mail: lifangyao2006@163.com。

compound IVd could promote T-24 cells apoptosis through upregulation of proapoptotic ones Bax, Cleaved Caspase9, Cleaved Caspase9 and downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2, Caspase3, Caspase9 expression. The introduction of sulfanilamide structure could improve the anti-tumor activity of dehydroabietic acid derivatives.

Key words: dehydroabietic acid; dehydroabietinol; carbamates; antitumor activity; apoptosis; drug materials

膀胱癌是泌尿系统的主要恶性肿瘤之一。2020 年, 全球约有 57.3 万新发和 21.3 万死亡病例, 男女比例约为 4 : 1^[1]。目前, 膀胱内化疗是膀胱肿瘤经尿道切除术后常见的治疗方式, 但化疗药产生的毒副作用和多药耐药^[2-3]严重影响其临床应用和治疗效果。因此, 寻找新型高效、低毒抗肿瘤药物迫在眉睫。

天然产物往往具有多靶点特性, 已成为抗肿瘤新药开发的重要来源。目前, 临床使用的抗肿瘤药物中有 50% 以上直接或间接来源于天然产物^[4]。萜类化合物是一类具有多种生物活性的天然产物, 其结构是新药研发最有前途的先导结构之一^[5]。去氢枞酸 (DHA) 又名脱氢松香酸 (结构式如下所示), 是从松香中分离出来的天然三环二萜树脂酸, 其衍生物表现出广泛的生物活性, 包括抗菌^[6]、抗炎^[7]、抗真菌^[8]、抗病毒^[9]、抗氧化^[10]及舒张血管^[11]等, 尤其是可通过 DNA 结合、抗血管生成、阻滞肿瘤细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞迁移和侵袭以及损伤肿瘤细胞线粒体等途径发挥显著的抗肿瘤作用^[12-13]。可见, 去氢枞酸是一种极具潜力的先导化合物。去氢枞醇 (DHO) 是去氢枞酸还原产物 (结构式如下所示), 前期本课题组合成了系列去氢枞醇衍生物, 发现部分化合物具有良好的细胞毒性^[14-16]。

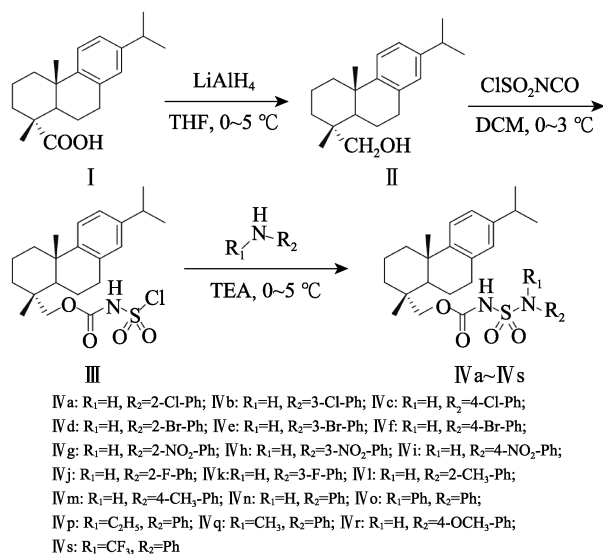


国 Bio-Tek 公司; CL-32L 型高压灭菌器, 日本 ALP 公司; Pilot-S45 型超纯水系统, 上海和泰仪器公司; DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; DK-320 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; MDF-C8V1 型 -80°C 超低温冰箱, 日本 Panasonic 公司; 超净工作台, 苏州苏净安泰公司; TDL-50B 型低速自动平衡离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; IX73-DP80 型研究级倒置荧光成像系统显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; Tanon 4600 型化学发光检测仪, 上海天能生命科学有限公司; BD FACSACantu 流式细胞仪, 碧迪医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 合成路线

以去氢枞酸 (I) 为原料, 通过 LiAlH_4 还原得到去氢枞醇 (II); 然后, II 与 ClSO_2NCO 反应生成磺酰氯 (III); 最后, III 与苯胺系列化合物反应得到 N -(氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯类化合物 (IV), 其合成路线如下所示。



1.2.2 去氢枞醇 (II) 的制备

去氢枞醇按文献[23]方法制备。以过量 LiAlH_4 为还原剂, 严格控制 LiAlH_4 的滴加速率, 并严格控制反应温度 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。反应完成后, 缓慢滴加质量分数为 12%~20% 的稀硫酸, 淬灭体系中剩余的 LiAlH_4 , 淬灭完成后, 经乙酸乙酯萃取、柱层析 (石油醚与乙酸乙酯体积比 8 : 1), 得到无色透明油状液体, 产率为 64.0%。

1.2.3 N -(氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯类化合物 (IV) 的制备

称取新制备的 II 0.3 g (1 mmol) 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL DCM 溶解, 在冰浴 $0\sim 3^{\circ}\text{C}$ 下缓慢滴加 ClSO_2NCO 0.14 g (1 mmol), 并搅拌反应 0.5 h, 得到中间体磺酰氯 (III)。反应结束后,

直接加入 0.1 g (1 mmol) TEA, 再缓慢滴加用 DCM 溶解的系列苯胺化合物溶液进行反应, 反应温度 $0\sim 5^{\circ}\text{C}$, 搅拌反应 2~3 h, TLC 跟踪反应进程。待反应结束后, 先用 30 mL 的 DCM 稀释, 然后用 0.1 mol/L 的盐酸和蒸馏水依次清洗 3 次有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥后蒸除有机溶剂。混合物用柱层析 [洗脱剂为 $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 4 : 1$] 纯化, 得目标产物 IV。按上述方法共合成 19 个目标化合物 IVa~IVs。

N -(2-氯苯基)氨基磺酰基氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVa): 白色晶体, 产率 68.8%, m.p. $99.3\sim 101.4^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3282, 2958, 2869, 1743, 1594, 1486, 1383, 1357, 1240, 1218, 1162。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.52 (dd, $J = 8.2$ 、1.4 Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 8.0$ 、1.4 Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.4$ 、1.7 Hz, 1H), 7.08~7.03 (m, 2H), 6.90 (dd, $J = 8.1$ 、1.7 Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.76 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.81~2.72 (m, 2H), 2.71~2.60 (m, 1H), 2.18 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 1.62 (dd, $J = 9.3$ 、4.3 Hz, 2H), 1.57~1.53 (m, 1H), 1.45~1.41 (m, 1H), 1.28 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.25~1.22 (m, 1H), 1.22~1.19 (m, 1H), 1.16 (s, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.83 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 150.7, 146.9, 145.7, 134.5, 132.9, 129.8, 128.0, 126.9, 126.3, 124.8, 124.2, 124.0, 121.9, 77.4, 77.1, 76.8, 75.0, 60.6, 44.1, 38.2, 37.4, 37.1, 35.4, 33.5, 30.0, 25.2, 24.0, 24.0, 21.1, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 理论值 541.19, 测试值 541.19。

N -(3-氯苯基)氨基磺酰基氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVb): 白色晶体, 产率 28.2%, m.p. $65.2\sim 67.4^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3269, 2958, 2869, 1723, 1597, 1476, 1405, 1350, 1245, 1214, 1160。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.58 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 7.18 (dd, $J = 3.0$ 、2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J = 8.1$ 、1.6 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.95 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.75 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.81~2.70 (m, 2H), 2.69~2.57 (m, 1H), 2.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.62~1.58 (m, 2H), 1.41 (dd, $J = 11.2$ 、3.5 Hz, 1H), 1.27 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H), 1.24~1.20 (m, 1H), 1.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 1.16 (s, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.82 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 151.4, 146.9, 145.8, 137.0, 135.1, 134.5, 130.5, 126.9, 126.3, 124.2, 124.0, 122.0, 120.1, 77.4, 77.1, 76.8, 74.9, 60.6, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.4, 33.5, 29.9, 25.1, 24.0, 24.0, 21.0, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S} [\text{M}+\text{Na}]^+$ 理论值 541.19, 测试值 541.19。

N -(4-氯苯基)氨基磺酰基氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVc): 白色晶体, 产率 24.2%, m.p. $125.2\sim 127.1^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3282, 2958, 2869, 1743,

1616, 1594, 1486, 1457, 1357, 1240, 1218, 1162。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.81 (s, 2H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.11 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.78 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.77~2.65 (m, 1H), 2.30 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 1.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.53 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 1.46 (s, 1H), 1.44 (s, 1H), 1.36 (s, 1H), 1.32 (s, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 0.93 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 157.7, 151.4, 147.3, 146.9, 145.9, 145.7, 134.9, 134.5, 134.4, 131.9, 129.6, 126.9, 124.2, 124.2, 124.0, 123.9, 123.5, 122.5, 77.4, 77.1, 76.8, 74.6, 73.0, 60.5, 44.6, 43.9, 43.8, 38.3, 38.2, 37.4, 37.3, 37.1, 37.0, 35.5, 35.3, 33.5, 30.1, 29.9, 25.3, 25.20, 24.0, 19.1, 19.0, 18.6, 18.5, 18.4, 17.4, 17.2, 17.1, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 理论值 519.19, 测试值 519.14。

N-[(2-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV d): 黄色晶体, 产率 60.1%, m.p. 153.3~155.6 $^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3480, 2961, 2869, 1715, 1602, 1482, 1406, 1336, 1236, 1162, 1067。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.66 (d, $J = 17.5$ Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.37 (dd, $J = 5.8$ 、3.1 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.01 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.06 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.86 (qd, $J = 14.2$ 、6.4 Hz, 2H), 2.80~2.68 (m, 1H), 2.29 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.72 (dd, $J = 11.3$ 、5.0 Hz, 2H), 1.69~1.66 (m, 1H), 1.52 (dd, $J = 11.2$ 、3.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.35~1.31 (m, 1H), 1.29 (s, 1H), 1.27 (s, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 0.93 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 151.3, 146.9, 145.8, 137.1, 134.5, 130.8, 129.3, 126.9, 124.9, 124.2, 123.9, 122.9, 120.6, 77.4, 77.1, 76.7, 74.9, 60.6, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 29.9, 25.1, 24.0, 24.00, 21.0, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 理论值 563.15, 测试值 563.17。

N-[(3-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV e): 黄色晶体, 产率 55.4%, m.p. 148.3~150.2 $^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3351, 3247, 2922, 1682, 1595, 1544, 1474, 1342, 1301, 1208, 1163。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.66 (d, $J = 17.5$ Hz, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.37 (dd, $J = 5.8$ 、3.1 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.01 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.06 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.86 (qd, $J = 14.2$ 、6.4 Hz, 2H), 2.80~2.68 (m, 1H), 2.29 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.72 (dd, $J = 11.3$ 、5.0 Hz, 2H), 1.69~1.66 (m, 1H), 1.52 (dd, $J = 11.2$ 、3.4 Hz, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.35~1.31 (m, 1H), 1.29 (s, 1H), 1.27 (s, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 0.93 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 151.3, 146.9, 145.8, 137.1, 134.5, 130.8, 129.3, 126.9, 124.9, 124.20, 124.0, 123.0,

120.6, 77.4, 77.1, 76.7, 74.9, 60.5, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 29.9, 25.1, 24.0, 24.0, 21.0, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 理论值 563.15, 测试值 563.17。

N-[(4-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV f): 浅黄色晶体, 产率 71.9%, m.p. 85.2~87.6 $^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3278, 2958, 2869, 1720, 1649, 1490, 1470, 1398, 1351, 1215, 1162。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.99 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 3.66 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.81~2.69 (m, 2H), 2.67~2.54 (m, 1H), 2.18 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.59 (dd, $J = 11.2$ 、7.3 Hz, 3H), 1.42~1.38 (m, 1H), 1.24~1.20 (m, 2H), 1.18 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 1.16 (s, 1H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 151.3, 146.9, 145.9, 134.8, 134.4, 132.6, 127.0, 124.2, 124.03, 123.9, 112.0, 77.4, 77.1, 76.8, 74.6, 43.8, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 29.9, 25.2, 24.0, 18.9, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$] 理论值 562.15, 测试值 561.20。

N-[(2-硝基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV g): 白色晶体, 产率 45.4%, m.p. 148.3~150.2 $^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3394, 2958, 2869, 1755, 1612, 1492, 1455, 1413, 1382, 1220, 1162。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 8.04 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.00~7.92 (m, 1H), 7.46 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 3.96 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.73 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.76~2.71 (m, 2H), 2.60 (dd, $J = 17.5$ 、8.0 Hz, 1H), 2.17 (d, $J = 13.1$ Hz, 1H), 1.59 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.55~1.50 (m, 1H), 1.41 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 1.35 (dd, $J = 8.9$ 、3.7 Hz, 1H), 1.29 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 1.25 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 1.19 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 1.14 (s, 6H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 157.9, 151.4, 148.9, 147.3, 146.8, 145.8, 145.7, 137.4, 134.8, 134.4, 130.4, 127.0, 126.9, 126.9, 124.2, 124.2, 124.0, 123.9, 120.4, 115.9, 100.0, 77.4, 77.1, 76.8, 75.0, 73.1, 44.0, 43.8, 38.3, 38.2, 37.4, 37.3, 37.1, 37.0, 35.4, 35.3, 33.5, 30.1, 29.9, 25.3, 25.2, 24.0, 24.0, 21.1, 19.0, 18.9, 18.6, 18.4, 17.4, 17.1, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ 理论值 528.22, 测试值 528.20。

N-[(3-硝基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV h): 浅黄色晶体, 产率 60.5%, m.p. 99.3~101.4 $^{\circ}\text{C}$ 。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3397, 2959, 2869, 1727, 1620, 1534, 1459, 1417, 1349, 1221, 1162。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 8.12 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.94 (s, 2H), 7.40 (d, $J = 34.4$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.96 (dd, $J = 10.6$ 、4.0 Hz, 1H), 3.74 (dd, $J = 10.6$ 、3.9 Hz, 1H), 2.77~2.71 (m, 2H), 2.60 (dd, $J = 17.9$ 、8.1 Hz, 1H),

2.16 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 1.58 (s, 2H), 1.52 (s, 1H), 1.40 (s, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.27 (s, 1H), 1.25 (s, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.13 (s, 6H), 1.11 (s, 3H), 1.08 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 151.3, 148.9, 146.8, 145.9, 137.2, 134.4, 130.4, 127.2, 126.8, 124.2, 124.0, 120.6, 116.1, 77.4, 77.1, 76.7, 75.0, 44.0, 38.2, 37.4, 37.3, 37.1, 37.0, 35.4, 33.5, 29.8, 25.2, 25.1, 24.0, 19.0, 18.3, 17.4, 17.1。ESI-MS, m/z : C₂₇H₃₅N₃O₆S [M-H]⁻理论值 528.22, 测试值 528.20。

N-(4-硝基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVi): 浅黄色晶体, 产率 74.2%, m.p. 65.2~67.4 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3459, 2959, 2869, 1698, 1633, 1526, 1500, 1417, 1344, 1222, 1162。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 8.57 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 4.08 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.79 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.87~2.80 (m, 2H), 2.70 (dd, $J = 17.5$ 、7.9 Hz, 1H), 2.28 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 1.68 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.63 (s, 1H), 1.51 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 1.48 (s, 1H), 1.37 (s, 1H), 1.34 (s, 1H), 1.29 (s, 1H), 1.25 (s, 6H), 1.24 (s, 3H), 1.20 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 158.2, 151.2, 147.2, 146.8, 146.0, 145.7, 144.6, 142.0, 134.8, 134.3, 126.9, 125.4, 124.2, 124.1, 123.9, 119.7, 77.4, 77.1, 76.8, 74.9, 73.2, 43.9, 43.8, 38.3, 38.2, 37.4, 37.3, 37.2, 37.0, 35.5, 35.3, 33.5, 30.1, 29.9, 25.3, 25.2, 24.0, 24.0, 19.0, 18.6, 18.3, 17.4, 17.2。ESI-MS, m/z : C₂₇H₃₅N₃O₆S [M-H]⁻理论值 528.22, 测试值 528.20。

N-(2-氟苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVj): 白色晶体, 产率 66.5%, m.p. 146.6~148.9 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3361, 3222, 2927, 1680, 1601, 1500, 1471, 1418, 1352, 1260, 1164。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.44 (td, $J = 7.9$ 、1.7 Hz, 1H), 7.09~7.04 (m, 2H), 7.02 (dd, $J = 9.2$ 、1.3 Hz, 1H), 7.00~6.93 (m, 1H), 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.97 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.82~2.72 (m, 2H), 2.67 (dd, $J = 17.2$ 、8.2 Hz, 1H), 2.19 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.62 (dd, $J = 9.3$ 、4.4 Hz, 2H), 1.58~1.53 (m, 1H), 1.46~1.41 (m, 1H), 1.32~1.28 (m, 1H), 1.25 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 1.22 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 1.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.84 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 155.6, 153.2, 151.0, 150.9, 146.9, 145.7, 134.5, 127.2, 127.1, 126.9, 125.0, 124.9, 124.2, 124.1, 123.9, 123.8, 123.7, 116.0, 115.8, 77.4, 77.1, 76.8, 75.1, 44.2, 38.2, 37.4, 37.1, 35.4, 33.5, 29.9, 25.2, 24.0, 24.0, 19.00, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : C₂₇H₃₅FN₂O₄S [M-H]⁻理论值 501.23, 测试值 501.20。

N-(3-氟苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVk): 白色晶体, 产率 60.1%, m.p. 153.3~

155.6 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3342, 3253, 2926, 1689, 1615, 1493, 1460, 1407, 1343, 1232, 1167。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.72 (d, $J = 36.1$ Hz, 2H), 7.16~7.10 (m, 1H), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.94~6.90 (m, 1H), 6.87~6.82 (m, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.94 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.80~2.69 (m, 2H), 2.68~2.56 (m, 1H), 2.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.60 (dd, $J = 10.3$ 、5.6 Hz, 2H), 1.54 (dd, $J = 10.4$ 、7.0 Hz, 1H), 1.41 (dd, $J = 11.0$ 、3.7 Hz, 1H), 1.25 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 1.23~1.20 (m, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.16 (s, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.82 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 164.3, 161.9, 151.3, 146.9, 145.8, 137.4, 137.3, 134.5, 130.8, 130.7, 126.9, 124.2, 124.0, 117.3, 117.3, 113.1, 112.9, 109.3, 109.1, 77.4, 77.1, 76.7, 74.8, 60.5, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.4, 33.5, 29.8, 25.1, 24.0, 23.9, 21.0, 19.0, 18.4, 17.1, 14.2。ESI-MS, m/z : C₂₇H₃₅FN₂O₄S [M-H]⁻理论值 501.23, 测试值 501.22。

N-(2-甲基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVl): 白色晶体, 产率 77.4%, m.p. 67.2~69.2 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3279, 2958, 2869, 1724, 1610, 1498, 1460, 1383, 1351, 1228, 1162。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.42 (dd, $J = 11.9$ 、7.6 Hz, 1H), 7.27~7.21 (m, 1H), 7.15~7.11 (m, 1H), 7.05 (ddd, $J = 12.9$ 、7.7 和 5.8 Hz, 3H), 6.90 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.99 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 3.75 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.83~2.63 (m, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.19 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H), 1.67~1.61 (m, 3H), 1.47~1.41 (m, 1H), 1.28 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 1.25 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.21 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.18 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.13 (d, $J = 3.2$ Hz, 6H), 0.84 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 151.4, 146.9, 145.8, 136.5, 134.5, 132.9, 130.1, 126.9, 124.2, 124.0, 123.0, 77.4, 77.1, 76.8, 74.6, 60.5, 43.9, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 31.5, 30.2, 29.9, 29.7, 25.2, 24.0, 23.9, 21.0, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : C₂₈H₃₈N₂O₄S [M-H]⁻理论值 497.26, 测试值 497.20。

N-(4-甲基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IVm): 白色晶体, 产率 30.9%, m.p. 85.2~87.6 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3287, 2959, 2869, 1728, 1599, 1498, 1477, 1389, 1361, 1208, 1169。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.21~7.16 (m, 1H), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.00 (s, 3H), 6.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.99 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H), 2.80~2.63 (m, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.18 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.63 (dd, $J = 9.1$ 、4.4 Hz, 2H), 1.57~1.51 (m, 1H), 1.41 (dd, $J = 9.0$ 、5.7 Hz, 1H), 1.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.21 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.83 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 151.4, 146.9, 145.8, 136.5, 134.5, 132.9, 130.1, 126.9, 124.2, 124.0, 123.0, 77.4, 77.1, 76.8, 74.6, 60.5, 43.9, 38.2, 37.3,

37.1, 35.3, 33.5, 31.5, 30.2, 29.9, 29.7, 25.2, 24.0, 23.9, 21.0, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/Z : $C_{28}H_{38}N_2O_4S$ [M-H]⁻理论值 497.26, 测试值 498.00。

N-(苯氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_n): 白色晶体, 产率 77.2%, m.p. 125.2~127.1 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3288, 2959, 2869, 1728, 1640, 1477, 1437, 1389, 1361, 1208, 1169。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.35 (d, J = 23.4 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.11 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.96 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.80~2.59 (m, 3H), 2.18 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 1.63~1.59 (m, 2H), 1.57~1.50 (m, 1H), 1.40 (dd, J = 9.7、5.0 Hz, 1H), 1.32~1.23 (m, 2H), 1.22 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.82 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 151.4, 146.9, 145.8, 135.7, 134.5, 129.5, 126.9, 126.4, 124.2, 124.0, 122.5, 77.4, 77.1, 76.8, 74.7, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 29.9, 25.2, 24.0, 23.9, 19.0, 18.4, 17.2。ESI-MS, m/Z : $C_{27}H_{36}N_2O_4S$ [M-H]⁻理论值 483.26, 测试值 483.20。

N-(*N'*,*N'*-二苯基氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_o): 淡蓝色晶体, 产率 66.5%, m.p. 146.6~148.9 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3237, 2958, 2930, 1755, 1648, 1492, 1454, 1370, 1242, 1189, 1151。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.55 (d, J = 7.3 Hz, 4H), 7.33 (dt, J = 20.6, 6.9 Hz, 6H), 7.19 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.13 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.97~2.76 (m, 3H), 2.30 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 1.78 (dd, J = 9.6、4.9 Hz, 2H), 1.67 (dd, J = 10.4、6.9 Hz, 1H), 1.55 (dd, J = 9.6、5.2 Hz, 1H), 1.42~1.30 (m, 4H), 1.24 (d, J = 1.6 Hz, 6H), 1.23 (s, 3H), 0.95 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 150.4, 146.9, 145.8, 140.9, 134.5, 129.5, 128.4, 127.9, 126.9, 124.2, 124.0, 77.4, 77.1, 76.8, 74.6, 44.0, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 30.0, 25.2, 24.0, 23.9, 19.0, 18.4, 17.2。ESI-MS, m/Z : $C_{33}H_{40}N_2O_4S$ [M-H]⁻理论值 559.27, 测试值 559.20。

N-[(*N'*-乙基-*N'*-苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_p): 白色晶体, 产率 77.4%, m.p. 67.2~69.2 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3255, 2959, 2950, 1750, 1595, 1494, 1454, 1381, 1226, 1175, 1140。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.33 (td, J = 5.2、2.0 Hz, 4H), 7.20 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.16 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 4.02~3.91 (m, 2H), 3.85 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.99~2.80 (m, 3H), 2.33 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 1.81 (dd, J = 10.3、5.9 Hz, 2H), 1.73~1.67 (m, 1H), 1.58 (dd, J = 11.4、3.5 Hz, 1H), 1.45 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 1.43~1.35 (m, 2H), 1.28 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.12 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.98 (s, 3H)。¹³CNMR

(101 MHz, CDCl₃), δ : 151.3, 147.0, 145.8, 138.0, 134.5, 129.7, 129.5, 129.1, 128.5, 126.9, 124.2, 124.0, 77.4, 77.1, 76.8, 74.3, 49.2, 44.0, 38.3, 37.3, 37.2, 35.4, 33.5, 29.9, 25.20, 24.0, 23.9, 19.1, 18.4, 17.3, 14.5, 14.2。ESI-MS, m/Z : $C_{29}H_{40}N_2O_4S$ [M-H]⁻理论值 511.27, 测试值 511.26。

N-[(*N'*-甲基-*N'*-苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_q): 白色晶体, 产率 63.9%, m.p. 62.3~65.8 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3255, 2959, 2950, 1750, 1595, 1494, 1454, 1381, 1226, 1175, 1140。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.40~7.30 (m, 4H), 7.20 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.13 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.84 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.51 (d, J = 1.6 Hz, 3H), 2.97~2.81 (m, 3H), 2.32 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 1.80 (dd, J = 9.1、4.6 Hz, 2H), 1.69 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 1.60~1.54 (m, 1H), 1.44 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 1.38 (s, 1H), 1.35 (s, 1H), 1.25 (s, 6H), 1.23 (s, 3H), 0.97 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 151.37, 146.96, 145.78, 140.57, 134.50, 129.42, 129.32, 127.97, 126.89, 126.82, 124.16, 123.95, 118.78, 113.72, 77.39, 77.08, 76.76, 74.45, 44.03, 41.00, 38.26, 37.34, 37.16, 35.36, 33.47, 31.54, 29.94, 25.21, 24.02, 23.99, 19.04, 18.42, 17.24。ESI-MS, m/Z : $C_{28}H_{38}N_2O_4S$ [M-H]⁻理论值 497.26, 测试值 497.25。

N-[(4-甲氧基苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_r): 白色晶体, 产率 59.4%, m.p. 120.6~122.9 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3255, 2959, 2950, 1750, 1595, 1494, 1454, 1381, 1226, 1175, 1140。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.13 (s, 1H), 7.05 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 6.91 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.70 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 4.01 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.72 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 3.5 Hz, 3H), 2.80~2.64 (m, 3H), 2.19 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 1.65 (s, 2H), 1.58~1.53 (m, 1H), 1.43 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 1.38 (d, J = 21.9 Hz, 1H), 1.28 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 1.23 (s, 1H), 1.17 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.12 (s, 6H), 0.84 (s, 3H)。¹³CNMR (101 MHz, CDCl₃), δ : 158.5, 151.5, 146.9, 145.8, 134.5, 128.1, 126.9, 125.5, 124.2, 124.0, 114.7, 77.4, 77.1, 76.7, 74.6, 55.5, 43.9, 38.2, 37.33, 37.1, 35.3, 33.5, 29.9, 25.2, 24.0, 23.9, 19.0, 18.4, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/Z : $C_{28}H_{38}N_2O_5S$ [M+Na]⁺理论值 537.25, 测试值 537.24。

N-[(*N'*-三氟甲基-*N'*-苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV_s): 白色晶体, 产率 59.4%, m.p. 120.6~122.9 °C。FTIR (KBr), ν/cm^{-1} : 3255, 2959, 2950, 1750, 1595, 1494, 1454, 1381, 1226, 1175, 1140。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃), δ : 7.90 (s, 1H), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.97 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 3.68 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 2.78~2.69 (m, 2H), 2.65~2.55 (m, 1H), 2.17 (d,

$J = 12.9$ Hz, 1H), 1.63~1.57 (m, 2H), 1.53~1.48 (m, 1H), 1.39 (dd, $J = 11.3, 3.2$ Hz, 1H), 1.25 (s, 1H), 1.21 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 1.18 (s, 1H), 1.16 (s, 1H), 1.13 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 0.80 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ : 151.3, 146.8, 145.9, 139.1, 134.4, 128.0, 126.9, 126.8, 126.7, 125.2, 124.2, 124.0, 122.5, 121.0, 77.4, 77.1, 76.7, 74.7, 60.6, 43.8, 38.2, 37.3, 37.1, 35.3, 33.5, 29.8, 25.2, 24.0, 23.9, 21.0, 18.9, 18.3, 18.2, 17.2, 14.2。ESI-MS, m/z : $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ [M-H] $^-$ 理论值 551.22, 测试值 551.22。

1.2.4 MTT 实验

将 T-24、HepG 2、MCF-7、MGC-803、Hela 和 LO₂ 6 种细胞株以每孔 3000 个细胞接种到 96 孔板上, 每孔体积 180 μL , 放入培养箱于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后加入待测药物, 设置 6 个药物质量浓度梯度, 每个质量浓度设置 3 个复孔, 每孔 20 μL 。阳性对照为五氟尿嘧啶 (5-FU), 阴性对照组加入含体积分数 1% DMSO 的 DMEM 培养基, 放入培养箱继续培养 44 h 后加 MTT (质量浓度 5 g/L), 每孔 20 μL , 再继续培养 4 h 后终止。小心吸弃孔内培养液中的上清液, 每孔加 150 μL 的 DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定其吸光度 (OD)。根据下式计算细胞生长抑制率, 再用 SPSS 软件计算药物半抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{生长抑制率} / \% = \frac{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.5 细胞集落形成实验

将 T-24 细胞以每孔 3000 个的密度均匀接种于 6 孔板中。在培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培育 24 h 后, 其中 3 个孔内吸出培养液更换为含 3 种浓度 IVd (30、20、10 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养液 (含体积分数 1% 双抗和体积分数 10% 血清的 DMEM 培养基), 另外 1 个孔吸出培养液更换为含体积分数 0.1% DMSO 的新鲜培养液作为实验对照组, 每孔 20 μL 。每 3 d 更换一次培养液, 培养 12 d 后, 去除培养液, 用质量浓度为 40 g/L 的多聚甲醛溶液固定 15 min 后, 再用结晶紫染色液染色 15 min, 弃去结晶紫染料, 用 PBS 清洗 3 次后置于电热鼓风干燥箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min, 最后拍照^[28]。用 Image J 软件统计克隆形成率:

$$\text{克隆形成率} / \% = \text{克隆细胞数} / \text{接种细胞数} \times 100 \quad (2)$$

1.2.6 细胞形态学分析实验

将 T-24 细胞制成单细胞悬液, 并以每孔 1×10^4 个细胞的密度将其接种于 6 孔板上。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 其中 3 个孔内吸出培养液更换为含 3 种浓度 IVd (30、20、10 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养液, 另外 1 个孔吸出培养液更换为含体积分数 0.1% DMSO 的新鲜培养液作为实验对照组, 每孔 20 μL 。继续

培养 48 h 后, 弃去培养液并用 PBS 清洗, 除去死去的悬浮细胞, 再加入 Hoechst-33258 染色液覆盖样品, 室温避光放置 3~5 min。然后吸除 Hoechst-33258 染色液并用 PBS 清洗样品 3 次, 每次 3~5 min。最后直接放在研究级倒置荧光成像系统显微镜下观察并拍照。

1.2.7 细胞周期实验

将 T-24 细胞制成单细胞悬液, 并以每孔 1×10^5 个细胞的密度将其接种于 6 孔板上, 置于 CO₂ 培养箱中。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 其中 3 个孔内吸出培养液更换为含 3 种浓度 IVd (30、20、10 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养液, 另外 1 个孔吸出培养液更换为含体积分数 0.1% DMSO 的新鲜培养液作为实验对照组, 每孔 20 μL 。继续培养 48 h 后, 收集上清培养液至各孔对应的 10 mL 离心管中。各孔内加入 2 mL、4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 轻轻洗涤细胞, 然后将 PBS 溶液转移至上述各孔对应的离心管中。孔内再加入 0.5 mL 胰蛋白酶消化细胞, 消化后回收溶液至各孔对应的离心管中。用 5 mL 体积分数 75% 的 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰乙醇固定细胞, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏保存 24 h 后取出固定细胞, 用 500 μL 的 PI/RNaseA [含 RNaseA 的碘化丙啶 (PI) 染色液] (质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$), 轻轻吹散重悬, 室温避光 30 min, 过 300 目筛后放入流式细胞仪进行测试。

1.2.8 细胞凋亡实验

将 T-24 细胞接种于 70 mm 的培养皿中, 待细胞生长至培养皿面积的 80%, 置于 CO₂ 培养箱中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 其中 3 个培养皿中更换为含 3 种浓度 IVd (30、20、10 $\mu\text{mol/L}$) 的新鲜培养液, 另外 1 个培养皿更换为含体积分数 0.1% DMSO 的新鲜培养液作为实验对照组。继续培养 48 h 后, 用无 EDTA 胰酶消化, 使用凋亡检测试剂盒检测, 每个待测样品中分别加入 5 μL 的 PI 和 5 μL 的 Annexin V-FITC (重组人 Annexin V-FITC), 轻轻重悬细胞, 室温避光 30 min。加入 100 μL 的 1 $\times$ binding buffer (浓缩结合缓冲液), 过 300 目筛后放在流式细胞仪上进行测试 (设不染、PI 单染、Annexin V-FITC 单染的凋亡细胞作为调试补偿; G1 期是 DNA 合成前期; S 期是 DNA 合成期; G2 期是 DNA 合成后期)。

1.2.9 蛋白质免疫印迹实验

将 T-24 细胞接种于 70 mm 培养皿中, 待细胞生长至培养皿面积的 80%, 其中 4 个培养皿中加入不同浓度的化合物 IVd (0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 培养液, 每个培养皿 20 μL 处理 48 h, 然后裂解收集细胞, 用考马斯亮蓝法制备蛋白样品。蛋白质样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后转移

到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 微孔膜上。将膜置于质量浓度为 0.05 g/mL 的脱脂牛奶中封闭 2 h 后, 加入不同蛋白的特异性抗体, 于 4 °C 孵育过夜, 加入二抗孵育 2 h, 最后用化学发光检测仪进行检测。每次实验均以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参校正。用 Image J 软件分析条带的灰度并计算蛋白质的相对含量。

2 结果与讨论

2.1 体外抗肿瘤活性结果分析

表 1 为目标化合物 IV a~IV s 对 T-24、HepG2、MCF-7、MGC-803 和 Hela 细胞的体外抗肿瘤活性测定结果。

表 1 化合物 IV a~IV s 的体外抗肿瘤活性
Table 1 Antitumor activities of compounds IV a~IV s *in vitro*

化合物	IC ₅₀ /(μ mol/L)					
	T-24	HepG2	MCF-7	MGC-803	Hela	LO ₂
IV a	35.38 $\pm$ 2.36	>100	47.81 $\pm$ 0.53	43.11 $\pm$ 4.31	43.67 $\pm$ 1.21	74.22 $\pm$ 1.93
IV b	46.45 $\pm$ 1.19	>100	49.21 $\pm$ 1.35	42.76 $\pm$ 2.31	47.31 $\pm$ 2.13	81.65 $\pm$ 1.67
IV c	47.89 $\pm$ 0.94	>100	68.41 $\pm$ 0.75	45.31 $\pm$ 2.78	49.44 $\pm$ 1.77	64.87 $\pm$ 2.99
IV d	14.64 $\pm$ 0.46	>100	35.74 $\pm$ 0.23	32.16 $\pm$ 1.82	21.67 $\pm$ 0.86	81.55 $\pm$ 1.73
IV e	34.67 $\pm$ 0.79	89.31 $\pm$ 2.12	42.17 $\pm$ 1.63	44.12 $\pm$ 2.17	43.23 $\pm$ 1.21	78.33 $\pm$ 2.75
IV f	32.56 $\pm$ 1.95	79.32 $\pm$ 1.73	39.38 $\pm$ 1.43	42.38 $\pm$ 3.01	40.02 $\pm$ 3.11	64.37 $\pm$ 1.73
IV g	35.68 $\pm$ 2.37	68.79 $\pm$ 3.88	65.09 $\pm$ 1.43	49.76 $\pm$ 1.03	46.39 $\pm$ 3.09	49.33 $\pm$ 1.29
IV h	48.58 $\pm$ 1.57	68.91 $\pm$ 2.19	52.38 $\pm$ 1.51	48.33 $\pm$ 3.57	47.12 $\pm$ 2.33	64.44 $\pm$ 2.30
IV i	47.89 $\pm$ 2.16	32.77 $\pm$ 1.86	43.92 $\pm$ 1.19	47.41 $\pm$ 3.31	49.24 $\pm$ 1.18	71.22 $\pm$ 1.53
IV j	72.46 $\pm$ 2.03	92.34 $\pm$ 1.83	74.12 $\pm$ 1.33	68.34 $\pm$ 1.66	72.34 $\pm$ 1.56	>100
IV k	79.57 $\pm$ 3.08	62.33 $\pm$ 2.06	53.37 $\pm$ 0.73	69.34 $\pm$ 2.00	92.14 $\pm$ 2.98	>100
IV l	45.88 $\pm$ 1.39	43.72 $\pm$ 1.14	38.79 $\pm$ 0.97	46.11 $\pm$ 3.03	48.44 $\pm$ 1.12	69.32 $\pm$ 1.91
IV m	56.44 $\pm$ 2.47	64.36 $\pm$ 4.11	42.77 $\pm$ 1.02	48.29 $\pm$ 2.60	69.34 $\pm$ 1.38	88.34 $\pm$ 3.03
IV n	60.38 $\pm$ 0.93	82.36 $\pm$ 3.90	45.77 $\pm$ 1.13	62.17 $\pm$ 1.19	61.48 $\pm$ 2.06	72.91 $\pm$ 2.67
IV o	31.56 $\pm$ 1.63	61.01 $\pm$ 2.67	38.68 $\pm$ 0.71	44.39 $\pm$ 3.46	42.33 $\pm$ 0.67	>100
IV p	76.74 $\pm$ 1.39	>100	62.89 $\pm$ 0.59	>100	85.37 $\pm$ 1.94	>100
IV q	78.91 $\pm$ 3.65	89.34 $\pm$ 2.67	36.51 $\pm$ 1.97	79.31 $\pm$ 1.55	82.42 $\pm$ 2.87	83.09 $\pm$ 3.45
IV r	33.88 $\pm$ 1.32	32.21 $\pm$ 0.56	35.89 $\pm$ 1.31	41.06 $\pm$ 0.99	41.53 $\pm$ 1.88	>100
IV s	32.36 $\pm$ 1.49	64.98 $\pm$ 1.53	37.93 $\pm$ 0.21	42.88 $\pm$ 1.32	43.22 $\pm$ 1.78	>100
DHA	>100	>100	>100	>100	>100	>100
DHO	63.59 $\pm$ 0.82	>100	44.98 $\pm$ 0.13	>100	>100	80.84 $\pm$ 0.27
5-FU	32.89 $\pm$ 1.67	43.41 $\pm$ 0.88	48.45 $\pm$ 2.38	38.49 $\pm$ 3.08	49.77 $\pm$ 2.03	46.45 $\pm$ 1.91

由表 1 可以看出, 大部分目标化合物 IV a~IV s 的抗肿瘤活性相对母体化合物 (DHA 或 DHO) 有一定提高, 部分化合物活性优于阳性对照 5-FU。总体来说, 目标化合物 IV a~IV s 对 T-24、MCF-7 和 Hela 表现出较好的细胞毒性活性, 而对 HepG2 和 MGC-803 细胞毒性活性较弱。化合物 IV d 是所有测试化合物中对 T-24、MCF-7、MGC-803 和 Hela 细胞最有效的化合物, IC₅₀ 分别为(14.64 $\pm$ 0.46)、(35.74 $\pm$ 0.23)、(32.16 $\pm$ 1.82)和(21.67 $\pm$ 0.86) μ mol/L, 但对正常细胞 (LO₂) 毒性较低 [IC₅₀=(81.55 $\pm$ 1.73) μ mol/L]。

对于 T-24 细胞, 苯环上有吸电子基团 (—F、—Cl、—Br、—NO₂) 时, 2 位的取代活性比 3、4 位取代的活性好, 如化合物 IV a 活性明显优于 3、4 位取代的 IV b 和 IV c; 含卤素化合物中, 取代基与活性的关系为—Br>—Cl>—F, 化合物 IV d、IV f、IV o 和 IV s 抑制活性优于阳性对照。对于 MCF-7 和 Hela

细胞, 大部分目标化合物细胞毒性强于阳性对照, 苯环上连有一Br 时, 化合物活性相对较好, 连接—F 时活性较差。对于 HepG2 和 MGC-803 细胞只有个别化合物活性较好。

2.2 克隆形成实验结果分析

图 1 为化合物 IV d 抑制 T-24 细胞的增殖结果。

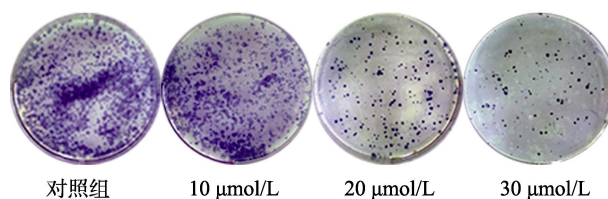


图 1 化合物 IV d 抑制 T-24 细胞的增殖结果

Fig. 1 Proliferation of T-24 cells inhibited by compound IV d

从图 1 可以看出, 持续作用 12 d 后, 化合物 IV d 对 T-24 细胞有较强的克隆形成抑制能力, 抑制作用随着给药浓度的增加而增强。与对照组相比, 10、

20、30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组的 IV d 均能抑制细胞的生长, 抑制克隆形成率分别为 18.67%、59.17%和 77.50%。

2.3 Hoechst-33258 染色结果分析

图 2 为化合物 IV d 处理 T-24 细胞 48 h 后细胞凋亡形态学的变化结果。

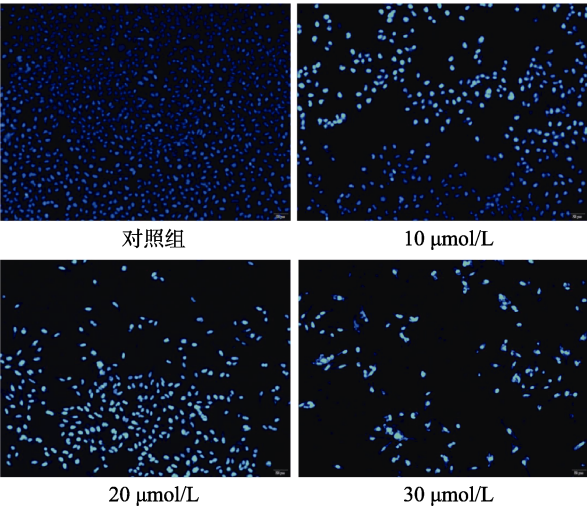


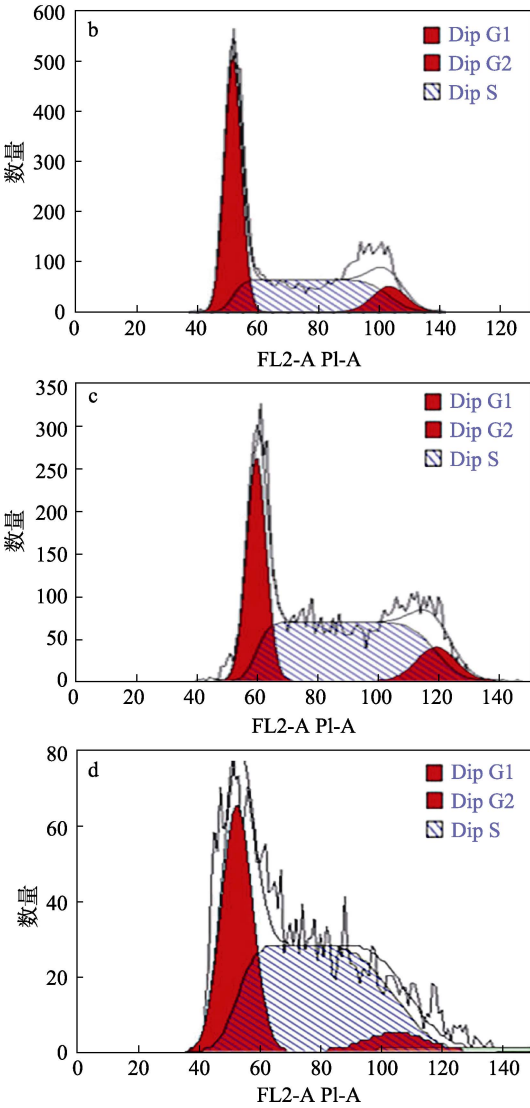
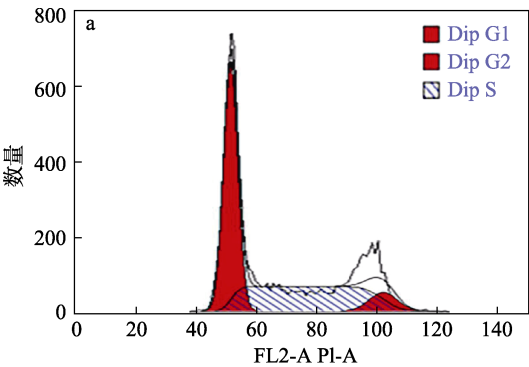
图 2 细胞凋亡形态学的变化
Fig. 2 Morphological change of apoptosis

从图 2 可以看出, 对照组细胞用 Hoechst-33258 染色具有圆形均匀的核, 呈现正常的蓝色荧光, 没有形态学改变; 而 IV d 处理的 T-24 肿瘤细胞部分表现出明亮的染色质浓缩和核碎裂, 这是细胞凋亡的标志。同时随着药物剂量的升高, 凋亡现象更明显, 表明化合物 IV d 能够诱导 T-24 肿瘤细胞的凋亡, 并呈现一定的剂量依赖性。

2.4 流式周期结果分析

用流式细胞仪分析化合物 IV d 对 T-24 细胞周期进程的影响, 结果见图 3 和表 2。

从图 3 和表 2 可以看出, 药物作用 48 h 后, 与对照组相比, 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组的 S 期细胞百分率由 41.92%最高升至 60.72%, G1 期细胞百分率由 50.47%最低降至 31.52%, G2 期细胞百分率变化不大。与未经处理的细胞 (对照组) 相比, 化合物 IV d 诱导细胞明显阻滞于 S 期。



a—对照组; b—10 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组; c—20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组; d—30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组; 横坐标代表流式上机时选用的通道

图 3 化合物 IV d 对 T-24 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of compound IV d on cell cycle of T-24 cells

表 2 不同组别不同周期的细胞百分率
Table 2 Percentage of cells in different groups and different cycles

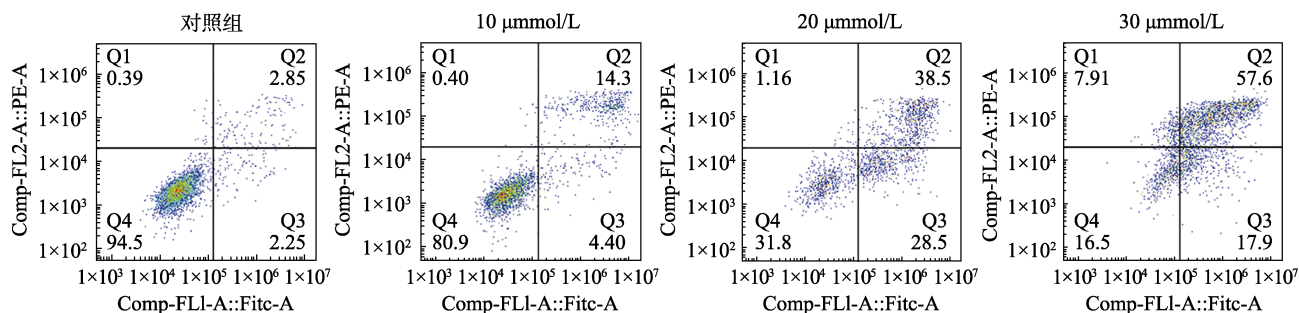
IV d 浓度/ $\mu\text{mol/L}$	各期细胞百分率/%		
	G1	G2	S
0 (对照组)	50.47	7.64	41.92
10	47.62	9.48	42.92
20	31.52	9.50	58.98
30	34.08	5.20	60.72

2.5 Annexin V-FITC 和 PI 染色结果分析

采用 Annexin V-FITC 和 PI 染色在流式细胞仪检测不同浓度的 IV d 处理 T-24 细胞后的凋亡实验, 结果见图 4 和表 3。

从图 4 和表 3 可以看出, 化合物 IV d 以浓度依赖的方式显著促进 T-24 细胞凋亡, 对照组、10、20、

30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组的细胞凋亡率分别为 5.11%、18.70%、65.00%和 75.50%。



横纵坐标代表流式上机时选用的通道; Q1 代表机械损伤的细胞; Q2 代表晚期凋亡和坏死的细胞; Q3 代表早期凋亡的细胞; Q4 代表正常细胞, 下同

图 4 化合物 IV d 对 T-24 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of compound IV d on apoptosis of T-24 cells

表 3 不同 IV d 浓度下不同状态的细胞比例

Table 3 Proportion of cells in different states at different IV d concentrations

IV d 浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	不同 IV d 浓度下不同状态的细胞比例/%				细胞 凋亡率/%
	Q1	Q2	Q3	Q4	
0 (对照组)	0.39	2.85	2.25	94.50	5.11
10	0.40	14.30	4.40	80.90	18.70
20	1.16	38.50	28.50	21.80	65.00
30	79.10	57.60	17.90	16.50	75.50

2.6 诱导 Bax/Bcl-2、Caspase 3、Caspase 9 的表达结果分析

图 5 和表 4 为不同浓度的 IV d 对 T-24 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase3 和 Caspase9 表达水平的影响。

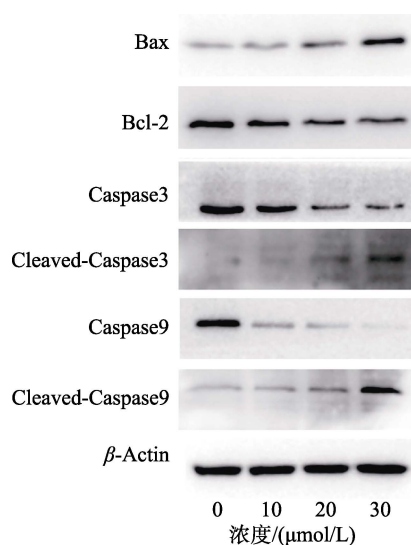


图 5 不同浓度的 IV d 对 T-24 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase3 和 Caspase9 表达水平的影响

Fig. 5 Effect of compound IV d with different concentrations on expression level of Bax, Bcl-2, Caspase3 and Caspase9 in T-24 cells

从图 5 和表 4 可以看出, 采用 Western blot 的方法检测 IV d 处理 48 h 后 T-24 中相关蛋白发生明显变化, 在线粒体通路中, 化合物 IV d 能够上调 T-24 细胞中 Bax、Cleaved Caspase3、Cleaved Caspase9 和下调 Bcl-2、Caspase3、Caspase9 的表达水平, 表明 IV d 能够通过内源性线粒体通路诱导 T-24 的凋亡, Bcl-2 家族蛋白和 Caspases 家族蛋白可能参与了诱导膀胱癌 T-24 细胞凋亡的过程。

表 4 不同 IV d 浓度下的相对蛋白表达量

Table 4 Relative protein expression at different IV d concentrations

蛋白质	相对蛋白表达量 (β -Actin)			
	0 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$
Bax	0.1133	0.1467	0.2987	0.9997
Bcl-2	0.9997	0.6890	0.4050	0.3243
Caspase3	0.9970	0.7346	0.1949	0.1632
Cleaved-Caspase3	0.0576	0.0924	0.1963	1.0649
Caspase9	0.9487	0.1364	0.0562	0.0295
Cleaved-Caspase9	0.1094	0.1575	0.2674	0.8656

3 结论

以去氢枞酸为原料, 经 LiAlH_4 还原得到去氢枞醇, 再与 ClSO_2NCO 原位反应并在磺胺末端引入抗肿瘤活性基团, 得到 19 个 *N*-(氨基磺酰基)氨基甲酸去氢枞醇酯类目标化合物 (IV a~IV s)。所有目标化合物的结构经 FTIR、NMR 和 ESI-MS 确证。

(1) 部分目标化合物抗肿瘤活性优于阳性药 5-FU, 其中 *N*-[(2-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯 (IV d) 对膀胱癌细胞株 T-24 的细胞毒性活性最好, $\text{IC}_{50}=(14.64\pm0.46) \mu\text{mol/L}$ 。

(2) 目标化合物 IV d 能明显诱导 T-24 阻滞于 S 期, 并通过线粒体介导的内源性 Caspase 途径诱导 T-24 的凋亡。

含有磺酰胺基团的氨基甲酸去氢枞醇酯衍生物可能是一类具有药用研究前景的小分子化合物。N-[(2-溴苯基)氨基磺酰基]氨基甲酸去氢枞醇酯有望成为一种抗肿瘤候选化合物, 但其抗肿瘤药效机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] SUNG H, FWELAY 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: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] COSTANTINO L, BARLOCCO D. Challenges in the design of multitarget drugs against multifactorial pathologies: A new life for medicinal chemistry[J]. Future Medicinal Chemistry, 2013, 5(1): 5-7.
- [3] GE J F (葛界芳), XIONG X Y (熊向源). Nanoscale drug delivery systems for multidrug resistance inhibition in cancer therapy[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(5): 989-999.
- [4] GUO M, JIN J, ZHAO D, *et al.* Research advances on anti-cancer natural products[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 866154.
- [5] GE J M, LIU Z, ZHONG Z C, *et al.* Natural terpenoids with anti-inflammatory activities: Potential leads for anti-inflammatory drug discovery[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 124: 105817.
- [6] CHABÁN M F, I ANTONIOU A, KARAGIANNI C, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel abietane diterpenoids with activity against staphylococcus aureus[J]. Future Medicinal Chemistry, 2019, 11(24): 3109-3124.
- [7] KIM E, KANG Y G, KIM Y J, *et al.* Dehydroabietic acid suppresses inflammatory response via suppression of Src-, Syk-, and TAK1-mediated pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(7): 1593.
- [8] TAO P, WU C Y, HAO J, *et al.* Antifungal application of rosin derivatives from renewable pine resin in crop protection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(14): 4144-4154.
- [9] KOVALEVA K S, YAROVAYA O I, SHEMAUKOV A V, *et al.* Synthesis of new heterocyclic dehydroabietylamine derivatives and the FTIR biological activity[J]. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2017, 53: 364-370.
- [10] LU Z (陆洲), LIU C X (刘超祥), YU X (余星), *et al.* Synthesis and anti-free radical activities of several novel derivatives of dehydroabietylamine[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry (有机化学), 2013, 33(3): 562-567.
- [11] WU D, LI X T, SHEN Q K, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid derivative as potent vasodilatory agents[J]. Bioorganic Chemistry, 2022, 129: 106110.
- [12] HUANG R Z, LIANG G B, HUANG X C, *et al.* Discovery of dehydroabietic acid sulfonamide based derivatives as selective matrix metalloproteinases inactivators that inhibit cell migration and proliferation[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 138: 979-992.
- [13] HOU W, LUO Z, ZHANG G, *et al.* Click chemistry-based synthesis and anticancer activity evaluation of novel C-14 1,2,3-triazole dehydroabietic acid hybrids[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 138: 1042-1052.
- [14] LI F Y (李芳耀), PANG F H (庞富华), MA X L (马献力). Synthesis of novel compounds containing acylhydrazyl sulfonamide moiety and the FTIR study of antitumor activity *in vitro*[J]. Acta Medicinæ Sinica (华夏医学), 2023, 36(4): 1-12.
- [15] SUN J C (孙金川), CAI L Q (蔡隆强), ZHU M J (朱明君), *et al.* Synthesis and cytotoxicity of dehydroabietinol derivatives bearing heterocycle[J]. Chemical Research and Application (化学研究与应用), 2022, 34(2): 357-365.
- [16] ZHU M J, SUN J C, WU Y J, *et al.* Synthesis and anti-proliferative activity of dehydroabietinol derivatives bearing a triazole moiety[J]. RSC Medicinal Chemistry, 2023, 14: 680-691.
- [17] GHOSH A K, BRINDISI M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2015, 58: 2895-2940.
- [18] WU Q C, ZENG J, DONG J F. Synthesis and antitumor activity of novel silibinin and 2,3-dehydrosilybin derivatives with carbamate groups[J]. Medicinal Chemistry Research, 2022, 31: 533-544.
- [19] CHEONG J E, ZAFFAGNI M, CHUNG I, *et al.* Synthesis and anticancer activity of novel water soluble benzimidazole carbamates[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 144: 372-385.
- [20] ZHOU W, WANG C P, LIU Z K, *et al.* Hypoxia-activated prodrugs with dual COX-2/CA inhibitory effects on attenuating cardiac inflammation under hypoxia[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 65(19): 13436-13451.
- [21] SISCO E, BARNES K L. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 1,3-oxazole sulfonamides as tubulin polymerization inhibitors[J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2021, 12(6): 1030-1037.
- [22] PANG P X (庞盼杏), NING R (宁蓉), ZHU C (祝创), *et al.* Synthesis and *in vitro* antitumor activity of matrine semicarbazide derivatives[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry (有机化学), 2023, 43(6): 2126-2135.
- [23] LI F Y, HUANG L, ZHOU X Q, *et al.* Synthesis and cytotoxicity evaluation of dehydroabietic acid derivatives bearing nitrate moiety[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2020, 40(9): 2845-2854.
- [24] NI C Y, WU Y J, RAN M, *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel dehydroabietic acid-dithiocarbamate hybrids as potential multitargeted compounds for tumor cytotoxicity[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15: 104145.
- [25] HUANG L, HUANG R, PANG F H, *et al.* Synthesis and biological evaluation of dehydroabietic acid-pyrimidine hybrids as antitumor agents[J]. RSC Advances, 2020, 10: 18008-18015.
- [26] WANG X, PANG F H, HUANG L, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel dehydroabietic acid-oxazolidinone hybrids for antitumor properties[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3116.
- [27] JIN Y Y (金源源), MAI J Y (麦静怡), PING J (平键), *et al.* Effects and mechanisms of atractylone on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells MHCC97-H[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology (中药研究与临床药理学), 2023, 34(10): 1370-1376.