

3-苯基-1*H*-吡唑拼接吲哚衍生物的 无催化剂合成及抗肺癌活性

杨 俊¹, 吴 迪¹, 黄冬燕¹, 梁光平¹, 刘雄伟²

(1. 遵义医药高等专科学校, 遵义 563006; 2. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

摘要 为寻找新型抗肺癌活性分子, 以 5-苯基-2,4-二氢-3*H*-吡唑-3-酮、苯甲醛和吲哚为原料, 通过一锅法反应合成了 21 个 3-苯基-1*H*-吡唑拼接吲哚衍生物, 其结构通过核磁共振氢谱(¹H NMR)、核磁共振碳谱(¹³C NMR)和高分辨率质谱(HRMS)表征. 通过体外抗肺癌活性筛选发现, 大多数目标化合物对肺癌 A549 细胞及 A549/DDP 细胞具有较好的抑制活性, 其中化合物 **4n** 对耐药株 A549/DDP 的半效抑制浓度[IC₅₀=(0.085±0.003) μmol/L]是阳性对照顺铂的 29 倍. 机制研究结果表明, 化合物 **4n** 能够阻滞 A549/DDP 细胞 G₀/G₁ 期, 并诱导细胞发生凋亡; 分子对接结果表明, 其抗肿瘤活性可能与 AKt1, Tubulin 及 P-gp 等靶点有关. 化合物 **4n** 可作为后续优化与深入机制研究的抗肺癌候选化合物.

关键词 吲哚; 吡唑; 衍生物; 抗肺癌活性

中图分类号 O626; R914.5

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20260134

Catalyst-free Synthesis and Anti-lung Cancer Activity of 3-Phenyl-1*H*-pyrazole-indole Hybrid Derivatives

YANG Jun¹, WU Di¹, HUANG Dongyan¹, LIANG Guangping^{1*}, LIU Xiongwei^{2*}

(1. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi 563006, China;

2. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract In order to discover novel anti-lung cancer agents, a series of 21 novel 3-phenyl-1*H*-pyrazole-indole hybrid derivatives was designed and synthesized *via* a one-pot reaction employing 5-phenyl-2,4-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one, benzaldehyde, and indole as starting materials. All synthesized compounds were characterized by means of ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. *In vitro* anti-lung cancer activity screening revealed that most of the target compounds exhibited potent inhibitory effects against both the A549 cell line and the A549/DDP cell line. Notably, compound **4n** demonstrated exceptional activity against the resistant A549/DDP cells, with an IC₅₀ value of (0.085±0.003) μmol/L, which was 29-fold than the positive control cisplatin. Mechanistic studies indicated that compound **4n** significantly arrested the cell cycle of A549/DDP cells at the G₀/G₁ phase and induced apoptosis. Molecular docking results suggested that its antitumor activity may be associated with interactions involving multiple targets, including AKt1, tubulin, and P-gp. Compound **4n** represents a promising anti-lung cancer lead candidate for subsequent structural optimization and comprehensive mechanistic investigation.

收稿日期: 2026-03-31. 网络首发日期: 2026-05-14.

联系人简介: 梁光平, 男, 博士, 教授, 主要从事中药化学成分方面的研究. E-mail: 746641572@qq.com

刘雄伟, 女, 博士, 副教授, 主要从事中药药效物质基础方面的研究. E-mail: ashevy0819@163.com

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金(批准号: gzwkj[2026]134)、遵义市科技合作计划(批准号: [2025]238, CXZX[2025]6, KCTD[2025]90)和遵义医药高等专科学校科研团队建设项目(批准号: [2026]02, [2026]03)资助.

Supported by the Science and Technology Fund of Guizhou Provincial Health Commission, China(No. gzwkj[2026]134), the Science and Technology Project of Zunyi City, China(Nos. [2025]238, CXZX[2025]6, KCTD[2025]90) and the Scientific Research Team Project of Zunyi Medical and Pharmaceutical College, China(Nos. [2026]02, [2026]03).

Keywords Indole; Pyrazole; Derivative; Anti-lung cancer activity

肺癌是全球发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一,严重威胁人类的健康^[1],尽管程序性死亡受体-1(PD-1)/程序性死亡配体-1(PD-L1)抑制剂等免疫检查点抑制剂,以及小分子酪氨酸激酶抑制剂在不断发展,但是作用靶点的突变、高昂的治疗费用和耐药性等问题的出现严重影响了临床应用^[2-4],亟需开发出多作用靶点、高效的抗肺癌耐药药物,同时还需兼顾原料便宜易得及合成过程简单,以便降低生产成本.芳基取代吡唑活性骨架广泛存在于抗肿瘤活性分子中,如克唑替尼(Crizotinib)是一种间变性淋巴瘤激酶(ALK)及间质-上皮细胞转化因子(c-Met)抑制剂,低微摩尔浓度下能够在体外抑制A549细胞的活性^[5-7];化合物Hu7691是一种可口服给药的选择性蛋白激酶B(Akt)抑制剂,能在低微摩尔浓度下抑制A549细胞的活性,由于其具有良好的安全性及药代动力学参数,现已进入临床试验阶段^[8];拉泽替尼(Lazertinib)是一种口服的第三代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI),临床上用于治疗非小细胞肺癌患者^[9](图1).

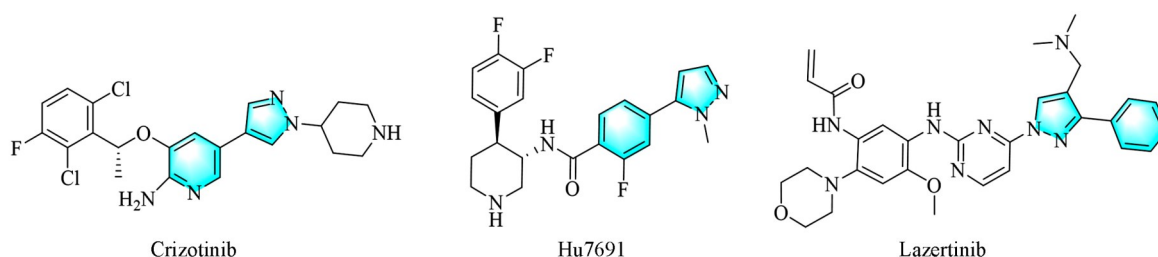


Fig. 1 Anti-lung cancer agents containing an aryl-substituted pyrazole scaffold

化合物AT13148是一种口服有效的AGC激酶(cAMP依赖性蛋白激酶、cGMP依赖性蛋白激酶和蛋白激酶C)抑制剂,具有芳基取代吡唑结构,能抑制Akt1/Akt2/Akt3、Rho相关蛋白激酶1/2(ROCK1/2)、cAMP依赖性蛋白激酶A(PKA)和核糖体蛋白S6激酶 β -1(p70S6K)的活性,具有良好的抗转移及抗增殖活性,但是在临床实体瘤的研究中发现该化合物的治疗指数狭窄及药代动力学参数不佳,所以其临床研究已终止^[10]. Sabizabulin是一种口服生物利用度高的微管蛋白(Tubulin)抑制剂^[11],2023年进入雌激素受体阳性、人表皮生长因子受体2阴性(ER+HER2-)的转移性乳腺癌II期临床试验(NCT05079360).为进一步发掘芳基取代吡唑类抗肺癌药物,本文设计合成了3-苯基-1*H*-吡唑并咪唑衍生物,并评价了其体外抗肺癌活性,主要以AT13148的骨架结构为基础,通过改变苯环取代吡唑活性骨架的链接位置、活性羟基的取代位置,同时受Sabizabulin结构启发引入咪唑活性片段,希望提高其生物利用度并增加微管蛋白作用靶点.通过上述结构改造,所得目标化合物对A549细胞、耐药株A549/DDP细胞的最佳抑制活性可达到纳摩尔浓度(图2).

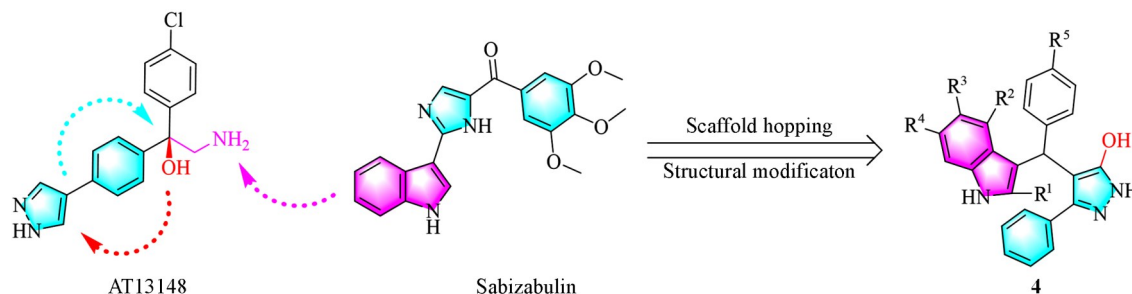


Fig. 2 Design strategy of target compounds

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

5-苯基-2,4-二氢-3*H*-吡唑-3-酮、苯甲醛、对硝基苯甲醛、5-甲基咪唑、6-氟咪唑和2-苯基咪唑等,

纯度 98%, 上海麦克林生化科技有限公司; 吡啶橙染色试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基(iCell-0001), 赛百慷(上海)生物技术股份有限公司; A549 细胞(人非小细胞肺癌细胞株)和 A549/DDP 细胞(人肺腺癌耐顺铂细胞株), 中国科学院上海细胞库; 其它化学试剂为市售分析纯。

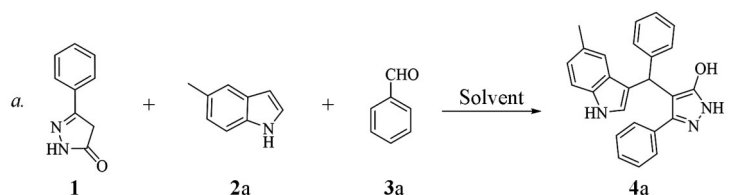
Waters Xevo G2-S QTOF 型高分辨质谱仪, 美国 Waters 公司; NIB610-FL 型倒置荧光显微镜, 宁波永新光学股份有限公司; CytoFLEX S 型流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; 5424R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; Bruker Avance Neo 400 MHz 型核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司。

1.2 实验过程

1.2.1 目标化合物的合成 首先进行了反应条件的优化。分别称取 10.6 mg(0.1 mmol) 苯甲醛、13.1 mg(0.1 mmol) 5-甲基吲哚和 16.0 mg(0.1 mmol) 5-苯基-2,4-二氢-3H-吡唑-3-酮置于反应管中, 分别加入 2 mL 相应溶剂后, 在对应的温度下进行反应(见表 1)。用薄层色谱法(TLC)检测反应完全后, 经硅胶柱层析得到 3-苯基-1H-吡唑并吲哚衍生物 4a。

Table 1 Optimization of reaction conditions^a

Entry	Solvent	Temperature/°C	Time/h	Yield(%)
1	H ₂ O	60	12	0
2	CH ₃ CN	60	12	16
3	CH ₃ OH	60	6	30
4	EtOH	60	6	45
5	EtOAc	60	6	41
6	DCM	60	6	80
7	Toluene	60	12	10
8	DCM	40	8	20
9	DCM	80	4	47
10 ^b	DCM	60	6	79
11 ^c	DCM	60	6	52



b. $n(5\text{-Phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one}):n(5\text{-methylindole}):n(\text{benzaldehyde})=1:2:1$; c. $n(5\text{-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one}):n(5\text{-methylindole}):n(\text{benzaldehyde})=1:1:2$.

在最优反应条件下进行了底物拓展实验。以化合物 4a 为例, 分别称取 42.4 mg(0.4 mmol) 苯甲醛、52.4 mg(0.4 mmol) 5-甲基吲哚和 64.0 mg(0.4 mmol) 5-苯基-2,4-二氢-3H-吡唑-3-酮置于反应管中, 加入 4 mL 二氯甲烷后于 60 °C 反应, 用 TLC 检测反应完全(展开剂二氯甲烷/甲醇体积比为 20:1), 经硅胶柱层析(展开剂二氯甲烷/甲醇体积比为 40:1)得到 3-苯基-1H-吡唑并吲哚衍生物(4a)。

(4-((5-Methyl-1H-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1H-pyrazol-5-ol (4a), 红色固体, m. p. 235.8~236.3 °C, 产率为 80%。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ : 11.78(s, 1H), 10.66(s, 1H), 7.47~7.39(m, 2H), 7.37(d, $J=8.1$ Hz, 3H), 7.27(d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.25~7.17(m, 3H), 7.13(t, $J=7.2$ Hz, 1H), 6.90(s, 1H), 6.83(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.78(s, 1H), 5.45(s, 1H), 2.22(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ : 159.84, 144.48, 140.28, 134.63, 132.88, 130.93, 129.29, 128.67, 128.59, 128.34, 128.02, 127.81, 127.76, 126.97, 126.45, 125.56, 124.05, 122.33, 117.98, 116.39, 111.13, 104.25, 36.79, 21.32; HRMS(C₂₅H₂₁N₃NaO 计算值), m/z : 402.1573 (402.1582) [M+Na]⁺。

参照化合物 4a 的合成方法, 即反应物的投料比例、反应温度和反应溶剂一致, 制备了化合物 4b~4u^[12], 相关谱图见本文支持信息图 S1~S63。

4-((2-Methyl-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4b**), 红色固体, m. p. 151.2~151.9 °C, 产率为71%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.77(s, 1H), 10.60(s, 1H), 7.43~7.33(m, 3H), 7.32~7.25(m, 2H), 7.27~7.18(m, 4H), 7.20~7.11(m, 2H), 6.92(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 6.92~6.83(m, 1H), 6.67(t, *J*=7.2 Hz, 1H), 5.56(s, 1H), 1.85(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.4, 144.22, 141.4, 135.33, 132.62, 129.05, 128.93, 128.70, 128.38, 128.20, 128.10, 125.98, 119.94, 119.13, 118.16, 112.78, 110.50, 103.61, 37.05, 12.45; HRMS(C₂₅H₂₁N₃NaO 计算值), *m/z*: 402.1585(402.1582)[*M*+Na]⁺.

4-((6-Methyl-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4c**), 红色固体, m. p. 231.5~231.9 °C, 产率为82%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.85(s, 1H), 10.63(s, 1H), 7.44~7.38(m, 2H), 7.40~7.33(m, 2H), 7.30~7.23(m, 2H), 7.25~7.16(m, 3H), 7.14~7.11(m, 2H), 6.88(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 6.85(dd, *J*=2.5, 1.0 Hz, 1H), 6.66(dd, *J*=8.2, 1.5 Hz, 1H), 5.45(s, 1H), 2.34(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.33, 144.96, 140.73, 137.22, 131.35, 130.17, 129.13, 129.05, 128.85, 128.46, 128.22, 126.02, 125.20, 123.75, 120.44, 118.63, 117.26, 111.69, 104.61, 37.44, 21.81; HRMS(C₂₅H₂₂N₃O 计算值), *m/z*: 380.1764(380.1763)[*M*+H]⁺.

4-((6-Fluoro-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4d**), 红色固体, m. p. 220.6~221.2 °C, 产率为61%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.79(s, 1H), 10.86(s, 1H), 7.42(d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.40~7.32(m, 3H), 7.33~7.26(m, 2H), 7.23(t, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.15(d, *J*=7.2 Hz, 1H), 7.13~7.06(m, 1H), 6.94(dd, *J*=8.7, 5.5 Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 6.73~6.64(m, 1H), 5.45(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.30, 157.98, 144.69, 136.67, 136.54, 131.27, 129.14, 128.84, 128.49, 128.33, 128.22, 126.18, 125.05, 125.02, 124.04, 119.81, 119.70, 117.71, 107.20, 106.96, 104.25, 97.94, 97.68, 37.50; HRMS(C₂₄H₁₉FN₃O 计算值), *m/z*: 384.1513(384.1512)[*M*+H]⁺.

4-((5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4e**), 红色固体, m. p. 171.1~171.8 °C, 产率为75%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.78(s, 1H), 10.63(s, 1H), 7.49~7.41(m, 2H), 7.39(d, *J*=7.2 Hz, 3H), 7.34(d, *J*=7.3 Hz, 2H), 7.29~7.18(m, 3H), 7.15(t, *J*=7.2 Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 6.66(dd, *J*=8.7, 2.5 Hz, 1H), 6.43(d, *J*=2.5 Hz, 1H), 5.43(s, 1H), 3.52(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.35, 153.17, 144.81, 140.83, 131.84, 131.35, 129.17, 128.84, 128.51, 128.30, 128.26, 127.52, 126.10, 124.95, 117.30, 112.48, 111.03, 104.51, 100.76, 37.36; HRMS(C₂₅H₂₂N₃O₂ 计算值), *m/z*: 396.1709(396.1712)[*M*+H]⁺.

4-((6-(Benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4f**), 红色固体, m. p. 133.2~134.0 °C, 产率为95%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.76(s, 1H), 10.60(s, 1H), 7.47~7.40(m, 3H), 7.43~7.33(m, 6H), 7.34~7.25(m, 3H), 7.21(t, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.13(t, *J*=7.2 Hz, 1H), 6.92(d, *J*=2.3 Hz, 1H), 6.88(d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.78(d, *J*=1.4 Hz, 1H), 6.59(dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.44(s, 1H), 5.08(s, 2H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.35, 154.81, 144.93, 138.18, 137.40, 131.34, 129.13, 128.85, 128.47, 128.23, 128.08, 127.96, 126.07, 123.28, 121.91, 119.49, 117.45, 109.44, 104.55, 96.50, 69.98, 37.54; HRMS(C₃₁H₂₆N₃O₂ 计算值), *m/z*: 472.2028(472.2025)[*M*+H]⁺.

4-((5-Bromo-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(**4g**), 白色固体, m. p. 241.1~241.6 °C, 产率为73%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.81(s, 1H), 11.02(s, 1H), 7.47~7.23(m, 10H), 7.21~7.05(m, 3H), 6.98~6.87(m, 1H), 5.44(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.31, 144.42, 135.50, 131.21, 129.18, 128.97, 128.85, 128.57, 128.43, 128.25, 126.30, 126.03, 123.63, 121.18, 117.38, 113.96, 111.27, 104.07, 37.42; HRMS(C₂₄H₁₉BrN₃O 计算值), *m/z*: 444.0710(444.0711)[*M*+H]⁺.

4-((4-Fluoro-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4h), 白色固体, m. p. 210.1~210.8 °C, 产率为64%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.76(s, 1H), 11.13(s, 1H), 7.45~7.37(m, 2H), 7.40~7.32(m, 3H), 7.21~7.15(m, 5H), 7.14~7.06(m, 2H), 7.02~6.92(m, 1H), 6.58(dd, *J*=11.4, 7.8 Hz, 1H), 5.73(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 158.07, 155.64, 145.50, 139.61, 139.49, 131.31, 129.06, 128.54, 128.42, 128.14, 125.86, 125.39, 121.77, 121.70, 116.01, 115.97, 115.70, 108.47, 108.44, 104.95, 104.02, 103.83, 37.72; HRMS(C₂₄H₁₉FN₃O 计算值), *m/z*: 384.1515(384.1512)[*M*+*H*]⁺.

4-((5-Chloro-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4i), 白色固体, m. p. 239.2~239.8 °C, 产率为74%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.81(s, 1H), 11.01(s, 1H), 7.48~7.40(m, 2H), 7.43~7.33(m, 4H), 7.36~7.30(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.26(t, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.21~7.14(m, 1H), 7.01(dd, *J*=8.5, 2.1 Hz, 1H), 6.94(dd, *J*=7.6, 1.8 Hz, 2H), 5.44(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.30, 144.46, 135.29, 131.22, 129.18, 128.85, 128.56, 128.42, 128.23, 126.29, 126.22, 123.24, 121.11, 118.13, 117.45, 113.47, 104.06, 37.44; HRMS(C₂₄H₁₉ClN₃O 计算值), *m/z*: 400.1218(400.1217)[*M*+*H*]⁺.

4-((6-Chloro-1*H*-indol-3-yl)(phenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4j), 红色固体, m. p. 249.4~250.1 °C, 产率为92%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.79(s, 1H), 10.95(s, 1H), 7.45~7.40(m, 2H), 7.40~7.35(m, 4H), 7.31~7.27(m, 2H), 7.24(t, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.17~7.13(m, 1H), 6.99~6.93(m, 2H), 6.85(dd, *J*=8.5, 1.9 Hz, 1H), 5.47(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.33, 144.60, 140.82, 137.19, 131.22, 129.16, 128.83, 128.53, 128.36, 128.22, 126.23, 126.02, 125.97, 125.61, 120.20, 119.01, 117.83, 111.53, 104.18, 37.42; HRMS(C₂₄H₁₉ClN₃O 计算值), *m/z*: 400.1216(400.1217)[*M*+*H*]⁺.

4-((4-Nitrophenyl)(2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4k), 黄色固体, m. p. 168.7~169.3 °C, 产率为93%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.92(s, 1H), 11.41(s, 1H), 8.13(d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.75(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.43~7.35(m, 3H), 7.33~7.26(m, 5H), 7.18~7.04(m, 6H), 6.91~6.82(m, 1H), 5.66(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 159.99, 153.58, 146.09, 136.88, 135.98, 133.04, 130.00, 129.03, 128.88, 128.72, 128.17, 128.11, 127.58, 123.64, 121.80, 119.15, 113.00, 111.63, 103.03, 38.00; HRMS(C₃₀H₂₃N₄O₃ 计算值), *m/z*: 487.1764(487.1770)[*M*+*H*]⁺.

4-((5-Methyl-1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4l), 黄色固体, m. p. 212.1~212.7 °C, 产率为84%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.88(s, 1H), 10.84(s, 1H), 8.10(d, *J*=8.9 Hz, 2H), 7.48~7.40(m, 4H), 7.41~7.34(m, 3H), 7.27(d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.01(d, *J*=2.4 Hz, 1H), 6.88(dd, *J*=8.3, 1.7 Hz, 1H), 6.84(s, 1H), 5.59(s, 1H), 2.24(s, 3H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.25, 152.94, 146.06, 135.21, 131.01, 130.00, 129.24, 128.66, 128.21, 127.40, 127.07, 124.98, 123.48, 123.13, 118.25, 115.39, 111.83, 103.57, 37.27, 21.74; HRMS(C₂₅H₂₁N₄O₃ 计算值), *m/z*: 425.1617(425.1614)[*M*+*H*]⁺.

4-((4-Bromophenyl)(2-phenyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4m), 红色固体, m. p. 150.8~151.2 °C, 产率为81%. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ: 11.87(s, 1H), 11.31(s, 1H), 7.71(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.41(d, *J*=8.2 Hz, 2H), 7.36(d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.33~7.25(m, 5H), 7.18~7.02(m, 8H), 6.83(t, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.53(s, 1H); ¹³C NMR(DMSO-*d*₆, 101 MHz), δ: 160.15, 144.60, 136.82, 135.63, 133.19, 131.13, 131.01, 130.83, 128.93, 128.83, 128.64, 128.35, 128.05, 127.93, 127.59, 122.15, 121.61, 119.03, 118.87, 113.82, 111.46, 103.50, 37.26; HRMS(C₃₀H₂₂BrN₃NaO 计算值), *m/z*: 542.0840(542.0844)[*M*+*Na*]⁺.

4-((4-Bromophenyl)(5-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4n), 红色固体,

m. p. 234.7~235.3 °C, 产率为63%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.80(s, 1H), 10.73(s, 1H), 7.47~7.33(m, 7H), 7.23(d, J =8.2 Hz, 1H), 7.17(d, J =8.5 Hz, 2H), 6.96~6.91(m, 1H), 6.85(dd, J =8.2, 1.6 Hz, 1H), 6.80(s, 1H), 5.43(s, 1H), 2.23(s, 3H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 160.27, 144.30, 140.71, 135.16, 131.07, 131.03, 129.19, 128.56, 128.22, 127.22, 127.13, 124.69, 122.95, 119.06, 118.35, 116.19, 111.71, 104.22, 36.73, 21.78; HRMS($\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}$ 计算值), m/z : 458.0866(458.0868)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((5-Bromo-1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4o), 黄色固体, m. p. 224.1~224.6 °C, 产率为64%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.92(s, 1H), 11.18(s, 1H), 8.12(d, J =8.8 Hz, 2H), 7.50~7.32(m, 8H), 7.22~7.12(m, 2H), 7.07~7.02(m, 1H), 5.60(s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 152.42, 146.20, 135.58, 130.06, 129.26, 128.71, 128.64, 128.20, 126.49, 123.97, 123.60, 121.08, 115.96, 114.16, 111.61, 103.00, 37.25; HRMS($\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{BrN}_4\text{O}_3$ 计算值), m/z : 489.0565(489.0562)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((6-(Benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4p), 白色固体, m. p. 189.2~189.7 °C, 产率为88%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.88(s, 1H), 10.76(s, 1H), 8.08(d, J =8.8 Hz, 2H), 7.47~7.35(m, 11H), 7.33~7.29(m, 1H), 6.97~6.84(m, 3H), 6.62(dd, J =8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.56(s, 1H), 5.09(s, 2H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 155.00, 152.90, 146.06, 138.13, 137.51, 130.05, 129.23, 128.87, 128.63, 128.15, 128.11, 127.98, 123.74, 123.45, 121.46, 119.38, 115.96, 109.81, 103.37, 96.61, 69.96, 37.46; HRMS($\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$ 计算值), m/z : 517.1876(517.1876)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((6-(Benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)(4-bromophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4q), 红色固体, m. p. 174.4~175.1 °C, 产率为83%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.81(s, 1H), 10.66(s, 1H), 7.48~7.33(m, 11H), 7.34~7.26(m, 1H), 7.17(d, J =8.6 Hz, 2H), 6.93(d, J =2.3 Hz, 1H), 6.88(d, J =8.6 Hz, 1H), 6.81(dd, J =2.4, 1.1 Hz, 1H), 6.60(dd, J =8.7, 2.3 Hz, 1H), 5.40(s, 1H), 5.08(s, 2H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 154.89, 144.27, 138.15, 137.45, 131.13, 131.02, 129.18, 128.86, 128.53, 128.17, 128.10, 127.97, 123.44, 121.66, 119.45, 119.09, 116.77, 109.60, 104.02, 96.54, 69.97, 36.98; HRMS($\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$ 计算值), m/z : 550.1123(550.1130)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((6-Chloro-1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4r), 黄色固体, m. p. 202.6~203.2 °C, 产率为61%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.91(s, 1H), 11.10(s, 1H), 8.10(d, J =8.9 Hz, 2H), 7.46~7.40(m, 5H), 7.40~7.34(m, 3H), 7.07~7.01(m, 2H), 6.89(dd, J =8.5, 1.9 Hz, 1H), 5.60(s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 152.51, 146.16, 137.27, 130.04, 129.25, 128.68, 128.17, 126.32, 126.08, 125.61, 123.56, 120.14, 119.35, 116.37, 111.72, 103.04, 37.31; HRMS($\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClN}_4\text{O}_3$ 计算值), m/z : 445.1068(445.1067)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((4-Bromophenyl)(6-chloro-1*H*-indol-3-yl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4s), 红色固体, m. p. 181.2~182.1 °C, 产率为89%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.84(s, 1H), 11.01(s, 1H), 7.45~7.32(m, 8H), 7.18(d, J =8.5 Hz, 2H), 7.03~6.96(m, 2H), 6.87(dd, J =8.5, 1.9 Hz, 1H), 5.43(s, 1H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 143.94, 137.23, 131.16, 131.08, 129.21, 128.58, 128.17, 126.14, 125.77, 120.19, 119.26, 119.15, 117.17, 111.60, 103.66, 36.86; HRMS($\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{BrClN}_3\text{O}$ 计算值), m/z : 478.0320(478.0322)[$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-((5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)(4-nitrophenyl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol(4t), 黄色固体, m. p. 153.6~154.1 °C, 产率为78%. ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.90(s, 1H), 10.80(s, 1H), 8.12(d, J =8.9 Hz, 2H), 7.51~7.37(m, 7H), 7.27(d, J =8.8 Hz, 1H), 7.00(d, J =2.5 Hz, 1H), 6.71(dd, J =8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.52(d, J =2.5 Hz, 1H), 5.58(s, 1H), 3.55(s, 3H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 153.46, 152.86, 146.10, 131.89, 130.98, 130.02, 129.26, 128.67, 128.21, 127.20,

125.38, 123.51, 115.88, 112.73, 111.38, 103.45, 100.63, 55.57, 37.28; HRMS ($C_{25}H_{21}N_4O_4$ 计算值), m/z : 441.1565(441.1563) $[M+H]^+$.

4-((4-Bromophenyl)(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)methyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-ol (4u), 红色固体, m. p. 144.1~144.7 °C, 产率为 77%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz), δ : 11.81(s, 1H), 10.70(s, 1H), 7.47~7.37(m, 7H), 7.23(d, $J=7.8$ Hz, 3H), 6.96~6.88(m, 1H), 6.68(dd, $J=8.7, 2.5$ Hz, 1H), 6.46(d, $J=2.5$ Hz, 1H), 5.41(s, 1H), 3.54(s, 3H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz), δ : 153.29, 144.18, 131.87, 131.09, 129.21, 128.57, 128.21, 127.34, 125.10, 119.13, 116.66, 112.59, 111.16, 104.05, 100.71, 55.53, 36.78; HRMS ($C_{25}H_{21}BrN_3O_2$ 计算值), m/z : 474.0807(474.0817) $[M+H]^+$.

1.2.2 目标化合物的体外抗肺癌活性筛选 参照文献[13]方法, 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法对化合物 4a~4u 进行了体外抗增殖活性测试. 实验用细胞选取非耐药株 A549 细胞和耐药株 A549/DDP 细胞, 经胰酶消化后计数, 将约 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔加入 100 μ L 培养基, 待测化合物的给药最终浓度为 0, 0.01, 0.1, 1, 10 和 100 μ mol/L, 每个浓度设置 3 个复孔, 于 37 °C 培养 72 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 继续孵育 0.5 h, 用酶标仪于 450 nm 测定吸光度, 平行实验 3 次.

1.2.3 AO/EB 双荧光染色法检测化合物 4n 对 A549/DDP 细胞形态的影响 在 96 孔板中每孔接种约 1×10^5 个 A549/DDP 细胞, 化合物 4n 给药浓度分别为 0, 0.05 和 0.10 μ mol/L, 作用时间为 72 h, 采用吖啶橙(AO)/溴化乙锭(EB)双荧光染色法进行检测^[14]. AO/EB 双荧光染色工作液新鲜配制, AO 和 EB 的终浓度为 10 μ g/mL, 避光室温下孵育 6 min 后, 用荧光显微镜观察并拍照记录.

1.2.4 细胞周期检测 采用 PI 染色法检测了化合物 4n (0, 0.05, 0.10 μ mol/L) 对 A549/DDP 细胞周期的影响^[13]. 于 6 孔板中每孔接种约 5×10^5 个 A549/DDP 细胞, 给药作用 72 h 后, 用 70% (体积分数) 乙醇于 4 °C 固定 12 h, 用 10 μ L RNase (1 mg/mL) 孵育 15 min, 最后每孔加入 10 μ L 400 μ g/mL 碘化丙啶 (PI) 溶液, 于 4 °C 避光染色 15 min, 用流式细胞仪检测, 平行实验 3 次.

1.2.5 细胞凋亡检测 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测了化合物 4n (0, 0.05, 0.10 μ mol/L) 能否诱导 A549/DDP 细胞发生凋亡^[13]. 于 6 孔板中每孔接种约 5×10^5 个 A549/DDP 细胞, 给药作用 72 h 后, 使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒进行检测, 最后用流式细胞仪检测, 平行实验 3 次.

1.2.6 细胞划痕实验 采用细胞划痕实验检测了化合物 4n (0, 0.05, 0.10 μ mol/L) 对 A549/DDP 细胞迁移的抑制作用^[15]. 于 6 孔板中每孔接种约 1×10^6 个 A549/DDP 细胞, 给药后分别在 24 和 48 h 时采集图像, 使用 Image J 软件分析划痕面积, 平行实验 3 次.

1.2.7 作用靶点预测及分子对接 使用 ChemDraw 软件绘制化合物 4n 的 2D 结构, Chem3D 绘制化合物 4n 的 3D 结构; 在 PDB (<https://www.rcsb.org>) 数据库中检索并下载相关蛋白 AKt1 (PDB: 3CQW)^[16], AKt2 (PDB: 2JDR)^[17], ROCK1 (PDB: 6E9W)^[18], ROCK2 (PDB: 6ED6)^[18], PKA (PDB: 6E9L)^[18], p70S6K (PDB: 3A62)^[19], Tubulin (PDB: 1SA0)^[20] 和 P-糖蛋白 (P-gp) (PDB: 7O9W)^[21]; 分子对接采用 Schrödinger 软件相关模块进行^[22,23], 导出最终对接结果后, 使用 PyMOL 3.1 软件处理优化分子对接图.

1.2.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 软件绘制相关图形, 用 SPSS 软件统计分析及处理相关数据, 具体方法参见文献[13]. 本文活性研究数据与文献[24]均来自同一批次实验, 除空白组和阳性对照组数据为共用外, 其它实验组的数据均为独立测定所得.

2 结果与讨论

2.1 目标化合物的合成

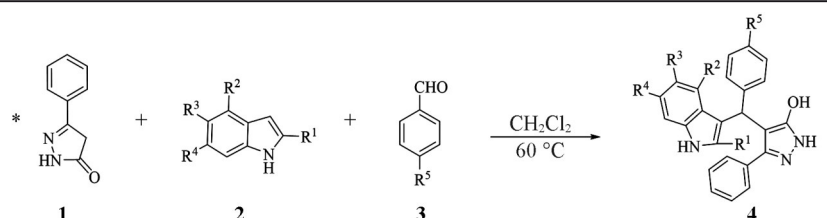
对目标化合物的反应条件进行了优化, 结果列于表 1. 首先, 考察了不同反应溶剂对产率的影响 (表 1 中 Entries 1~7), 当以二氯甲烷为溶剂时, 化合物 4a 的产率最高达到 80% (表 1 中 Entry 6); 增加或者降低反应溶剂的极性, 产率均降低, 因此确定最佳反应溶剂为二氯甲烷. 随后, 考察了温度对该反应的影响 (表 1 中 Entries 6, 8 和 9), 当反应温度降低至 40 °C 时, 反应时间延长且产率降低; 当反应温度升高至 80 °C, 虽然反应时间缩短, 但是产率降低, 因此确定最佳反应温度为 60 °C. 最后, 考察了反应

物投料比的影响,结果表明通过改变投料比未能提高产率.综上所述,确定了最佳反应条件:反应物料液比为1:1:1(摩尔比),以二氯甲烷为溶剂于60 °C下反应.

在最佳反应条件下对该反应的普适性进行了研究.通过改变吡啶及苯甲醛上的取代基团,分别与5-苯基-2,4-二氢-3H-吡唑-3-酮反应(表2),得到21个3-苯基-1H-吡唑并吡啶衍生物(化合物4b~4u),产率61%~95%.可见,该反应具有较好的普适性,能够较好地进行底物拓展,同时具有较高的产率、无需添加任何催化剂且原料便宜易得等优点.

Table 2 Scope of the substrates*

Compd.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Yield(%)
4a	H	H	CH ₃	H	H	80
4b	CH ₃	H	H	H	H	71
4c	H	H	H	CH ₃	H	82
4d	H	H	H	F	H	61
4e	H	H	OCH ₃	H	H	75
4f	H	H	H	OCH ₂ C ₆ H ₅	H	95
4g	H	H	Br	H	H	73
4h	H	F	H	H	H	64
4i	H	H	Cl	H	H	74
4j	H	H	H	Cl	H	92
4k	C ₆ H ₅	H	H	H	NO ₂	93
4l	H	H	CH ₃	H	NO ₂	84
4m	C ₆ H ₅	H	H	H	Br	81
4n	H	H	CH ₃	H	Br	63
4o	H	H	Br	H	NO ₂	64
4p	H	H	H	OCH ₂ C ₆ H ₅	NO ₂	88
4q	H	H	H	OCH ₂ C ₆ H ₅	Br	83
4r	H	H	H	Cl	NO ₂	61
4s	H	H	H	Cl	Br	89
4t	H	H	OCH ₃	H	NO ₂	78
4u	H	H	OCH ₃	H	Br	77



2.2 目标化合物的体外抗肿瘤活性

化合物4a~4u对非耐药株A549细胞及耐药株A549/DDP细胞的抑制活性列于表3.可见,化合物4m, 4t和4r等16个化合物对A549细胞的抑制活性优于阳性对照药物顺铂,其中化合物4m[IC₅₀=(0.057±0.002) μmol/L]的活性是阳性对照顺铂[IC₅₀=(1.480±0.008) μmol/L]的26倍;化合物4n, 4s和4g等20个化合物对耐药株A549/DDP细胞的抑制活性优于阳性对照药物顺铂,其中化合物4n[IC₅₀=(0.085±0.003) μmol/L]的活性是阳性对照顺铂[IC₅₀=(2.496±0.117) μmol/L]的29倍;化合物4n, 4s和4k等6个化合物对耐药株A549/DDP细胞具有较好的选择性,RF值均低于0.2.

构效关系分析结果表明,当R³为吸电子取代基时(化合物4g和4i),能够提高对A549/DDP细胞的抑制活性,而R³为给电子基团(化合物4a和4e)时,可降低对A549/DDP细胞的抑制活性;当R⁴为吸电子取代基时(化合物4d和4j),能够提高对A549/DDP细胞的抑制活性,而R⁴为给电子基团(化合物4c和4f)时,可降低对A549/DDP细胞的抑制活性;当R⁴为苄氧基取代,R⁵为吸电子取代基(化合物4p和4q)时,能够提高对A549/DDP细胞的抑制活性.为确保该类化合物在后期研发成药物时能够扩大适应症范围,需要兼顾对A549和A549/DDP细胞均具有良好的抑制活性,通过筛选发现化合物4n, 4t和4m

Table 3 Anti-proliferation activities of compound 4a~4u against A549 and A549/DDP cell lines

Compd.	IC ₅₀ ^a /(μmol·L ⁻¹)		
	A549	A549/DDP	RF ^b
4a	0.494±0.007	0.335±0.004	0.68
4b	4.807±0.052	1.057±0.042	0.22
4c	0.450±0.005	3.815±0.051	8.48
4d	1.006±0.010	0.429±0.015	0.43
4e	0.555±0.001	0.172±0.004	0.31
4f	1.325±0.015	2.482±0.071	1.87
4g	1.717±0.045	0.035±0.001	0.02
4h	0.752±0.006	2.129±0.027	2.83
4i	0.155±0.004	0.137±0.003	0.89
4j	3.512±0.033	0.265±0.014	0.08
4k	2.812±0.008	0.038±0.001	0.01
4l	0.499±0.005	0.239±0.006	0.48
4m	0.057±0.002	0.074±0.002	1.30
4n	0.443±0.011	0.085±0.003	0.19
4o	0.445±0.011	0.153±0.004	0.35
4p	0.490±0.004	0.442±0.004	0.90
4q	4.701±0.111	0.048±0.001	0.01
4r	0.102±0.002	0.500±0.009	4.90
4s	0.664±0.005	0.027±0.001	0.04
4t	0.099±0.001	0.083±0.007	0.84
4u	0.447±0.013	0.288±0.006	0.64
Cisplatin	1.480±0.008	2.496±0.117	1.69

a. Data are expressed as mean IC₅₀±SD(μmol/L, n=3); b. RF was computed as IC₅₀(A549/DDP)/IC₅₀(A549).

符合要求,同时还期望得到对耐药细胞株选择性良好的化合物,所以选择三者中对耐药株 A549/DDP 细胞具有较好选择性的化合物 4n 开展后续机制研究.

2.3 AO/EB 双荧光染色结果

图 3 示出了化合物 4n 作用于 A549/DDP 细胞后的 AO/EB 双荧光染色结果.可见,随着给药浓度的

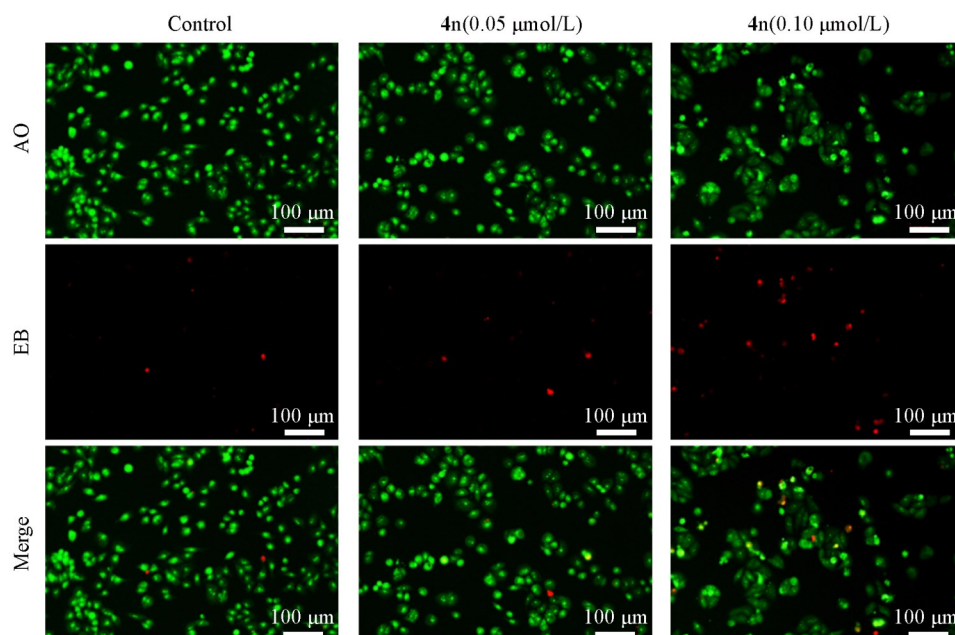


Fig. 3 Effects of compound 4n(0, 0.05 and 0.10 μmol/L) on A549/DDP cells as determined by AO/EB dual-fluorescence staining assay

增加, 呈现红色荧光的 A549/DDP 细胞逐渐增多, 呈现绿色荧光的 A549/DDP 细胞不断减少, 同时其细胞核固缩或呈串珠状. 以上结果表明, 化合物 4n 能够诱导 A549/DDP 细胞发生凋亡.

2.4 阻滞 A549/DDP 细胞 G_0/G_1 期

图 4 示出了化合物 4n (0, 0.05, 0.10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 A549/DDP 细胞后的细胞周期. 可见, 处于 G_0/G_1 期的细胞比例分别为 $51.48\% \pm 0.93\%$, $57.26\% \pm 0.82\%$ 和 $67.38\% \pm 1.83\%$, 化合物 4n 给药浓度为 0.05 和 0.10 $\mu\text{mol/L}$ 时均能显著地阻滞 G_0/G_1 期, 且呈浓度正相关 ($P < 0.05$); 处于 S 期的 A549/DDP 细胞比例显著减少, 呈浓度负相关 ($P < 0.05$); 处于 G_2/M 期的 A549/DDP 细胞比例相较于空白组先增加后减少 ($P < 0.05$). 由此可见, 化合物 4n 主要通过阻滞 A549/DDP 细胞的 G_0/G_1 期来发挥其抗肿瘤活性.

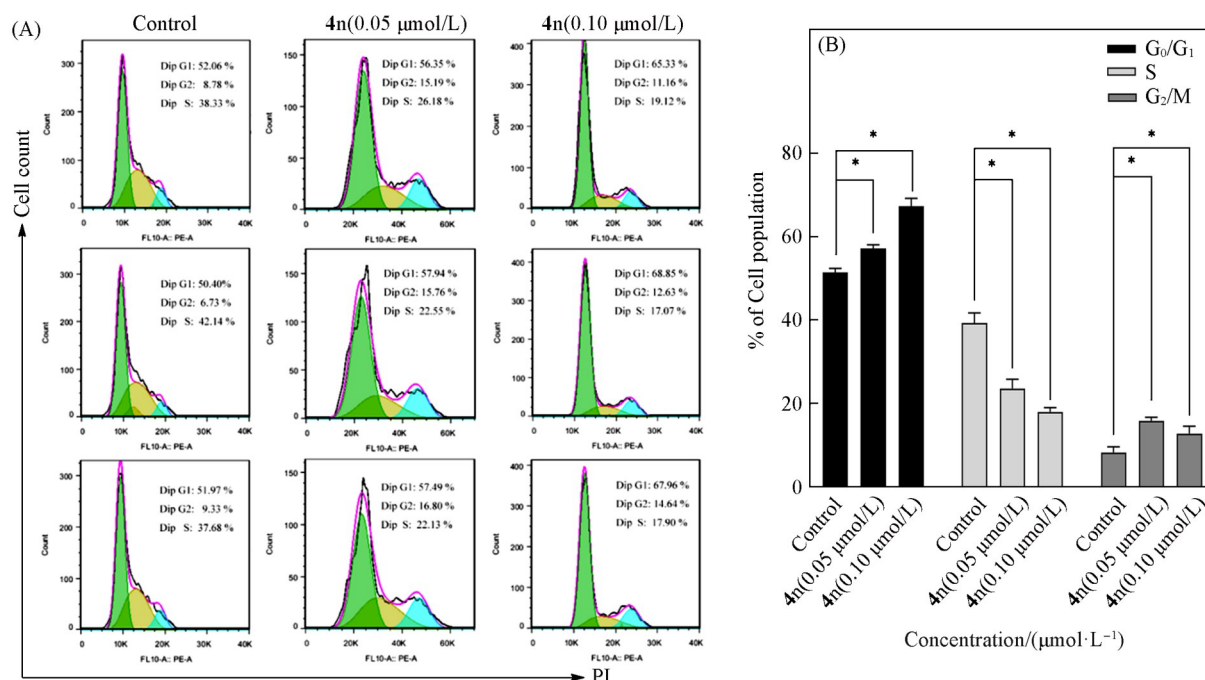


Fig. 4 Cell cycle distribution analysis of compound 4n(0, 0.05 and 0.10 $\mu\text{mol/L}$) on A549/DDP cells

(A) Cell cycle distribution of A549/DDP cells was analyzed by PI staining and flow cytometry;

(B) quantitative representation of cell cycle distribution results ($n=3$; * $P < 0.05$, vs. Control).

2.5 细胞凋亡检测

图 5 示出了化合物 4n (0, 0.05, 0.10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 A549/DDP 细胞后, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测的凋亡结果. 可见, 凋亡晚期细胞比例分别为 $1.75\% \pm 0.27\%$, $7.37\% \pm 0.10\%$ 和 $10.75\% \pm 0.44\%$, 凋亡早期细胞比例分别为 $2.03\% \pm 0.64\%$, $21.29\% \pm 0.76\%$ 和 $35.25\% \pm 1.12\%$, 总凋亡细胞比例分别为 $3.78\% \pm 0.46\%$, $28.66\% \pm 0.75\%$ 和 $46.00\% \pm 1.55\%$; 相较于空白组, 化合物 4n 能够显著地诱导 A549/DDP 细胞发生早调和晚调, 且与给药浓度呈正相关 ($P < 0.001$). 这与 AO/EB 双荧光染色结果及 CCK-8 检测结果基本一致, 表明化合物 4n 可诱导 A549/DDP 细胞发生凋亡而发挥抑制活性.

2.6 细胞划痕实验结果

图 6 示出了细胞划痕实验结果. 可见, 化合物 4n (0, 0.05, 0.10 $\mu\text{mol/L}$) 给药 24 h 后 A549/DDP 细胞的相对划痕愈合率分别为 $73.46\% \pm 2.11\%$, $66.48\% \pm 3.23\%$ 和 $35.07\% \pm 2.99\%$. 化合物 4n 在低浓度时, 对 A549/DDP 细胞划痕愈合能力抑制作用不强 ($P < 0.05$), 随着给药浓度增加, 其抑制能力显著提高, 抑制能力最强是空白组的 2.1 倍 ($P < 0.001$); 随着作用时间增长, 划痕伤口在不断愈合, 给药时间达 48 h 时, 空白组的相对划痕愈合率可恢复至 $90.32\% \pm 0.96\%$, 而低浓度组 ($81.66\% \pm 1.38\%$) 及高浓度组 ($61.05\% \pm 1.63\%$) 均能显著抑制 A549/DDP 细胞的划痕愈合能力 ($P < 0.001$). 综上, 化合物 4n 呈现剂量正相关抑制 A549/DDP 细胞的划痕愈合能力, 将来可能在实体瘤治疗中发挥抑制肿瘤扩散及转移的作用.

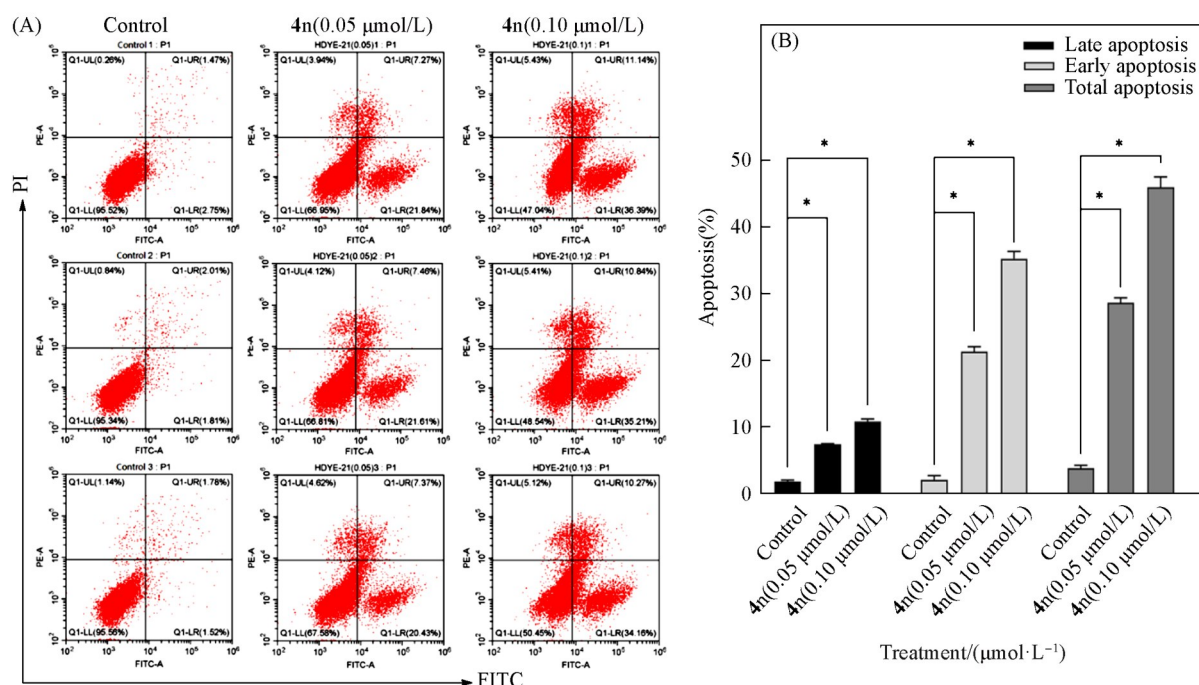


Fig. 5 Apoptosis was induced in A549/DDP cells by compound 4n(0, 0.05 and 0.10 μmol/L) in a dose-dependent manner

(A) Annexin V/PI double staining and flow cytometry were performed to detect apoptosis in A549/DDP cells; (B) quantitative representation of apoptosis rate ($n=3$, $^*P<0.001$, *vs.* Control).

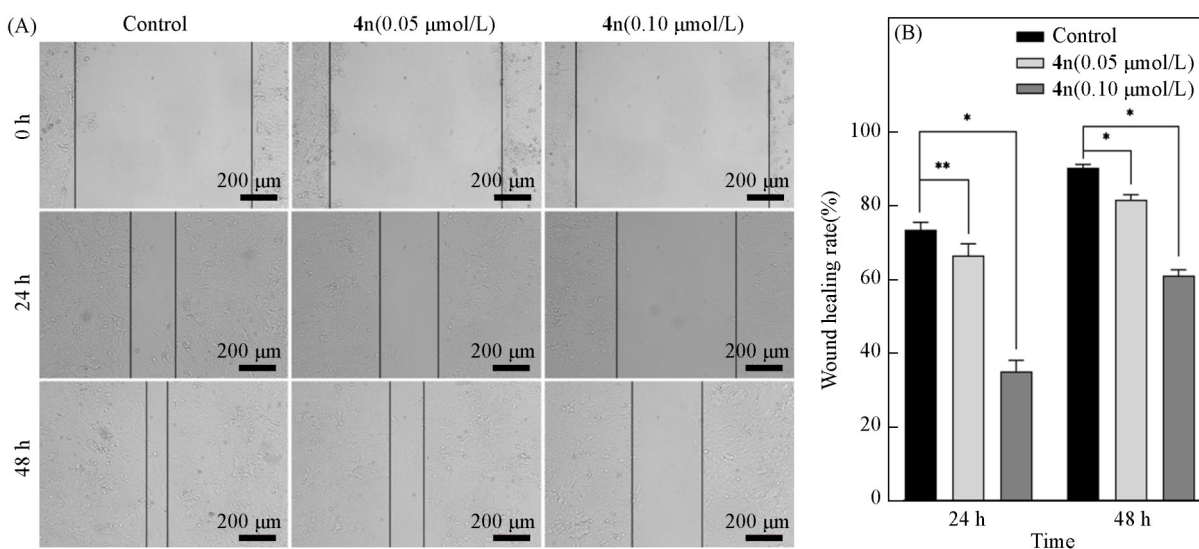


Fig. 6 Compound 4n(0, 0.05 and 0.10 μmol/L) inhibits the migration of A549/DDP cells in a dose-dependent manner

(A) Wound healing assay results; (B) quantitative representation of wound healing rate ($n=3$, $^*P<0.001$, *vs.* Control; $^{**}P<0.05$, *vs.* Control).

2.7 分子对接结果

为进一步探究化合物 4n 潜在的作用靶点, 基于化合物 AT13148 和 Sabizabulin 已知的作用靶点进行筛选. 将化合物 4n 分别与 AKt1(PDB: 3CQW), AKt2(PDB: 2JDR), ROCK1(PDB: 6E9W), ROCK2(PDB: 6ED6), PKA(PDB: 6E9L), p70S6K(PDB: 3A62)和 Tubulin(PDB: 1SA0)进行了分子对接研究; 同时, 为进一步探究其抗耐药机制, 将化合物 4n 与 P-gp(PDB: 7O9W)进行了分子对接. 结果表明, 化

合物 **4n** 与 AKt2, ROCK1, ROCK2, PKA 和 p70S6K 的对接结果不佳, 但与 AKt1, Tubulin 和 P-gp 能够很好地结合. 化合物 **4n** 通过其结构中吡啶环上的氨基、吡唑环上的氨基及羟基分别与 AKt1 的 LEU-156, GLU-278 和 THR-291 氨基酸残基形成氢键, 对接分数为-7.01; 还通过其结构上的羟基与 Tubulin 的 SER-178 和 THR-179 氨基酸残基形成氢键, 同时其吡啶环的氨基与 THR-179 氨基酸残基形成氢键, 对接分数为-8.02; 此外, 化合物 **4n** 可插入 P-gp 的空腔结构中, 通过其结构上的羟基与 GLN-725 氨基酸残基形成氢键, 对接分数为-8.42. 综上所述, 化合物 **4n** 可能通过抑制 AKt1 和 Tubulin, 从而发挥抗肺癌活性, 同时还可能通过抑制 P-gp 来减少药物外泵出细胞外, 提高其细胞内的浓度, 逆转 A549/DDP 细胞的耐药能力, 这有待进一步实验验证.

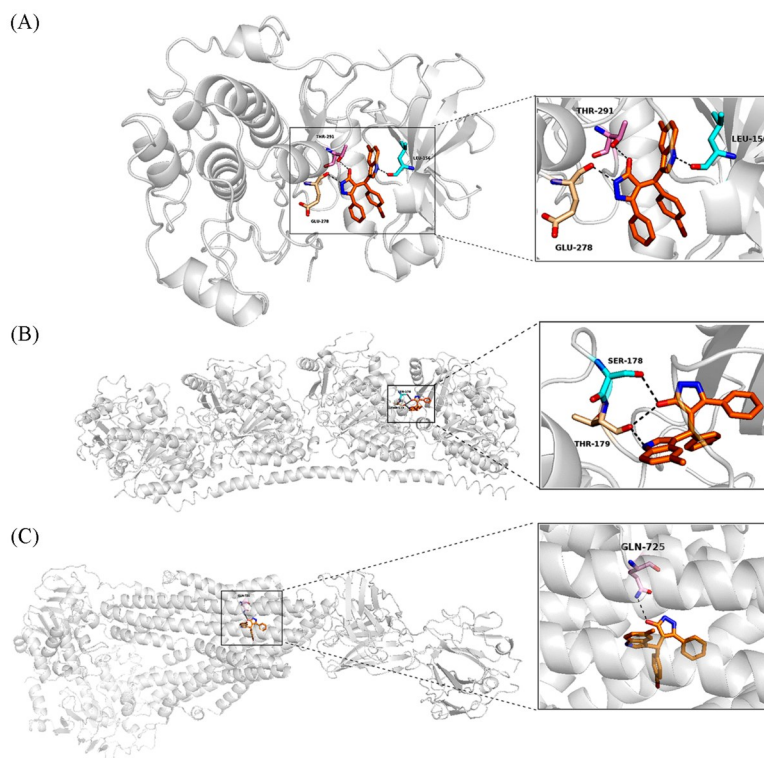


Fig. 7 Molecular docking results of compound **4n**

(A) Molecular docking compound **4n** with AKt1(PDB: 3CQW); (B) molecular docking compound **4n** with Tubulin(PDB: 1SA0);
(C) molecular docking compound **4n** with P-gp(PDB: 7O9W).

3 结 论

以 5-苯基-2,4-二氢-3H-吡唑-3-酮、苯甲醛和吡啶为原料, 通过一锅法反应合成了 21 个 3-苯基-1H-吡唑并吡啶衍生物, 成功将 AT13148 的活性骨架结构进行跃迁并引入 Sabizabulin 的吡啶活性片段. 通过体外抗肺癌活性筛选发现, 大多数目标化合物对非耐药株 A549 细胞及耐药株 A549/DDP 细胞具有较好的抑制活性, 且部分化合物具有较好的选择性, 其中化合物 **4m** [$IC_{50}=(0.057\pm0.002)\mu\text{mol/L}$] 对 A549 细胞的活性是阳性对照顺铂的 26 倍; 化合物 **4n** [$IC_{50}=(0.085\pm0.003)\mu\text{mol/L}$] 对耐药株 A549/DDP 的活性是阳性对照顺铂的 29 倍. 机制研究结果表明, 化合物 **4n** 可能通过诱导 A549/DDP 细胞发生凋亡、阻滞细胞 G_0/G_1 期、抑制 A549/DDP 细胞的划痕愈合能力来发挥抗肺癌活性. 后续可将化合物 **4n** 作为抗肺癌候选化合物, 进一步验证其作用机制, 并开展体内抗肺癌活性研究, 有望开发成为高效抗肺癌耐药剂, 具有一定的经济价值和开发前景.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/cjcu20160134>.

参 考 文 献

- [1] Siegel R. L., Kratzer T. B., Giaquinto A. N., Sung H., Jemal A., *CA Cancer. J. Clin.*, **2025**, 75(1), 10—45
- [2] Su P. L., Furuya N., Asrar A., Rolfo C., Li Z. H., Carbone D. P., He K., *J. Hematol. Oncol.*, **2025**, 18(1), 35
- [3] Carbone M., Amos C., Attanoos R. L., Boeri M., Bueno R., Bunn P. A., Chirieac L. R., Cooper B., Fennell D., Galateau-Salle F., Giannakou L., Goparaju C. V., Hassan R., Hofman P., Kris M. G., Mao W. M., Minaai M., Mitsudomi T., Molina T. J., Montuenga L. M., Nabeshima K., Passaro A., Peters S., Rajan A., Richardson D. B., Robbins H., Rolfo C., Rudin C. M., Samet J. M., Scherpereel A., Schrump D. S., Sozzi G., Taioli E., Visonà S. D., Yang H. N., Yoshikawa Y., Zhao A., Pass H. I., *J. Thorac. Oncol.*, **2026**, 21(1), 41—76
- [4] Zhai X. Q., Zhang Z. K., Chen Y. X., Wu Y. M., Zhen C., Liu Y., Lin Y. Y., Chen C., *J. Hematol. Oncol.*, **2025**, 18(1), 37
- [5] Lei H. R., Jiang N., Miao X. Q., Xing L. Y., Guo M., Liu Y., Xu H. W., Gong P., Zuo D. Y., Zhai X., *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, 171, 297—309
- [6] Christensen J. G., Zou H. Y., Arango M. E., Li Q. H., Lee J. H., McDonnell S. R., Yamazaki S., Alton G. R., Mroczkowski B., Los G., *Mol. Cancer. Ther.*, **2007**, 6(12), 3314—3322
- [7] Zou H. Y., Li Q. H., Lee J. H., Arango M. E., McDonnell S. R., Yamazaki S., Koudriakova T. B., Alton G., Cui J. J., Kung P. P., Nambu M. D., Los G., Bender S. L., Mroczkowski B., Christensen J. G., *Cancer. Res.*, **2007**, 67(9), 4408—4417
- [8] Che J. X., Dai X. Y., Gao J., Sheng H. C., Zhan W. H., Lu Y., Li D., Gao Z. Z., Jin Z. G., Chen B. H., Luo P. H., Yang B., Hu Y. Z., He Q. J., Weng Q. J., Dong X. W., *J. Med. Chem.*, **2021**, 64(16), 12163—12180
- [9] Yun J., Hong M. H., Kim S. Y., Park C. W., Kim S., Yun M. R., Kang H. N., Pyo K. H., Lee S. S., Koh J. S., Song H. J., Kim D. K., Lee Y. S., Oh S. W., Choi S., Kim H. R., Cho B. C., *Clin. Cancer Res.*, **2019**, 25(8), 2575—2587
- [10] McLeod R., Kumar R., Papadatos-Pastos D., Mateo J., Brown J. S., Garces A. H. I., Ruddell R., Decordova S., Jueliger S., Ferraldeschi R., Maiques O., Sanz-Moreno V., Jones P., Traub S., Halbert G., Mellor S., Swales K. E., Raynaud F. I., Garrett M. D., Banerji U., *Clin. Cancer Res.*, **2020**, 26(18), 4777—4784
- [11] Wang Q. H., Arnst K. E., Wang Y. X., Kumar G., Ma D. J., White S. W., Miller D. D., Li W. M., Li W., *J. Med. Chem.*, **2019**, 62(14), 6734—6750
- [12] Yang J., Chen Y., Lei L. D., Liang G. P., Zhuo J. R., *3-Phenyl-1H-pyrazole-indole Hybrid Derivatives, Preparation Method Therefor and Application thereof*, CN 2026103583616, 2026-3-23(杨俊, 陈圆, 雷丽荻, 梁光平, 卓俊睿. 一类3-苯基-1H-吡唑-5-醇拼接吲哚衍生物及其制备方法及应用, CN 2026103583616, 2026-3-23)
- [13] Yang J., Liang G. P., Liu X. L., *Synthetic Commun.*, **2023**, 53(3), 262—273
- [14] Yin Z. G., Liu X. W., Wang H. J., Zhang M., Liu X. L., Zhou Y., *New J. Chem.*, **2022**, 46(3), 1295—1307
- [15] Wang B. C., Shi T., Jia S. L., Wang E. Y., Ruan X. Q., Sheng C. Q., Wu S. C., Zhou Q. F., *J. Med. Chem.*, **2025**, 68(2), 1300—1315
- [16] Lippa B., Pan G. H., Corbett M., Li C., Kauffman G. S., Pandit J., Robinson S., Wei L. Q., Kozina E., Marr E. S., Borzillo G., Knauth E., Barbacci-Tobin E. G., Vincent P., Troutman M., Baker D., Rajamohan F., Kakar S., Clark T., Morris J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18(11), 3359—3363
- [17] Davies T. G., Verdonk M. L., Graham B., Saalau-Bethell S., Hamlett C. C. F., McHardy T., Collins I., Garrett M. D., Workman P., Woodhead S. J., Jhoti H., Barford D., *J. Mol. Biol.*, **2007**, 367(3), 882—894
- [18] Hobson A. D., Judge R. A., Aguirre A. L., Brown B. S., Cui Y. F., Ding P., Dominguez E., DiGiammarino E., Egan D. A., Freiberg C. M., Gopalakrishnan S. M., Harris C. M., Honore M. P., Kage K. L., Kapecki N. J., Ling C., Ma J. L., Mack H., Mamo M., Maurus S., McRae B., Moore N. S., Mueller B. K., Mueller R., Namovic M. T., Patel K., Pratt S. D., Putman C. B., Queeney K. L., Sarris K. K., Schaffter L. M., Stoll V. S., Vasudevan A., Wang L., Wang L., Wirthl W., Yach K., *J. Med. Chem.*, **2018**, 61(24), 11074—11100
- [19] Sunami T., Byrne N., Diehl R. E., Funabashi K., Hall D. L., Ikuta M., Patel S. B., Shipman J. M., Smith R. F., Takahashi I., Zugay-Murphy J., Iwasawa Y., Lumb K. J., Munshi S. K., Sharma S., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(7), 4587—4594
- [20] Ravelli R. B. G., Gigant B., Curmi P. A., Jourdain I., Lachkar S., Sobel A., Knossow M., *Nature*, **2004**, 428(6979), 198—202
- [21] Urgaonkar S., Nosol K., Said A. M., Nasief N. N., Bu Y. H., Locher K. P., Lau J. Y. N., Smolinski M. P., *J. Med. Chem.*, **2022**, 65(1), 191—216
- [22] Zhang H. Y., Peng J. M., Zhong Y. H., Chen Y., Wang Q., Hadiatullah H., Xie W. B., Xiong L. X., Yuchi Z. G., Liu J. B., Li Y. X., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2024**, 40(1), 96—108
- [23] Zhang L., Chen Y. Q., Li W. H., *Chem. Res. Chinese Universities.*, **2025**, 41(1), 146—154
- [24] Yang J., Huang D. Y., Liang G. P., Liu X. L., *Chem. J. Chinese Universities*, **2026**, 47(7), 20260072(杨俊, 黄东燕, 梁光平, 刘雄利. 高等学校化学学报, **2026**, 47(7), 20260072)

(Ed.: L, F, K)