

(E)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)尿苷/脱氧尿苷的合成及细胞毒性评价

张晓辉^a 闫德峰^a 马克东^a 赫玲爽^a
高瑞琦^a 徐耀忠^b 李德鹏^{*,a}

(^a 大连大学环境与化学工程学院 大连 116622)

(^b 开放大学生命健康和化学科学学院 英国)

摘要 以尿苷(**1a**)或 2'-脱氧尿苷(**1b**)类化合物为原料, 经碘代、选择性氧化、Heck 反应等步骤快捷、环保地合成(E)-5-(2-溴乙烯基)尿苷/(E)-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**5a/5b**), 再通过酯化、硫羰基化、氨解等步骤合成新化合物(E)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)尿苷/(E)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**8a/8b**), 共得到 5 种新的硫代产物, 其中包含 2 种新产物 **8a/8b**, 3 种新中间体 **7a**, **7b**, **10**. 其结构通过 ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, UV, HRMS, X-Ray 等谱图手段进行了表征. 采用 3-(4,5-二甲基-2-噁唑基)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑(MTT)实验方法对 **8a** 及其类似物进行了细胞毒性评价, 发现 **8a/8b** 是潜在的抗肿瘤药物.

关键词 (E)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)尿苷; (E)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷; 合成; 细胞毒性

Synthesis of (E)-4-Thio-5-(2-bromovinyl)uridine/Deoxyuridine and Its Characterization and Cytotoxicity

Zhang, Xiaohui^a Yan, Defeng^a Ma, Kedong^a He, Lingshuang^a
Gao, Ruiqi^a Xu, Yaozhong^b Li, Depeng^{*,a}

(^a College of Environment and Chemical Engineering, Dalian University, Dalian 116622)

(^b Department of Life, Health and Chemical Sciences, the Open University, UK)

Abstract (E)-4-Thio-5-(2-brominevinyl)uridine/2'-deoxyuridine (**8a/8b**) were efficiently synthesized in an environmental friendly way from uridine/2'-deoxyuridine (**1a/1b**) that were first transformed to (E)-(2-brominevinyl)uridine/ 2'-deoxyuridine (**5a/5b**) via iodination, selective oxidation, and Heck reaction steps. The resulting products **5a/5b** were then converted to the targets **8a/8b** through esterification, thio-reaction of carbonyl, and hydrolysis steps. Two new compounds **8a/8b** and three new intermediates **7a**, **7b**, **10** were obtained, and their structures have been fully characterized by ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, UV, HR-MS and X-Ray. The study of **8a** and their derivatives regarding cytotoxicity was carried out by using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) experiment method, and the initial findings suggest that (E)-4-thio-5-(2-brominevinyl)uridine/2'-deoxyuridine (**8a/8b**) would be potential antitumor drugs.

Keywords (E)-4-thio-5-(2-bromovinyl)-uridine; (E)-4-thio-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine; synthesis; cytotoxicity

5-取代胸苷类似物作为抗肿瘤和抗病毒药物已被广泛用于临床^[1], 例如 5-氟脱氧尿苷(FdU)、5-溴脱氧尿苷(BrdU)、5-碘脱氧尿苷(IdU), 它们可用作抗肿瘤药物和潜在的增敏剂以增强肿瘤细胞对射线的灵敏度^[2,3]. 研究发现 4-硫代核苷类似物对紫外线更敏感, 可作为潜在抗肿瘤药物, 尤其是与近紫外光(UVA)结合后可用于

治疗皮肤癌^[4,5]. 这一性质可能来源于光交叉偶联反应和 DNA-蛋白质交叉偶联反应^[6]. 4-硫代核苷类似物具有与天然核苷相类似的结构, 但其对紫外吸收有很大不同. 胸苷最大吸收波长在 270 nm, 而 4-硫胸苷在 340 nm 有最大吸收^[4]. 因此, 徐耀忠和 Karran 等^[7]提出一种新的光化学治疗方法, 即紫外光辅助 4-硫胸苷疗法. 由于

* E-mail: lidpeng@dlu.edu.cn, yandefeng1991@sina.com

Received May 16, 2016; revised July 8, 2016; published online August 12, 2016.

Project Supported by the Science and Technology Project of Liaoning Provincial Department of Education (No. L2013472), the Science-technology Plan Projects of Dalian Government (No. 2014E12SF074), the Science-technology Plan Projects of Dalian Jinzhou New Area Government (No. KJCX-ZTPY-2014-0009).

辽宁省教育厅科技(No. L2013472)、大连市科技计划(No. 2014E12SF074)、大连市金州新区科技计划(No. KJCX-ZTP2014-0009)资助项目.

硫代胸苷与天然胸苷结构相似,故同样可以进入癌细胞的 DNA 中,癌细胞的特性就是在人体内很快地自我复制增长,所以 4-硫胸苷类似物会在癌变组织大量聚集,通过特定波长 UVA 照射并相互作用达到损伤快速繁殖的癌细胞的 DNA 的作用,选择性地杀死癌细胞,同时对正常细胞没有毒害^[7]. 实验证明,低能量紫外线对人体正常的细胞影响很小,因此可减少患者在治疗中的痛苦. 另外,硫代嘧啶碱基在亲脂性方面,比传统的嘧啶核苷有一定的提高. 鉴于硫代核苷的独特优势,合成更多具有生物活性的抗癌药物成为当今的发展趋势.

我们课题组^[8-10]前期工作发现,4-硫-5-卤代尿苷和 4-硫-5-(2-咪唑基/噻吩基)尿苷等 4-硫胸苷类衍生物均具有良好的生物活性. 推测(*E*)-4-硫-(2-溴乙烯基)尿苷(4-SBVU, **8a**)类似物存在相似甚至更好的生物活性,因此对化合物 **8a** 及其类似物进行了合成.

在已有的文献^[11]报道中, (*E*)-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**5b**)的合成使用到醋酸汞. 2013 年联合国环境规划署“汞条约外交会议”《水俣公约》商定,2020 年将禁止生产、进口和出口添汞的产品,所以汞类物质必须要被替代. 2008 年,王春娟等^[12]未使用醋酸汞合成了化合物 **5b**,但是使用了对人体和环境危害性很大的多聚甲醛,并且耗时很长. 而本文避免使用危害性很大的汞类物质和多聚甲醛,并减少了反应时间,达到了真正意义上的环保、快捷. 合成路线如 Scheme 1 所示. 对化合物 **8a** 及其类似物又进行了细胞毒性评价,最终获得了比较满意的研究结果.

1 结果与讨论

1.1 (*E*)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**8a**)、(*E*)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**8b**)及其类似物的合成

由于碘是较好的离去基团,2014 年我们课题组^[10]报道了在尿苷的 5-位上进行碘代,再与 2-(三丁基锡烷基)咪唑/噻吩反应,在 5-位上快捷简便地引入了咪唑/噻吩基团. 基于此方法设计了一条化合物 **8a** 类似物的全新合成路线. 本文从尿苷(**1a**)出发,在其 5-位碘代生成了 5-碘尿苷(**2a**),在醋酸钡、三苯基膦、无水三乙胺的存在下与丙烯酸甲酯反应,合成了(*E*)-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**3a**),水解后得到(*E*)-5-(2-羧乙烯基)尿苷(**4a**),后经 NBS 溴代合成了(*E*)-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**5a**),接着对尿苷糖环上的羟基进行酯化保护,合成(*E*)-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-溴乙烯基)尿苷(AcBVU, **6a**). 在硫代羰基化

过程中为防止在 2-位上发生硫代反应,选择 1,4-二氧六环作为溶剂,以 P_2S_5 作为硫代试剂^[13-15],高选择性地合成(*E*)-4-硫-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**7a**),最后在饱和氨-甲醇溶液中氨解脱去乙酰保护基,得到最终目标产物 **8a**. 利用此思路,又合成了 **8b** 及其类似物,在此路线中合成的 **5b** 与之前的报道相比较,合成时间由 100 h 缩短至 30 h. 在反应过程中,我们把中间产物(*E*)-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**3a**)进行了酯化保护和 4-羰基硫代反应,从而又得到了 2 种新中间体(*E*)-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**9**)和(*E*)-4-硫-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**10**).

1.2 化合物 **8a/8b** 及其类似物的谱图分析

通过引入新基团使药物的紫外最大吸收处于近紫外光区域,这是 4-硫胸苷/UVA 疗法的目的和优势,所以我们对合成的化合物 **8a** 类似物的紫外光谱进行了研究,化合物的紫外最大吸收波长列于表 1.

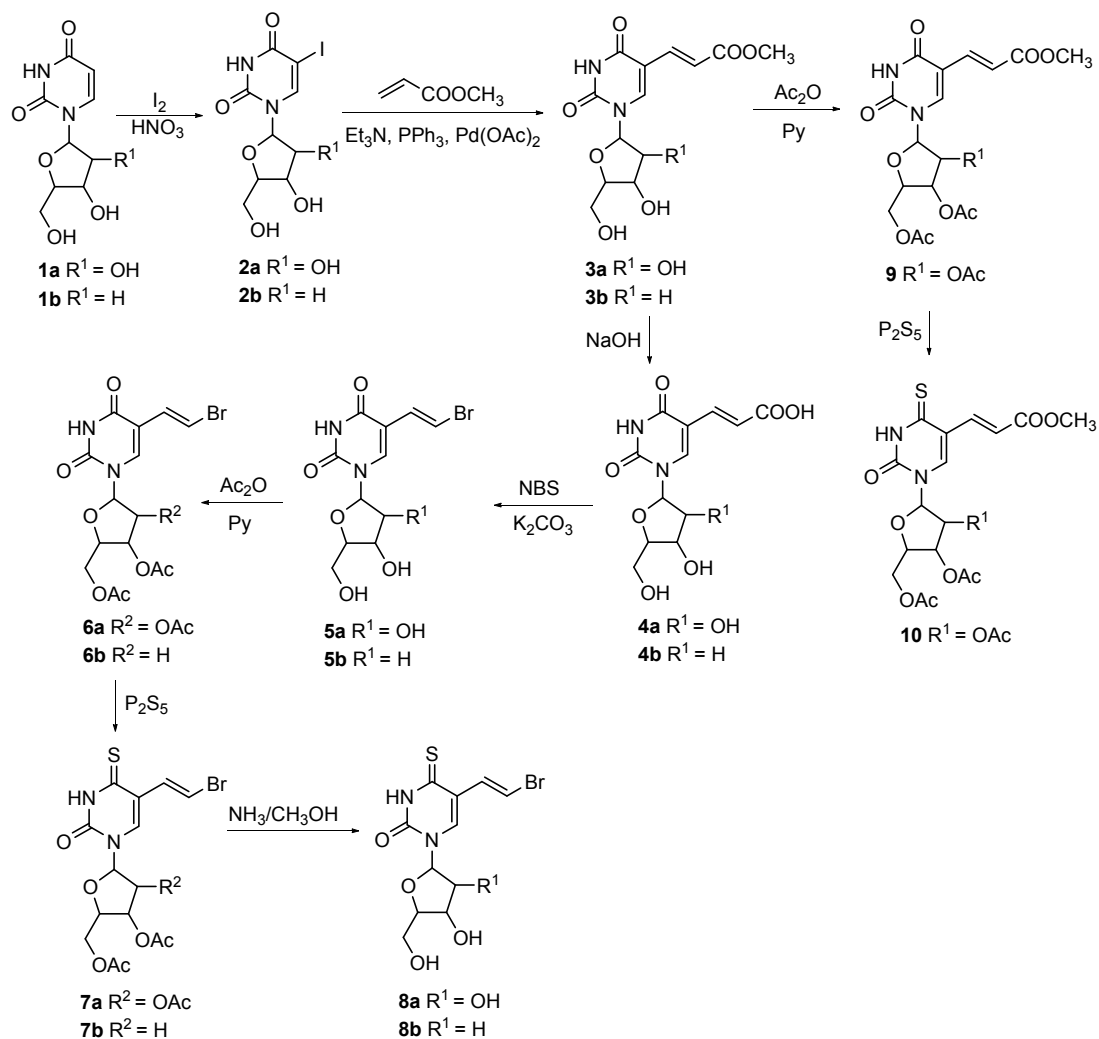
从表 1 可以看出,4-硫代化合物的最大吸收波长均有明显红移,例如(*E*)-5-(2-溴乙烯基)-尿苷(**5a**)经过硫代后得到(*E*)-4-硫-(2-溴乙烯基)尿苷(**8a**),最大吸收波长由 295 nm 红移至 351 nm. 同样, (*E*)-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**5b**)经过硫代后得到(*E*)-4-硫-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**8b**),最大吸收波长由 295 nm 红移至 349 nm. 这是由于硫代后嘧啶环的共轭作用增强,导致紫外吸收光谱红移. 羰基和硫羰基中存在双键和孤电子对,除了能进行 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁,还能进行 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁,且 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所需能量较少,在近紫外和可见光区有吸收. 由于硫原子中原子核对未成键电子的束缚较小,未成键电子更容易发生共轭,且 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁能级差减小,跃迁所需能量较少,紫外吸收向长波方向移动.

从 1H NMR 谱可以看出: (1) N—H 变化比较明显,由于 N—H 处于胸腺嘧啶的共轭体系中,4-位氧原子被硫原子取代后,硫原子的电负性小于氧原子且原子半径大,导致嘧啶环上的电子密度变大、共轭作用增强,使得亚氨基上氢的电子密度降低,且硫原子的半径比氧原子大,亚氨基上的质子受硫原子的电场影响,使得质子受到的去屏蔽作用变大,因此亚氨基上的质子的化学位移值升高,并且由于亚胺基上的氢交换速度变快,导致其半峰宽变大. 通常情况下不含硫基团的核苷在这样的低场下没有信号峰,这为区别 4-硫尿苷类化合物的鉴别

表 1 化合物 **8a** 和 **8b** 及其类似物的紫外吸收波长对比

Table 1 UV absorption wavelength comparison of compounds **8a** and **8b** with their analogues

化合物	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b	9	10
波长/nm	295, 251	295, 250	291, 257	294, 251	347, 279	350, 285, 242	351, 279, 230	349, 279, 228	298	348, 245



图式 1 化合物 8a 和 8b 及其类似物的合成路线

Scheme 1 Synthetic routes of 8a and 8b and their analogues

表 2 化合物 8a 的氢键

Table 2 Hydrogen bonds [Å and (°)] of compound 8a

O(3)—H(3)···S(1)	0.84	2.43	3.261(3)	171.0	-x+2, y+1/2, -z+2
O(4)—H(4)···O(1)	0.84	1.92	2.730(5)	161.5	-x+1, y+1/2, -z+2
O(5)—H(5)···S(1)	0.84	2.35	3.189(4)	176.8	-x+2, y+1/2, -z+1
N(1)—H(1)···O(4)	0.84	2.01	2.771(5)	143.5	-x+2, y-1/2, -z+2

提供了一定的依据。(2)已知乙烯中氢的化学位移值约为 δ 5.25, 上述化合物中烯烃双键的化学位移值较大, 这是因为烯烃与芳环有共轭作用, 使双键上的氢元素化学位移值变大。

从 ¹³C NMR 可以看出, 硫代后 4-C 的化学位移值变大, 因为碳原子化学位移的主要因素是顺磁屏蔽, 它与 ¹H NMR 中的抗磁性屏蔽是不同的, 对于 ¹³C NMR 来说, 这个屏蔽常数 σ 通常表达为如下公式:

$$\sigma = -e^2 h^2 (\Delta E)^{-1} \{r^{-3}\}_{2p} [Q_{AA} + \sum_B Q_{AB}] / 2m^2 c^2$$

$$\sigma \propto -(\Delta E)^{-1} \{r^{-3}\}_{2p}$$

通过对尿苷中羰基和 4-硫尿苷中硫羰基比较, 氧原子相比硫原子具有较小的电负性, 推导出 $\{r^{-3}\}_{2p}$ 较小, 即 σ 较小, 并且 4-硫尿苷跃迁所需的能量较小, 所以碳原子的去屏蔽效应较强, 导致尿苷 4-位氧原子被硫原子取代后 4-C 的化学位移值明显升高^[16]。

1.3 化合物 8a 的晶体结构分析

化合物 8a 的精确结构由英国国家晶体结构服务中

心测定, 结构解析程序为 SHELXL-2013^[17], 使用算法为矩阵最小二乘法, 氢原子通过其加氢理论确认, 晶体的图片由 ORTEP3^[18]提供, 晶体结构数据存于英国剑桥数据中心, CCDC 号为 1476053. 单晶 X 射线衍射分析表明, **8a** 属于单斜晶系, 波长为 0.71075 Å, 空间群为 $P2(1)$, 晶胞参数为 $a=29.35(2)$ Å, $b=14.3184(10)$ Å, $c=10.1871(7)$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=96.257(2)^\circ$, $\gamma=90^\circ$, 体积为 $V=670.05(7)$ Å³, 计算的密度为 1.810 Mg/m³, $F(000)=368$, $Z=2$, 吸收系数为 3.244 mm⁻¹, 用于衍射实验的晶体尺寸为: 0.260 mm×0.030 mm×0.030 mm, 数据收集范围为 2.464~27.481, 最终偏差因子 $R=0.0336$ 和 $wR=0.0916$, 差值电子密度图上最高峰是 1.890 和 0.713 e⁻Å³.

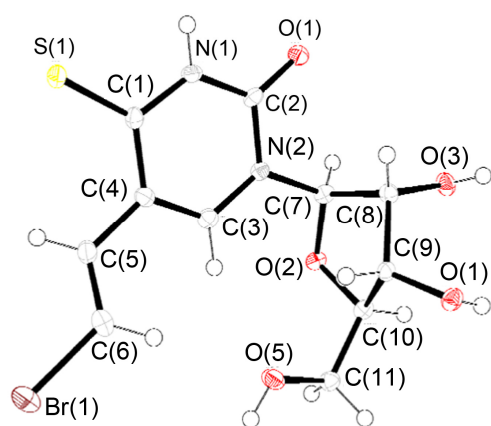


图 1 化合物 **8a** 的晶体结构
Figure 1 Crystal structure of **8a**

化合物 **8a** 的分子晶体结构见图 1, 氢键数据列于表 2 中. 在文献[16]报道中, 化合物 **5b** 中存在分子内氢键, 即溴乙烯基中双键上端氢与 4-位羰基的氧原子之间存在分子内氢键, 但表 2 中显示的氢键中不存在双键上端氢的氢键, 这种变化需要做进一步深入研究.

1.4 化合物的细胞毒性评价

采用对比的方法, 将硫代前后的化合物 **5a/8a**, **6a/7a** 进行了细胞毒性探索, 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-溴化四唑(MTT)实验结果如图 2 所示. 实验表明: (1)癌细胞存活率随着药物浓度增加而降低, 起始癌细胞存活率为 1 (100%), 在实验条件下存活率明显下降, 说明药物经硫代后仍具有抗癌活性; (2)实验中硫代药物的癌细胞存活率比非硫代药物的存活率高, 说明硫代药物对癌细胞毒性较低; (3)非硫代药物对癌细胞的杀伤力较大, 通过硫代后减弱这种杀伤力.

2 结论

合成了一系列化合物, 5 种硫代产物为新化合物.

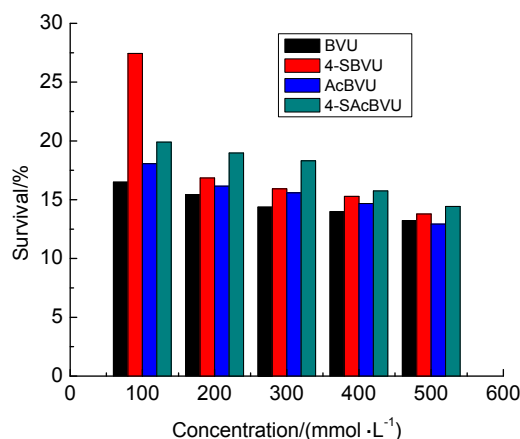


图 2 MTT 实验结果
Figure 2 Result of MTT assay

采用核磁、红外、紫外、高分辨质谱、X 射线衍射等谱图手段对目标化合物进行了表征. 在生物活性方面, 采用 MTT 实验方法, 对合成的新化合物与未硫代的对应化合物进行了细胞毒性对比, 发现新化合物具有一定的抗癌活性, 且硫代化合物在亲脂性方面较好, 是一种潜在的抗癌药物, 这为研究硫代药物作用机制及新药研发有启发作用.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振仪 BRUKER AV 500 (BRUKER 公司); 液质联用仪 HP1100LC/MSD (美国 Hewlett-Packard 公司); 显微熔点仪 X-4 数显 (巩义市英峪予华仪器厂); 红外光谱仪 Nicolet 550 (Nicolet company USA); 离心机 TDL-5 (上海 Anke); 紫外-可见分光光度计 JASCO-UV560 (日本); SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台; 二氧化碳培养箱; 96 孔板; Microplate Reader RT-2100C. 尿苷, AR (韶远化学科技上海有限公司); 丙烯酸甲酯、五硫化二磷、2'-脱氧尿苷、硝酸铯铵, AR (国药集团化学试剂有限公司); 细胞系: A375 细胞 (人黑色素瘤细胞), 购自美国 ATCC 公司. 培养基的配置: 500 mL 基础培养基、50 mL 胎牛血清和 5 mL 双抗 (Sigma 公司).

3.2 实验方法

3.2.1 5-碘尿苷 (**2a/2b**) 的合成

取尿苷 (**1a**) 13.06 g (53.50 mmol) 溶于稀硝酸中, 加热至 110 °C, 加入 10.09 g (39.92 mmol) 单质碘, 通过薄层色谱法监测反应, 4 h 后原料点消失. 静置后用石油醚萃取, 收集下层溶液, 上层溶液用去离子水萃取, 合并两次萃取的下层溶液. 旋蒸后得到大量白色固体, 即为化合物 **2a** 14.30 g (38.64 mmol), 收率为 72.2%. m.p.

206~209 °C(文献值^[19] m.p. 208~210 °C); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.69 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 5.72 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.03 (d, *J*=4.1 Hz, 1H), 3.98 (t, *J*=4.4 Hz, 1H), 3.90~3.82 (m, 1H), 3.68 (d, *J*=11.6 Hz, 1H), 3.57 (d, *J*=11.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.99, 150.59, 145.52, 87.98, 85.10, 70.47, 69.77, 61.27, 40.65.

化合物 **2b** 的合成以化合物 **1b** 为原料, 条件与化合物 **2a** 合成类似, 收率 82.4%. m.p. 193~195 °C(文献值^[20] m.p. 188~190 °C); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.67 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 6.10 (t, *J*=6.5 Hz, 1H), 5.25 (d, *J*=6.3 Hz, 1H), 5.16 (t, *J*=4.8 Hz, 1H), 4.28~4.20 (m, 1H), 3.79 (d, *J*=3.8 Hz, 1H), 3.67~3.60 (m, 1H), 3.60~3.52 (m, 1H), 2.12 (dd, *J*=10.3, 4.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.99, 150.59, 145.52, 87.98, 85.10, 70.47, 69.77, 61.27.

3.2.2 (*E*)-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**3a**)和(*E*)-5-(2-丙烯酸甲酯基)-2'-脱氧尿苷(**3b**)的合成

取无水 1,4-二氧六环于反应器中, 加氩气保护, 加热至 70 °C, 依次加入醋酸钼 0.31 g (1.38 mmol), 三苯基膦 0.72 g (2.75 mmol), 三乙胺 5 mL, 搅拌约 30 min. 加入化合物 **2a** 10.18 g (27.52 mmol), 丙烯酸甲酯 7.11 g (82.56 mmol, 约 7.11 mL), 通过薄层色谱法监测, 反应约 20h 后原料点消失. 过滤, 收集滤液, 静置, 再过滤, 得到白色絮状固体, 即化合物 **3a** 6.57 g (20.01 mmol), 收率为 72.7%. m.p. 194~197 °C; UV-Vis (CH₃CN) λ_{max}: 301 nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.67 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.35 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 5.77 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.46 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.30 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.08 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J*=12.0, 4.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J*=12.0, 4.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, *J*=4.0, 4.0 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.57 (s, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.61, 162.14, 149.91, 144.43, 138.36, 116.73, 108.67, 89.13, 85.13, 74.37, 69.48, 60.66, 51.75; IR (KBr) ν: 3336.0, 1730.0, 1624.2, 1436, 1382.0 cm⁻¹; HRMS calcd for C₁₃H₁₆N₂O₈Na [M+Na]⁺ 351.0927, found 351.0921.

化合物 **3b** 的合成以化合物 **2b** 为原料, 条件与化合物 **3a** 合成类似, 收率为 64.36%. m.p. 210~212 °C(文献值^[21] m.p. 206~209 °C); UV-Vis (CH₃CN) λ_{max}: 302 nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.65 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.37 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.85 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.26 (d, *J*=2.4 Hz, 2H), 4.26 (s, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.68 (s, 4H), 3.58 (d, *J*=11.1 Hz, 1H), 2.18 (d, *J*=4.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 167.65,

162.17, 149.71, 144.47, 138.58, 116.66, 108.64, 88.14, 85.31, 70.22, 61.31, 51.73; IR (KBr) ν: 3360.0, 1689.2, 1619.2, 1464.6 cm⁻¹. HRMS calcd for C₁₃H₁₆N₂O₇Na [M+Na]⁺ 335.0855, found 335.0838.

3.2.3 (*E*)-5-(2-羧乙烯基)尿苷(**4a**)和(*E*)-5-(2-羧乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**4b**)的合成

取化合物 **3a** 6.00 g 逐滴加入 73 mL 氢氧化钠溶液(2 mol/L), 室温搅拌 3 h 后, 在冰浴条件下逐滴加入浓盐酸, 直到 pH 为 1, 此时有大量白色沉淀生成. 抽滤, 得到白色固体 **4a** 5.31 g (16.89 mmol), 收率为 92.3%. m.p. 269~270 °C; UV-Vis (CH₃CN) λ_{max}: 302 nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.43 (s, 1H), 7.18 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 5.78 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 4.09 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 4.04 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.89 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.70~3.88 (m, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.61 (dd, *J*=8.0, 4.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 169.52, 162.28, 150.08, 142.67, 135.36, 121.27, 109.40, 88.93, 85.28, 74.41, 69.72, 60.78; IR (KBr) ν: 3648.0, 3324.6, 1682.0, 1607.2, 1454.8, 1416.5 cm⁻¹. HRMS calcd for C₁₂H₁₄N₂O₈Na [M+Na]⁺ 337.0570, found 337.0632.

化合物 **4b** 的合成以化合物 **3b** 为原料, 条件与化合物 **4a** 合成类似, 收率为 91.8%. m.p. 264~265 °C(文献值^[22] m.p. 267 °C); UV-Vis (CH₃CN) λ_{max}: 301 nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 12.19 (s, 1H), 11.63 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.29 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.78 (d, *J*=12.0 Hz, 1H), 6.14 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.23 (d, *J*=16.0 Hz, 2H), 4.27 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.80 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.63 (td, *J*=8.0, 4.0 Hz, 2H), 2.22~2.13 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 168.48, 162.20, 149.75, 143.95, 137.94, 118.20, 108.84, 88.13, 85.25, 70.24, 61.30; IR (KBr) ν: 3375.0, 1701.6, 1625.4, 1434.5 cm⁻¹.

3.2.4 (*E*)-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**5a**)和(*E*)-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**5b**)的合成

取化合物 **4a** 4.50 g (14.31 mmol)加入 120 mL 水中并加热至 100 °C 搅拌, 再加入无水碳酸钾 1.20 g, 取 NBS 1.3 g 分别溶于 22.5 mL 丙酮和 22.5 mL 水中, 并将混合液滴加至烧瓶中, 至少 135 min 滴加完毕. 搅拌 3 h, 停止反应, 除去一半溶剂, 置于冰箱中, 过夜. 有大量针状棕色晶体析出, 抽滤, 得到化合物 **5a** 2.70 g (7.73 mmol), 收率为 50.5%. m.p. 170~172 °C; UV-Vis (CH₃CN) λ_{max}: 251, 295 nm; ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.57 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.24 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 6.82 (d, *J*=12 Hz, 1H), 5.76 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 5.23~5.09 (m, 3H), 4.05 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 4.00 (t, *J*=4.0 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J*=8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J*=

12.0, 8.0 Hz, 1H), 3.59 (td, $J=12.0, 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.13, 149.99, 139.96, 130.16, 110.14, 107.03, 88.83, 85.14, 74.23, 69.72, 60.88; IR (KBr) ν : 3358, 1698.0, 1467.8, 1384.5 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 370.9855, found 371.4815.

化合物 **5b** 的合成以化合物 **4b** 为原料, 条件与化合物 **5a** 合成类似, 收率为 50.3%. m.p. 173~176 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[23] m.p. 165~168 $^{\circ}\text{C}$); UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 293 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.58 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.25 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.13 (t, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J=64.0$ Hz, 2H), 4.25 (dd, $J=4.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.78 (q, $J=4.0$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J=12.0, 8.0, 4.0$ Hz, 2H), 2.13 (dd, $J=8.0, 4.0$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.28, 149.84, 139.91, 130.41, 110.15, 106.91, 88.00, 84.99, 70.38, 61.46, 21.98; IR (KBr) ν : 3366.0, 1720.2, 1616.2, 1454.5 cm^{-1} .

3.2.5 (*E*)-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**6a**)和(*E*)-3',5'-*O*-二乙酰基-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**6b**)的合成

取化合物 **5a** 2.50 g (7.16 mmol)于冰浴条件下加入无水吡啶 21.00 mL, 醋酸酐 4.81 mL (50.77 mmol). 通过薄层色谱法监测反应情况, 反应约 5 h 后, 原料点消失. 除去溶剂, 得到黏稠状液体, 重结晶, 得到灰白色固体 **6a** 2.87 g (6.03 mmol), 产率 84.3%. m.p. 191~193 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 257, 297 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.74 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.30 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 5.92 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.45 (dd, $J=4.0$ Hz, 8.0 Hz, 1H), 5.35~5.33 (m, 1H), 4.34 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.28~4.23 (m, 2H), 2.08~2.05 (m, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.52, 169.79, 169.77, 162.01, 149.65, 140.38, 129.77, 111.02, 107.97, 88.35, 79.52, 72.50, 69.91, 63.37, 20.99, 20.73, 19.02; IR (KBr) ν : 1751.5, 1463.2, 1373.7 cm^{-1} ; HRMS: calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_9\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 497.0172, found 497.0171.

化合物 **6b** 的合成以化合物 **5b** 为原料, 条件与化合物 **6a** 合成类似, 收率 85.1%. m.p. 184~186 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 294 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.30 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.16 (t, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.26 (d, $J=4.0$ Hz, 2H), 4.18 (s, 1H), 2.35 (d, $J=12.0$ Hz, 2H), 2.06 (d, $J=12.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.56, 162.06, 149.71, 139.76, 130.15, 110.74, 107.58, 85.21, 81.83, 74.15, 64.05, 36.31,

21.23, 21.05; IR (KBr) ν : 1750.0, 1628.2, 1460.6, 1385.8 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_7\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 439.0219, found 439.0141.

3.2.6 (*E*)-4-硫-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**7a**)和(*E*)-4-硫-3',5'-*O*-二乙酰基-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**7b**)的合成

取化合物 **6a** 2.29 g (4.81 mmol)溶于无水 1,4-二氧六环中, 加热到 105 $^{\circ}\text{C}$. 加入 P_2S_5 2.15 g (9.62 mmol), 用薄层色谱法检测反应情况, 反应 4 h 后原料点消失. 除去溶剂, 得到棕红色固体. 柱分离得到得到黄色固体 **7a** 0.73 g (1.49 mmol), 收率为 31.1%. m.p. 200~202 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 346 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.06 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.21 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 5.57 (dd, $J=8.0, 4.0$ Hz, 1H), 5.38 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 4.38~4.33 (m, 1H, 4'-H), 4.31~4.26 (m, 2H, 5'-H), 2.08~2.03 (m, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 188.77, 170.49, 169.75, 169.74, 147.23, 135.59, 131.26, 119.02, 107.83, 89.53, 79.93, 72.60, 69.82, 63.24, 20.97~20.70; IR (KBr) ν : 1701.7, 1621.9, 1454.5, 1376.0 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{NaO}_8\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 512.9943, found 512.9950.

化合物 **7b** 的合成以化合物 **6b** 为原料, 条件与化合物 **7a** 合成类似, 收率 35.8%. m.p. 199~201 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 242, 285, 350 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.01 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.23 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J=13.9$ Hz, 1H), 6.11 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 5.23~5.20 (m, 1H), 4.32~4.27 (m, 2H), 4.24 (dd, $J=6.0, 2.8$ Hz, 1H), 2.33 (s, 2H), 2.05 (d, $J=17.5$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 188.33, 170.63, 170.53, 142.33, 133.78, 131.52, 118.83, 107.72, 86.42, 82.36, 74.27, 64.20, 32.97, 21.25, 21.03; IR (KBr) ν : 1729.6, 1610.0, 1435.4, 1394.1 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_6\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 454.9991, found 455.0063.

3.2.7 (*E*)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)尿苷(**8a**)和(*E*)-4-硫-5-(2-溴乙烯基)-2'-脱氧尿苷(**8b**)的合成

取化合物 **7a** 0.60 g (1.22 mmol), 用氨甲醇溶液 120 mL 溶解并进行反应, 室温搅拌, 通过薄层色谱法检测反应情况, 4 h 后停止反应. 除去溶剂, 得到黄色固体, 柱分离, 得到化合物 **8a** 0.15 g (0.42 mmol), 收率为 34.6%. m.p. 170~172 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 230, 279, 351 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.91 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.25 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 4.11~4.10 (m, 1H), 4.04~4.02 (m, 1H), 3.90~3.89 (m, 1H), 3.78 (dd, $J=$

12.0, 4.0 Hz, 1H), 3.62 (dd, $J=12.0, 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 188.06, 147.49, 134.88, 131.68, 118.23, 106.50, 90.00, 84.89, 74.57, 68.98, 60.07; IR (KBr) ν : 3405.2, 1684.4, 1603.9, 1459.1, 1391.1 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 386.9626, found 386.9610.

化合物 **8b** 的合成以化合物 **7b** 为原料, 条件与化合物 **8a** 合成类似, 收率 34.6%. m.p. 175~177 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 228, 279, 349 nm; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.90 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.25 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J=12.0$ Hz, 1H), 6.07 (t, $J=4.0$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J=4.0$ Hz, 2H), 3.87 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J=12.0, 4.0$ Hz, 2H), 2.55, 2.30~2.11 (m, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.40, 162.54, 149.93, 123.71, 109.10, 107.70, 88.05, 71.19, 62.08, 40.80, 22.82; IR (KBr) ν : 3394.2, 1708.3, 1636.0, 1456.7, 1386.8 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{Br-N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 370.9779, found 370.9774.

3.2.8 (*E*)-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**9**)的合成

取化合物 **3a** 1.31 g (4 mmol), 冰浴条件下加入无水吡啶 40.00 mL, 醋酸酐 8.5 mL. 通过薄层色谱法监测反应情况, 反应约 5 h 后, 原料点消失. 除去溶剂, 得到黏稠状液体, 重结晶, 得到灰白色固体 **9** 1.45 g (6.03 mmol). 产率 80.15%. m.p. 196~199 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (in CH_3CN) λ_{max} : 298 nm; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.35 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.30~7.26 (m, 1H), 6.99 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J=6.0$ Hz, 1H), 5.39 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 5.34 (t, $J=6.0$ Hz, 1H), 4.47~4.43 (m, 1H), 4.41~4.34 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.19, 2.13 2.11 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 170.16, 169.63, 169.59, 167.62, 160.79, 149.02, 141.06, 135.69, 120.12, 110.81, 87.98, 80.26, 73.11, 69.95, 62.89, 51.69, 20.80, 20.46, 20.38; IR (KBr) ν : 1684.4, 1603.9, 1459.1, 1391.1 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 477.1224, found 477.1152.

3.2.9 (*E*)-4-硫-2',3',5'-*O*-三乙酰基-5-(2-丙烯酸甲酯基)尿苷(**10**)的合成

取化合物 **9** 0.90 g (2 mmol), 溶于 120 mL 无水 1,4-二氧六环中, 加热至 105 $^{\circ}\text{C}$. 加入 P_2S_5 2.15 g (9.62 mmol), 开始反应, 用薄层色谱法检测, 反应 3.5 h 后原料点消失. 除去溶剂, 得到棕红色固体. 柱分离得到黄色固体 **10** 0.18 g (0.38 mmol), 收率 19.6%. m.p. 208~213 $^{\circ}\text{C}$; UV-Vis (CH_3CN) λ_{max} : 245, 304, 348 nm; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 10.08 (s, 1H), 7.87 (s, 1H),

7.73 (s, 1H), 6.45 (d, $J=15$ Hz, 1H), 6.01 (d, $J=6$ Hz, 1H), 5.40 (t, $J=6$ Hz, 1H), 5.34 (t, $J=4.0$ Hz, 1H), 4.48 (dd, $J=4.0, 12.0$ Hz, 1H), 4.42 (t, $J=1$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.16, 2.14, 2.12 (s, 9H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 187.57, 170.15, 169.65, 169.60, 166.52, 146.42, 138.22, 133.70, 118.93, 111.88, 88.14, 80.57, 73.10, 69.95, 62.83, 51.93, 20.81, 20.51, 20.44; IR (KBr) ν : 1692.6, 1607.9, 1454.3, 1388.4 cm^{-1} ; HRMS calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 493.0995, found 493.0896.

3.2.10 化合物 **8a** 及其类物的细胞毒性评价实验

分别取定量的化合物 **5a**, **6a**, **7a**, **8a** 四种药物, 并配置成标准溶液. 取对数生长期的 A375 细胞(人黑色素瘤细胞), 用含 10%胎牛血清和抗菌素的 DMEM (Dulbecco minimum essential medium) 培养液调节细胞浓度为 10×10^5 mL, 加入两个 96 孔平底细胞培养板, 每孔 100 μL (约 104 个细胞), 放入 5%二氧化碳培养箱中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h.

次日, 将含不同药物的培养液加入实验组 96 孔板中, 每种药物组合设三个平行孔. 每孔体积为 100 μL , 加入适量药物溶液, 使得药物最终浓度为 300、400、500 $\mu\text{mol/L}$. 对照组 96 孔板中只加培养液, 不加药物, 作为空白对照. 将两板放在 5%二氧化碳培养箱中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h.

培养结束后每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)继续培养 3 h, 取出 96 孔板, 弃去孔内全部上清液, 并用干净的纸巾轻轻蘸干 96 孔板内的残留液, 不要破坏孔内晶体. 每孔加入 100 μL DMSO, 溶解 30 min, 然后用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光值, 即 OD 值. 记录实验结果, 处理数据. 细胞存活率%=(OD_{实验}/OD_{对照}) \times 100%.

致谢 感谢英国国家晶体结构服务中心 Dr. Peter Horton 帮助测定化合物 **8a** 的晶体结构.

辅助材料(Supporting Information) 化合物 **8a** 的键长、键角和晶体模型数据, 化合物 **2a/2b~8a/8b** 和 **9**、**10** 的 ^1H NMR, ^{13}C NMR 图谱. 这些材料可以免费从本刊网站 (<http://sioc-journal.cn/>) 上下载.

References

- [1] Wigerinck, P.; Pannecouque, C.; Snoeck, R. *Med. Chem.* **1991**, *34*, 2883.
- [2] Erikson, R. L.; Szybalski, W. *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 252.
- [3] Franken, N. A.; Van Bree, C.; Veltmaat, M. A.; Rodermond, H. M.; Haveman, J.; Barendsen, G. W. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2001**, *42*, 179.
- [4] Pridgeon, S. W.; Heer, R.; Taylor, G. A. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*,

- 1869.
- [5] Gemenetzidis, E.; Shavorskaya, O.; Xu, Y. Z. *Dermatol. Treatment* **2013**, *24*, 209.
- [6] Reelfs, O.; Karran, R.; Young, A. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 148.
- [7] Massey, M.; Xu, Y. Z.; Karran, P. *Curr. Biol.* **2011**, *11*, 1142.
- [8] Ying, H.-Y.; Zhang, X.-H.; Xu, Y.-Z. *J. Mol. Struct.* **2011**, *27*, 398 (in Chinese).
(银鸿雁, 张晓辉, 徐耀忠, 分子科学学报, **2011**, *27*, 398.)
- [9] Wang, J.; Zheng, X. -F.; Cao, H.-Y.; Zhang, X. -H. *J. Lumin.* **2013**, *34*, 361 (in Chinese).
(王健, 郑学仿, 曹洪玉, 张晓辉, 发光学报, **2013**, *34*, 361.)
- [10] Zhai, H.-X. *M. S. Thesis*, Dalian University, Dalian, **2014** (in Chinese).
(翟红秀, 硕士论文, 大连大学, 大连, **2014**.)
- [11] Jones, A. S.; Verhelst, G.; Walker, R. T. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4415.
- [12] Wang, C.-J.; Xie, F.; Zhang, W.-B. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, *28*, 503 (in Chinese).
(王春娟, 谢芳, 张万斌, 有机化学, **2008**, *28*, 503.)
- [13] Huo, S.-H.; Li, D. P.; Wang, J.; Zhang, X. H. *J. Mol. Sci.* **2013**, *29*, 392 (in Chinese).
(霍书华, 李德鹏, 王健, 张晓辉, 分子科学学报, **2013**, *29*, 392.)
- [14] Lapucha, A. R. *Synthesis* **1987**, 256.
- [15] Kaneko, K.; Katayama, H.; Wakabayashi, T.; Kumonaka, T. *Synthesis* **1988**, 152.
- [16] Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr.* **2008**, *A64*, 112.
- [17] Saenger, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 621.
- [18] Parkanyi, L.; Kalman, A.; Czugler, M.; Kovacs, T.; Walker, R. T. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4111.
- [19] Robins, M. J.; Barr, P. J.; Giziewicz, J. *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 554.
- [20] Bui, N. M.; Gillet, R.; Dumont, P. *Appl. Radiat. Isot.* **1965**, *16*, 337.
- [21] Rong, F. G.; Soloway, A. H. *Nucleosides Nucleotides* **1986**, *29*, 213.
- [22] Ashwell, M.; Jones, A. S.; Sayers, R. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4601.
- [23] Jones, A. J.; Rahim, S. G.; Walker, R. T.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 759.

(Qin, X.)