

# 鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸衍生物的合成及生物活性研究

蔡海英 张礼和

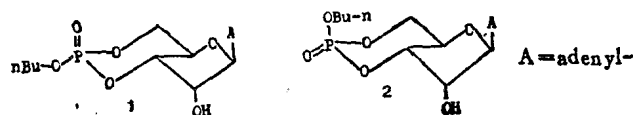
(北京医科大学药学院, 北京 100083)

**摘要** 本文报道用三价磷试剂与保护的鸟嘌呤核苷反应, 经碘氧化生成鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酸酐, 并对它们的生物活性做了初步研究,  $N^2$ -二甲胺基甲基-2'-叔丁基二甲硅基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酸酐对小鼠肝癌腹水细胞的 DNA 和 RNA 合成有一定的抑制作用。 $N^2$ -二甲胺基甲基鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酐的两个磷原子构型不同的异构体可激活腺苷酸环化酶, 使大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的 cAMP 水平增高。

**关键词** 鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸酯和磷酸酐; 腺苷酸环化酶

腺嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸 (以下简称 cAMP) 和鸟嘌呤核苷-3', 5'-环磷酸 (以下简称 cGMP) 被认为是激素效应的信使。在许多生命过程中, 它们通过各自的作用进行生物调节。因它们是内源性物质, 合成其类似物有可能发现高效、低毒、有特异性作用的药物<sup>(1)</sup>。对它们的研究也将丰富人们对其作用机理的认识, 促进从分子水平了解更多重要的生理、生化过程。

我们已报道了 cAMP 衍生物的合成及生物活性研究。通过活化 cAMP 的 P-O 键合成了 cAMP 磷酸酯和磷酸酐<sup>(2,3)</sup> 并发现它们对肝癌、艾氏腹水瘤细胞的 DNA 和 RNA 合成有较强的抑制作用。其中 cAMP 丁酯的立体异构体(1,2)不仅抑制作用较明显, 且对肿瘤细胞膜的骨架成分有一定影响<sup>(4)</sup>。鉴于 cGMP 和 cAMP 在体内调节中的相互关系及它们结构上的

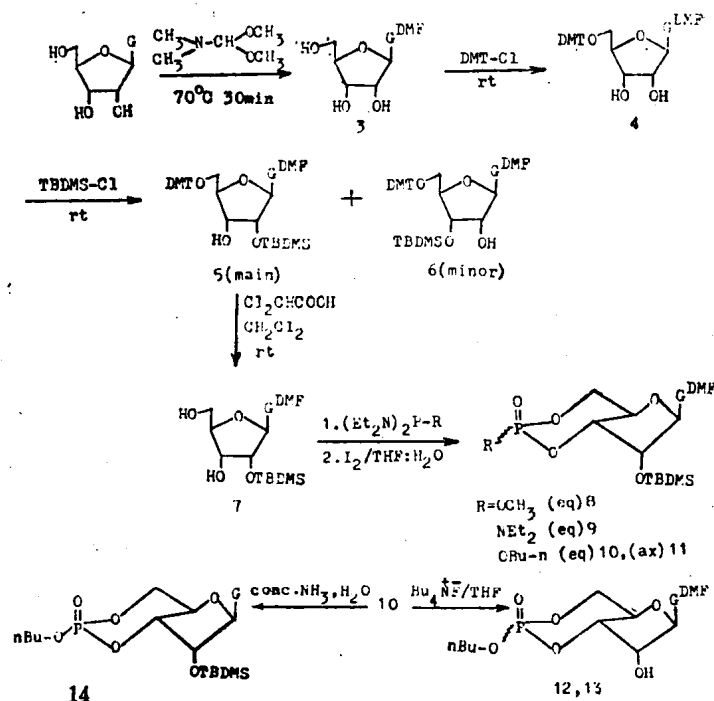


差异。在 cAMP 衍生物研究的基础上, 研究 cGMP 衍生物的合成及生物活性, 并寻找两者之间的关系显然是十分必要的。近年来, 在环核苷酸系统的研究中发现, cAMP 和 cGMP 的水平还受鸟嘌呤核苷酸调节蛋白 (简称 G 蛋白) 的影响; 即细胞表面的受体都是通过 G 蛋白把信息传递到相应的效应器酶上的<sup>(5)</sup>。而 cGMP 衍生物也可以考虑作为鸟嘌呤核苷酸的类似物, 对 G 蛋白起作用。

关于 cGMP 磷酸酯和磷酸酐的合成报道不多<sup>(6~10)</sup>, 且都是从 cGMP 开始, 用较强的活化试剂如  $\text{POCl}_3$ , 苯磺酰氯或  $\text{PPh}_3/\text{CCl}_4$  活化 P-O 键, 然后加入适当的胺合成磷酸酐, 或用重氮烷合成酯。由于 cGMP 的溶解度较差以及 P-O 键键能高, 活性低, 所以用上述方法合成, 收率极低。此外, cGMP 本身的合成也较困难, 收率也较低。本文利用前已报道的核苷的环亚磷酸化反应<sup>(11)</sup>, 用保护的鸟嘌呤核苷与三价磷试剂反应, 产物经  $\text{I}_2$  氧化合成 cGMP 磷酸酯和磷酸酐, 为合成 cGMP 的衍生物开辟了一条新的途径。

合成路线如下:

本文于1988年8月10日收到。



G=guanine, TBDMS-Cl=dimethyl-tert-butylsilyl chloride, DMT-Cl=4,4'-dimethoxytrityl chloride, GDMF=N<sup>2</sup>-(N,N-dimethylamino)-methylene guanine

Scheme 1. Route of synthesis.

鸟嘌呤核苷在 DMF 中, 用 N,N-二甲基甲酰胺的甲缩醛, 70°C 下反应 30 min, 得到收率 70% 的化合物 3。3 用 氯化 4,4'-二甲氧基三苯甲烷(DMT-Cl)在吡啶和 DMSO 中室温搅拌 12 h, 得到 5'-羟基保护的化合物 4, 收率 74%。化合物 4 的 2' 和 3'-羟基用氯化叔丁基二甲基硅烷(TBDMS-Cl)选择性地保护 2' 位, 得到主要产物 5 和次要产物 6。Ogilvie 等用 TBDMS 选择性地保护核苷的羟基<sup>(12)</sup>, 并发现 AgNO<sub>3</sub> 可增加选择性, 而 Gholan 等用 N<sup>2</sup>-苯甲酰保护的鸟苷为原料重复以上实验时未得到理想的选择性<sup>(13)</sup>。在我们的反应中, 加 AgNO<sub>3</sub> 后, 反应时间从 48 h 缩短至 2h, 但位置选择性无明显变化, 并发现鸟嘌呤 N<sup>2</sup> 上的(N,N-二甲胺基甲烯基)保护基对糖环上羟基的选择性硅烷化比其它常用的保护基有利。化合物 5 和 6 经 MS, <sup>1</sup>HNMR、UV 分析, 被确定为一对异构体, 从 <sup>1</sup>HNMR 分析: 薄层分析中 R<sub>f</sub> 值高的 5, 2'-H 的化学位移(4.45 ppm)比 6(4.52 ppm)在高场, 这是因为 2'-OH 上有大的硅保护所致。而 6 的 3'-H 化学位移(4.28 ppm)也比 5(4.35 ppm)的高。从而证明 5 为 2'-硅保护异构体。用 5 进一步反应, 环化的成功也证明了我们的判断。化合物 5 在二氯醋酸的二氯甲烷溶液中室温脱去 5'-OH 上的 DMT 保护基得到化合物 7, 收率 83%。化合物 7 与一系列三价磷试剂在常温、N<sub>2</sub> 保护下反应 2 h, 经 I<sub>2</sub> 氧化, 得到化合物 8~11。反应是立体选择性进行的。8,9 只分出一个产物, 由于正丁酯的收率较高, 我们分离得到大量 10 以外, 还分到了少量磷原子构型不同的异构体 11。Engels 等指出<sup>(7)</sup>, 六元环状磷酸酯当烷氧基处于竖键时 <sup>31</sup>P NMR 化学位移在高场, 烷氧基在横键时 <sup>31</sup>P NMR 化学位移在低场。10 的 <sup>31</sup>P NMR δ 为 10.7 ppm, 11 的 δ 为 10.4 ppm。所以, 确定了化合物 10 是正丁烷氧基在横键的异构体, 11 是正丁烷氧基在竖键的异构体。8,9 由于没有相应的异构体对照, 因此, 没有建立磷原子的构型, 若按反应的一般情况分析, 也应为烷氧基处于横

键位置。化合物 10 在氟化四正丁胺的四氢呋喃溶液中脱 2'-OH 上的 TBDMS 保护基, 反应中发现在脱去 TBDMS 的同时, 磷原子的构型发生了转化, 结果得到磷原子构型不同的两个异构体 12 和 13。在脱保护基的过程中还发现鸟嘌呤核苷环磷酸酯或酰胺上的 N<sup>2</sup> 保护基一旦脱去, 产物溶解度即发生很大变化, 在一般溶剂中都很难溶解。为了便于生物活性实验的进行, 产物最后保留 N<sup>2</sup> 上的保护基。化合物 5~14 均未有文献报道。

初步的生物实验如表 1、表 2 所示。

Tab 1. Effects of compounds (8~13) on the synthesis of DNA and RNA in tumor cell

| Compd (10 <sup>-4</sup> mol/L) | % Inhibition of synthesis of DNA (hepatoma) | % Inhibition of synthesis of RNA (hepatoma) |
|--------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1                              | 64.9±14.4                                   | 54.5±7.8                                    |
| 2                              | 48.1±3.9                                    | 59.0±11.6                                   |
| 10                             | 69.0±13.4                                   | 58.0±4.5                                    |
| 11                             | 36.0±11.6                                   | 33.9±7.3                                    |
| 8                              | 47.9±3.5                                    | 57.0±6.1                                    |
| 9                              | 95.0±1.9                                    | 88.0±1.7                                    |
| 12                             | 23.9±11.8                                   | 13.8±5.6                                    |
| 13                             | 0.7±11.8                                    | 22.7±6.5                                    |
| cGMP monosodium salt           | 22.3±14.4                                   | 35.5±3.5                                    |
| cytosine arabinoside           | 95.0±0.9                                    | 16.0±11.6                                   |

The above values are means±SD for three separate determinations, each determination being done in duplicate

Tab 2. Effectes of compounds 12 and 13 on the activity of adenylyl cyclase in osteoblastic cells ROS 17/2.8

| Compd   | Conc (μmol/L) | <sup>3</sup> H-cAMP(dpm) | Compd   | Conc(μmol/L) | <sup>3</sup> H-cAMP(dpm) |
|---------|---------------|--------------------------|---------|--------------|--------------------------|
| Control |               | 727±106                  | Control |              | 845±275                  |
| PTH     | 10            | 4232±205                 | PTH     | 10           | 6557±803                 |
| 12      | 150           | 3257±30                  | 13      | 150          | 1471±288                 |
| PTH+12  | 10+150        | 11857±1100               | PTH+13  | 10+150       | 9470±1394                |

dpm: Disintegration/min

The above values are means±SD for three separate determinations, each determination being done in triplicate.

表 1 是药物对 <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>3</sup>H-UdR 掺入小鼠肝癌细胞的 DNA 和 RNA 合成的影响。表 2 为药物 12 和 13 对大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的腺苷酸环化酶的影响。实验结果表明, 保护的 cGMP 丁酯与 cAMP 丁酯的抑制情况相似, 都是烷氧基横键异构体大于相应的竖键异构体。保护的 cGMP 甲酯和 N,N'-二乙基磷酰胺均有抑制作用。其中二乙基磷酰胺衍生物的抑制作用尤其突出。脱去 2'-OH 上保护基的产物 12 和 13 对 DNA 和 RNA 合成均无抑制作用。cGMP 钠盐在 10<sup>-4</sup>(mol/L) 浓度下也未表现出明显的作用。

甲状旁腺激素(PTH)可刺激成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8 的腺苷酸环化酶的活性。已知此过程是通过激活 G 蛋白而实现的。化合物 12 和 13 不但本身能刺激腺苷酸环化酶, 使 cAMP 水平增高, 而且与 PTH 同时用药有协同作用。从结构上看 12 和 13 是 5'-GMP 的衍

生物, 故我们推测可能对 G 蛋白有一定的影响。进一步的作用过程正在研究之中。

## 实 验 部 分

薄层层析用青岛海洋化工厂硅胶 GF<sub>254</sub>, 柱层析用青岛海洋化工厂 100~200 目或 200~300 目硅胶。紫外光谱仪为 Du-7 型。FAB-MS 用 ZAB-HS 型质谱仪测定。NMR 用 FX-90 Q 及 VXR 300 测定, <sup>31</sup>P NMR 以 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 做内标。薄层层析展开剂为 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(9:1)。所有溶剂均经过干燥处理。减压浓缩均在 50°C 下进行。所有制得的化合物均为干糖浆, 薄层分析或 HPLC 分析均为单点或单峰。

### N<sup>2</sup>-二甲胺基甲烯基鸟嘌呤核苷(3)

按照文献 14 的方法合成 1,1-二甲氧基二甲胺。再按照文献 15 的方法合成化合物 3

### N<sup>2</sup>-二甲胺基甲烯基-5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)鸟嘌呤核苷(4)

化合物 3 3 g (0.01 mol) 加到吡啶 15 ml 和 DMSO 15 ml 中, DMT-Cl 4 g (0.012 mol) 分三次加入。室温搅拌 12 h 后倒入冰水中, 析出固体, 过滤, 抽干。经硅胶柱层析, CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(90:10)洗脱, 得 4 5.2 g, 收率 74%。UVλ<sub>max</sub><sup>M<sub>2</sub>OH</sup> nm 303.5, 280(sh), 233.5。FAB-MS m/z 640(M+1)<sup>+</sup>, 207(G<sup>DMF</sup>+2H<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8.58(s, 1H, N=CH-N), 8.00(s, 1H, C<sub>8</sub>-H), 6.9~7.3(m, 13H, Ar-H), 5.85(d, 1H, J=4.5 Hz, C<sub>1'</sub>-H), 5.25(m, 1H, C<sub>2'</sub>-H), 4.5(m, 1H, C<sub>3'</sub>-H), 4.2(m, 1H, C<sub>4'</sub>-H), 4.04(m, 2H, C<sub>5'</sub>-H), 3.69(s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.12(d, 6H, NCH<sub>3</sub>)。

### N<sup>2</sup>-二甲胺基甲烯基-5'-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷(5及6)。

4 319 mg (0.5 mmol) 溶于 DMF 2 ml 和吡啶 2 ml 中, TBDMS-Cl 100 mg (0.7 mmol) 分两次加入, 室温搅拌 48 h 倒入冰水中, 滤出沉淀, 水洗、干燥, 粗品经硅胶柱层析, 用 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(98:2)洗脱, 得化合物 5 226 mg, 收率 64%, Rf 0.58。另外分出化合物 6 64 mg, 收率 18%, Rf 0.50, 反应加 AgNO<sub>3</sub> 119 mg (0.7 mmol) 催化, 2 h 即完成, 得 Rf 0.58 产物 212 mg, 收率 60%; Rf 0.50 产物 70 mg, 收率 20%。5 和 6 UVλ<sub>max</sub><sup>M<sub>2</sub>OH</sup> nm 303.5。FAB-MS m/z 755(M+1)<sup>+</sup>, 207(G<sup>DMF</sup>+2H<sup>+</sup>)。化合物 5 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.35(s, 1H, N=CH-N), 7.6(s, 1H, C<sub>8</sub>-H), 6.75~7.25(m, 13H, Ar-H), 5.85(d, 1H, J=2.7 Hz, C<sub>1'</sub>-H), 4.45(m, 1H, C<sub>2'</sub>-H), 4.35(m, 1H, C<sub>3'</sub>-H), 4.1(m, 1H, C<sub>4'</sub>-H), 3.32(m, 2H, C<sub>5'</sub>-H), 3.7(s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.0(d, 6H, NCH<sub>3</sub>), 0.1(s, 6H, SiCH<sub>3</sub>), 0.9(s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)。化合物 6 相应位置 H 的 δ 值分别为: 8.35, 7.6, 6.75~7.25, 5.85(J=4.3 Hz), 4.52, 4.28, 3.95, 3.2, 3.7, 3.0, 0.1, 0.9。

### N<sup>2</sup>-二甲胺基甲烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷(7)

5 200 mg 溶于少许 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中, 加入 5% Cl<sub>2</sub>CHCOOH 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 20 ml, 室温搅拌 15 min, 用 5% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、水分别洗涤, 直至 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层中性, 加无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥后, 过滤、浓缩。用硅胶柱层析, CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(97:3)洗脱, 得化合物 7 100 mg, 收率 83%, Rf 0.39。UVλ<sub>max</sub><sup>M<sub>2</sub>OH</sup> 301.5。FAB-MS m/z 453(M+1)<sup>+</sup>, 207。 <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8.64(s, 1H, N=CH-N), 7.9(s, 1H, C<sub>8</sub>-H), 5.8(d, 1H, J=6.3 Hz, C<sub>1'</sub>-H), 5.18(t, 1H, J=4.5 Hz, C<sub>2'</sub>-H), 4.5(s, 1H, C<sub>3'</sub>-H), 3.79~4.07(m, 3H, C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub>-H), 3.3(d, 6H, NCH<sub>3</sub>), 0.9(s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.8~0.7(t, 6H, SiCH<sub>3</sub>)

### N<sup>2</sup>-二甲胺基甲烯基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3',5'-环磷酸酯(10 和 11)

化合物 7 90.4 mg (0.2 mmol)、四氮唑 35 mg (0.5 mmol), 溶于 DMF 2 ml 中, N<sub>2</sub> 气保

护下加入  $\text{BuO-P}(\text{NEt}_2)_2$ , 140  $\mu\text{l}$  (0.5 mmol) 反应 2 h 后, 用  $\text{I}_2$  液 (0.055 mol/L) 10 ml 氧化。反应物用乙酸乙酯提取, 水洗后, 加入无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 浓缩, 粗品经硅胶柱层析  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (98:2) 洗脱后, 减压浓缩得化合物 11 (10 mg, Rf 0.58, 收率 8.8%) 和化合物 10 (80 mg Rf 0.50, 收率 70%)。10 和 11 的  $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm 303.5。FAB-MS  $m/z$  571 ( $M+1$ )<sup>+</sup>。化合物 10  $^{31}\text{P}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 10.7。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.55 (d, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.65 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 6.0 (s, 1 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ), 5.8 (s, 1 H,  $\text{C}_2'-\text{H}$ ), 5.4 (t, 1 H,  $\text{C}_3'-\text{H}$ ), 4.14~4.28 (t, 2 H,  $J=7.2$  Hz,  $\text{OCH}_2-$ ), 3.18 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 4.8 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.3 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.9 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.15 (d, 6 H,  $\text{SiCH}_3$ )。化合物 11  $^{31}\text{P}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 10.4。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.55 (d, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.65 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 5.8 (m, 2 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ,  $\text{C}_2'-\text{H}$ ), 4.9 (m, 2 H,  $\text{C}_3'-\text{H}$ ,  $\text{C}_4'-\text{H}$ ), 4.24~4.41 (t, 2 H,  $J=7.2$  Hz,  $\text{OCH}_2-$ ), 4.12~4.22 (m, 2 H,  $\text{C}_5'-\text{H}$ ), 3.21 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.7 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), 1.3 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.9 (d, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.1 (m, 6 H,  $\text{SiCH}_3$ )。

#### $\text{N}^2$ -二甲胺基甲基基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3',5'-环磷酸甲酯(8)

方法如上, 磷试剂改用  $\text{CH}_3\text{O-P}(\text{NEt}_2)_2$ , 96  $\mu\text{l}$  (0.5 mmol) 反应产物用硅胶精制  $\text{AcOEt}$ - $\text{MeOH}$  (94:6) 洗脱, 得化合物 8 10 mg, Rf 0.49。FAB-MS  $m/z$ , 529 ( $M+1$ )<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.5 (s, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.46 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 5.02 (s, 1 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ), 4.6 (d, 1 H,  $\text{C}_2'-\text{H}$ ), 4.39 (m, 1 H,  $\text{C}_3'-\text{H}$ ), 3.8 (d, 3 H,  $J_{\text{P-H}}=10.8$  Hz,  $\text{OCH}_3$ ), 3.1 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 0.8 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.02 (s, 6 H,  $\text{SiCH}_3$ )。

#### $\text{N}^2$ -二甲胺基甲基基-2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷-3',5'-环磷酸-N,N-二乙基磷酰胺(9)

方法如上, 7 135.6 mg (0.3 mmol), 磷试剂改用  $\text{P}(\text{NEt}_2)_3$ , 210  $\mu\text{l}$  (0.7 mmol), 产物用硅胶柱层析  $\text{AcOEt}$ - $\text{MeOH}$  (94:6) 洗脱得化合物 9 35 mg, Rf 0.51。FAB-MS  $m/z$  570 ( $M+1$ )<sup>+</sup>。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.62 (s, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.55 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 5.7 (s, 1 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ), 4.2~4.6 (m, 3 H,  $\text{C}_2'$ ,  $\text{C}_3'$ ,  $\text{C}_4'-\text{H}$ ), 4.05 (q, 4 H,  $J=4.5$  Hz,  $\text{N}-\text{CH}_2$ ), 3.2 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.1 (m, 6 H,  $J=4.5$  Hz,  $\text{CH}_3-\text{C}$ ), 0.82 (s, 9 H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.01~0.02 (s, 6 H,  $\text{SiCH}_3$ )。

#### $\text{N}^2$ -二甲胺基甲基基鸟嘌呤核苷-3',5'-环磷酸丁酯(12 和 13)

化合物 10 290 mg 溶解于 1 ml/L  $\text{Bu}_4\text{NF}$  的四氢呋喃溶液 1.5 ml 中, 室温搅拌 4 h, 抽去 THF, 残液用氯仿溶解, 30 ml 水洗涤, 干燥, 浓缩, 硅胶柱层析  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (94:6) 洗脱, 得 50 mg 产品, 进一步用制备型 HPLC (0.78×20 cm, C18 柱, 60% 甲醇洗脱) 纯化, 得两个产物 12 和 13。化合物 12 Rf 0.38,  $t_R$  (min) 21.4, 占 25%。 $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm 302, 235.5。FAB-MS  $m/z$  457 ( $M+1$ )<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.42 (s, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.64 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 5.75 (m, 1 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ), 5.01 (m, 1 H,  $\text{C}_2'-\text{H}$ ), 4.0 (m, 6 H,  $\text{C}_3'-\text{H}$ ,  $\text{C}_4'-\text{H}$ ,  $\text{C}_5'-\text{H}$ ,  $\text{OCH}_2$ ), 3.2 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.2 (m, 7 H,  $\text{CH}_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )。化合物 13, Rf 0.36,  $t_R$  (min) 25.6, 占 46%。 $\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm 302, 235.5。FAB-MS  $m/z$ , 457 ( $M+1$ )<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8.42 (s, 1 H,  $\text{N}=\text{CH}-\text{N}$ ), 7.62 (s, 1 H,  $\text{C}_8-\text{H}$ ), 5.75 (m, 1 H,  $\text{C}_1'-\text{H}$ ), 5.0 (m, 2 H,  $\text{C}_2'-\text{H}$ ,  $\text{C}_3'-\text{H}$ ), 4.42 (s, 1 H,  $\text{C}_4'-\text{H}$ ), 4.0 (m, 4 H,  $\text{OCH}_2-$ ,  $\text{C}_5'-\text{H}$ ), 3.2 (d, 6 H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.2 (m, 7 H,  $\text{CH}_3-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ )。

#### 2'-叔丁基二甲基硅基鸟嘌呤核苷 3',5'-环磷酸丁酯(14)

化合物 10 150 mg 溶于甲醇 2 ml 中, 加入浓氨水 25 ml, 室温搅拌 36 h, 减压浓缩,

硅胶柱层析  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (95:5) 洗脱, 得主要成分 45 mg,  $R_f$  0.34, 收率 30%。

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  nm 255.0. FAB-MS  $m/z$ , 516( $M+1$ )<sup>+</sup>, 152( $G+2H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ )  $\delta$  ppm 7.90(s, 1 H,  $C_8\text{-H}$ ), 5.96(s, 1 H,  $C_1\text{'-H}$ ), 4.86(s, 1 H,  $C_2\text{'-H}$ ), 4.65(s, 1 H,  $C_3\text{'-H}$ ), 4.10(m, 1 H,  $C_4\text{'-H}$ ), 4.7(m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{-}$ ), 1.2(m, 4 H,  $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ ), 0.9(s, 9 H,  $\text{SiC(CH}_3)_3$ ), 0.2(s, 6 H,  $\text{SiCH}_3$ ).

药物对 <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>3</sup>H-UdR 掺入细胞 DNA 和 RNA 合成的影响

#### 一. 肝癌腹水细胞的收集和培养

昆明种小白鼠, 体重 20 g 左右, 按常规方法接种, d 7 处死小鼠, 吸出腹水置生理盐水中, 轻轻振荡后, 离心 4000 r/min, 5 min, 如此洗涤细胞 2 次, 然后放入 Eagle 培养液中 (pH 7.4). 用白细胞计算法求得细胞浓度, 本实验所用细胞浓度约为  $10^7$  cell/ml.

#### 二. <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>3</sup>H-UdR 的掺入实验

Eagle 培养液 0.9 ml 中分别含细胞  $10^7$  个和样品  $10^{-4}$  mol/L, 加入 <sup>3</sup>H-TdR 和 <sup>3</sup>H-UdR 1  $\mu$ ci (含于 0.1 ml Eagle 液中). 置于 37°C 温箱中孵育 3 h 后, 立即放入冰浴中停止反应. 将每管反应液转移到 49-型玻璃纤维滤纸抽滤, 用生理盐水 10 ml, 三氯醋酸 5 ml 洗涤. 乙醇 2 ml 将滤纸抽干, 于 80°C 红外灯下烘干. 闪烁液为含 0.3% TP, 0.03% POPOP 的二甲苯溶液. 测出每个样品的 cpm 值 (即每分钟计算值), 以对照管计数率为 100%, 计算掺入率, 每个样品均重复 3 次, 每组均重复 2 次.

#### 腺苷酸环化酶的分析

用大鼠成骨肉瘤细胞株 ROS 17/2.8, 接种于 24 孔板. 加 <sup>3</sup>H-adenine, 温育 2 h, 使生成 <sup>3</sup>H-ATP<sup>(18)</sup>. 加入 IBMX 抑制磷酸二酯酶的活性, 加待测样品继续保温 15 min. 使 <sup>3</sup>H-ATP 成为 <sup>3</sup>H-cAMP, 经 Dowex AG 50 和  $\text{Al}_2\text{O}_3$  柱分离, 定量测定 <sup>3</sup>H-cAMP 生成量 (以每分钟衰变数衡量). 以 <sup>14</sup>C-cAMP 作回收率测定. <sup>3</sup>H-cAMP 的量反映腺苷酸环化酶的活性.

致谢 北京医科大学仪器分析中心及药学院分析中心测定化合物光谱. 北京医科大学药学院李长岑和基础医学院路明, 李屏凤指导和协助完成化合物的生物活性测定.

#### 参 考 文 献

1. Miller JP. Cyclic nucleotide analogues. in: Cramer H and Schultz J, ed. *Cyclic 3',5'-nucleotides Mechanism of Action*. New York: John Wiley & Sons. 1977; 77.
2. 王 序、张礼和. 环状核苷酸及其衍生物的合成. 药学报 1980; 15:396.
3. 张礼和, 等. 环状核苷酸衍生物的合成. 高等学校化学学报 1985; 6:903.
4. 张礼和, 等. 环状核苷酸的磷酸酯. 磷酸酯的合成及其生物活性的研究. 科学通报 1984; 13:820.
5. Houslay MD. Ion channels controlled by guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 1987; 12:167.
6. Meyer RB, et al. Synthesis of purine nucleoside 3', 5'-cyclic phosphoramidates. *Tetrahedron Lett* 1973; 4:269.
7. Engels J. Synthesis and reactivity of guanosine 3', 5'-phosphoric acid alkyl esters. *Bioorg Chem* 1979; 8:9.
8. Engels J and Reidys R. Synthesis and application of the photolabile guanosine 3', 5'-phosphoric-O-nitro-benzylester. *Experientia* 1978; 34:14.
9. Wesley G, et al. A simple method for the preparation of the individual diastereoisomers of ribonucleoside 3', 5'-cyclic N, N'-dimethyl phosphoramidates. *Synthesis* 1984:27.