

## 六甲密胺衍生物的抗癌构效关系

苏勇庄 潘启超 (中山医学院肿瘤研究所, 广州 510026)

孙梅贞\* 任云峰 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 研究 20 种用乙酸乙酯或乙酰肼取代六甲密胺(HMM)环外 1-6 个甲基的衍生物(AT2071 至 2080, AT 2093 至 2102), 发现 N-甲基数和体外活化析出甲醛量呈正相关关系, 而与抗癌活性并不完全平行。抗癌活性需要 2 个以上-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>基。乙酰肼基似减弱 N-甲基的生物学活性, 而密胺环又可能减弱乙酰肼基的作用。此类药物的作用机理可能是释出活性甲基与生物大分子结合。

**关键词** 六甲密胺衍生物; 甲醛; 抗肿瘤药; 结构-活性

本实验研究 20 种六甲密胺的酯和肼类衍生物, 通过细菌法、精原细胞法、体内和半体内抑瘤试验、体外活化测定甲醛等试验, 探讨构效关系和作用机理, 试图为改进六甲密胺结构提出根据。

1982年3月22日收稿 1983年2月28日修回

\* 上海第一医学院工业卫生研究所

### 材 料 与 方 法

**试验药品** 上海药物研究所合成 HMM 的肼类和酯类衍生物共 20 种。单数编号药为乙酸乙酯类衍生物, 共 10 个, 试验时均配成含 10% 乙醇、5% 吐温 80 的混悬液; 双数编号则为乙酰肼类衍生物, 亦为 10 种, 均配成水溶液应用; 若两类药同批实验时, 用 1% 羧甲基纤维素钠配成混悬液或用 0.02N HCl 配成溶液。

**抗代谢作用试验——微生物法** 用酪乳酸杆菌 ATCC 7469 株, 以 0.1 N NaOH 滴定乳酸生成量, 由耗碱量计算抑菌率。当药物为 0.1 mg/ml, 抑菌率 > 50% 时为阳性<sup>(1)</sup>。每次实验检测 5 种衍生物, 每组 3 个平行管, 共 7 批试验。

**精原细胞法** 按文献方法<sup>(2)</sup>。每侧睾丸注入试药 0.03-0.05 ml (除 AT2071 和 HMM 为

7 mg/ml外,其他药物在 10 mg/ml 以上。

**体内抑瘤试验** 用大鼠 W 256 瘤株及小鼠 L2 瘤株,按文献(3),取体重  $73 \pm (\text{SD}) 15 \text{ g}$  大白鼠,体重  $20 \pm 2 \text{ g}$  小白鼠,♀♂兼有。皮下接种肿瘤 24 h 后开始 ip 给药 qd × 7 d,各药剂量用至大鼠体重减轻,但减轻 20% 以内或出现死亡而死亡率 < 10%,停药次日至第 3 d 处死,称体重及瘤重,计算抑瘤率。

**半体内抑瘤试验** 将药物预先在体外活化与瘤细胞温孵,测定其接种长成肿瘤的能力<sup>(4)</sup>。用苯巴比妥钠喂饲大鼠,诱导肝微粒体酶,制备肝匀浆 S9 上清液<sup>(5)</sup>。取接种后 8 d 的腹水型 W 256 瘤细胞用 1640 培养液加小牛血清、谷氨酰胺、青霉素、链霉素配成  $2 \times 10^6$  细胞/ml 的悬液,试药用 0.02 N HCl 溶液配制,第一次试验配成 15 mg/ml,第二次试验配成 10 mg/ml。

无菌带塞试管分别加入药液 0.1 ml (空白对照组用 0.02 N HCl)、S9 2 ml (灭活酶对照组的 S9 则预先在 60℃ 水浴 30 min)、辅助因子 1 ml (含 NADP 14 mg, G6P 10.4 mg, MgCl 2.1 mg 烟酰胺 3 mg 的磷酸盐缓冲液) 及瘤细胞悬液 5 ml, 37℃ 孵育 1.5 h, 接种于体重  $74 \pm 9 \text{ g}$  大白鼠腋窝皮下, 每组 5 只, 各皮下接种孵育物 1 ml, 10-12 d 后处死, 称体重及瘤重, 计算抑瘤率。

**药物体外活化后测定甲醛的试验** 药物在微粒体-NADPH 产生系统作用下脱烷基, 产生甲醛<sup>(6)</sup>。甲醛与 Nash 试剂反应生成鲜黄色的 3,5-二乙酰-1,4-二氢二甲基吡啶(DDL), 用 72 型分光光度计 420 μm 下测出<sup>(6)</sup>。两次实验结果(每组 2 个平行管)取平均值并以 HMM 释出甲醛的光密度为 100% 计算各衍生物相对脱甲基%。

## 结 果

**细菌法** 20 种衍生物和 HMM 的抑菌率均 < 50%, 示无直接抑菌作用, 即无直接抗代谢作用。

**精原细胞法** 全部结果阴性。

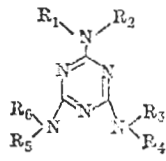
**体内抑瘤试验** 共做 21 次试验, 结果见表。对 W256 肿瘤抑制试验, AT2072, 2073, 2074, 2077, 2078, 2079, 2080, 2093, 2097 等 9 种药物抑瘤率均 < 15%, AT2075, 2076, 2095, 2098, 2099, 2100 等 6 种药物抑瘤率为 15-30%; AT2094 抑瘤率 38% (均  $P > 0.1$ ); AT2096 四次试验, 抑瘤率分别为 45%、52% ( $P < 0.02$ ); 6% 和 19% ( $P$  均  $> 0.2$ ); AT2100 和 AT2102 因药量不足, 未能报告完整结果, 但在带瘤动物出现明显毒性的剂量下, 二者亦无抑瘤作用, 故列为阴性。如是共 19 种衍生物阴性结果, AT2071 三次试验抑瘤率在 47-53% 间, 均  $P < 0.05$ , 表明有抑瘤作用。以前本室<sup>(7)</sup>及其他文献报道 HMM 对 W256 有肯定的抑制肿瘤作用, 本实验两次试验结果, 抑瘤率为 77% 和 82%,  $P < 0.01$ 。

AT 2071, 2095, 2096, 2100 在对 L2 瘤的抑制作用试验中, 抑瘤率为 0-19%, 均  $P > 0.2$ , HMM 在两次试验中, 抑瘤率分别为 45% 和 33%,  $P$  值一次  $< 0.02$ , 另一次  $> 0.1$ , 故全部判断为阴性。

**半体内试验** 第一次试验中, AT 2071 和 HMM 活化后, 瘤细胞被杀灭, 肿瘤几乎不长(平均瘤重 < 0.1 g), 未经活化的 HMM 无杀瘤细胞作用, 第二次试验结果列入表, 其中 HMM, AT2071, 2072, 2096 活化后均有杀瘤细胞作用, 抑瘤率分别为 84%, 70%, 60%, 58%, 均  $P < 0.05$ , AT2075, 2076, 2095, 2099, 2100 的抑瘤率为 -8% 至 45%, 均  $P > 0.05$  判断为阴性结果。

**活化后测定甲醛** 结果列入表。分子内含二个 N-甲基数的 AT2075, 2076, 2093, 2094 和不存在 N-甲基的 AT2079, 2080, 2099, 2100, 2101, 2102 等甲醛生成量为 0 或接近 0, 分子含 3 个 N-甲基的 AT2077, AT 2078 相对脱甲基仅 3.95% 含 4-5 个 N-甲基的衍生物甲醛生成量较多, 其中 AT 2095 最高, 相对脱甲基% 为 22.37%, AT2071 为 11.97%。

Tab 1. Structure-activity relationship of hexamethylmelamine derivatives



H: H

M: CH<sub>3</sub>U: CH<sub>2</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Z: CH<sub>2</sub>CONHNH<sub>2</sub>

	Detn of formaldehyde						Antitumor activity					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	Optical density	Relative degree demethylation	<i>in vivo</i>		<i>in vivo/in vitro</i>	
									W 256	L <sub>2</sub>	Inhibition rate %	p
HMM	M	M	M	M	M	M	0.380	100.00	+	-	84	<0.005
AT 2071	U	H	M	M	M	M	0.046	11.97	+	-	70	<0.02
AT 2072	Z	H	M	M	M	M	0.021	5.53	-	-	60	<0.05
AT 2073	U	U	M	M	M	M	0.007	1.84	-	-	-	-
AT 2074	Z	Z	M	M	M	M	0.030	7.89	-	-	-	-
AT 2075	U	H	U	H	M	M	0	0	-	-	-8	>0.5
AT 2076	Z	H	Z	H	M	M	0.007	1.84	-	-	27	>0.2
AT 2077	U	U	H	M	M	M	0.015	3.95	-	-	-	-
AT 2078	Z	Z	H	M	M	M	0.015	3.95	-	-	-	-
AT 2079	U	H	U	H	U	H	0	0	-	-	-	-
AT 2080	Z	H	Z	H	Z	H	0.008	2.10	-	-	-	-
AT 2093	U	U	U	H	M	M	0	0	-	-	-	-
AT 2094	Z	Z	Z	H	M	M	0	0	-	-	-	-
AT 2095	U	M	M	M	M	M	0.085	22.37	-	-	37	>0.1
AT 2096	Z	M	M	M	M	M	0.030	7.89	-	-	58	<0.05
AT 2097	U	M	U	M	M	M	0.054	14.21	-	-	-	-
AT 2098	Z	M	Z	M	M	M	0.020	5.26	-	-	-	-
AT 2099	U	U	U	U	U	U	0	0	-	-	12	>0.5
AT 2100	Z	Z	Z	Z	Z	Z	0	0	-	-	45	>0.05
AT 2101	U	U	U	H	U	H	0	0	-	-	-	-
AT 2102	Z	Z	Z	H	Z	H	0	0	-	-	-	-

## 讨 论

### 根据实验结果发现如下构效关系

1. 甲醛释出量与 N-甲基数存在正相关关系(相关系数  $r_s = 0.923$ ,  $P < 0.005$ )。即 N-甲基数数目越多, 释出甲醛量越多。半体内抑瘤试验中含甲基数 0-6 不等的几组药, 均有不同程度的抑瘤作用, 以含 4-6 个 N-甲基者较强。但是, N-甲基数-甲醛生成量和抗瘤活性呈不完全的平行关系, 例如含 4 个 N-甲基的 AT2071 甲醛释出量约为含 5 个 N-甲基的 AT2095 的一半, 而在体内及半体内均有肯定的抑瘤作用, AT2095 则仅在半体内抑瘤试验中有边缘活性。

2. 抗癌活性与 N-甲基数及  $-N(CH_3)_2$  数目有关。半体内抑瘤试验阳性的药物 HMM, AT2071 (二者还兼有体内抑瘤作用) 和 AT2072, 2096 等均有 4-6 个 N-甲基, 可能表明体外抗 W 256 肿瘤活性要求 4 个以上 N-甲基, 与 Connors 用 PC6 淋巴瘤实验的结论<sup>(6)</sup> 相符。

Lake 认为带  $-N(CH_3)_2$  基越多的衍生物其生物活性越大<sup>(8)</sup>, Worzalla 等指出,  $-N(CH_3)_2$  基比  $-HNCH_3$  基易于脱甲基<sup>(9)</sup>, 本实验 AT2071 和 2072 带 2 个  $-N(CH_3)_2$  基, 在体内或半体内试验中有抗癌活性, AT2097, 2098 分子只有一个  $-N(CH_3)_2$  基, 另有二个  $-HNCH_3$  基, 则

无体内抗癌活性, 而带 3 个  $-N(CH_3)_2$  基的 HMM 抑瘤作用显著。初步看来, 抗癌活性要求有 2 个以上  $-N(CH_3)_2$  基存在。

3. Connors 发现在半体内试验四甲密胺及五甲密胺有明显的抗 PC6 淋巴瘤作用<sup>(6)</sup>, 但本系列中, 虽含 4 个或 5 个 N-甲基但有胍或酯的化合物却无体内抗癌活性, 提示乙酰胍及乙酸乙酯的存在降低了 N-甲基的生物学作用。已证明氨三乙酰胍(AT 1902)抗 W 256 等肿瘤有很强活性<sup>(10)</sup>, 但与密胺环结合后, 含 6 个乙酰胍基的 AT 2100 无抗癌活性, 推测是乙酰胍基受密胺环影响活性降低。

**作用机理方面** HMM 的作用机理尚有争论。本实验在细菌法和精原细胞法中, 全部药物均显示阴性结果, 说明它们非抗代谢药物。

HMM 的抗癌谱及毒性与羟化剂类似, 但对羟化剂试剂硝基苄吡啶(NBP)无反应<sup>(7)</sup>。本实验在半体内抑瘤试验中, HMM 活化前不能释出甲基, 亦无杀瘤作用, HMM, AT2071, 2072, 2096 等在体外与微粒体-NADPH 产生系统混合孵育后具有显著杀瘤细胞作用, 甲醛释出量亦较高, 从构效关系看, 可能抗癌活性要求 2 个以上  $-N(CH_3)_2$  基, 推想这些药物在体内要经微粒体酶代谢, 释出活性甲基, 再与肿瘤细胞的生物大分子结合从而发挥抗癌作用, 这与 Connors 研究 HMM 的作用机理相似<sup>(11)</sup>,

可视为甲基化剂, 广义上属羟化剂。

本实验结果初步认为上述衍生物中除 AT 2071 外, 均无抗癌作用, 但通过构效关系的研究提示, 改造 HMM 结构时以保留 2 个  $-N(CH_3)_2$  基为宜。

## 参 考 文 献

- 1 Hitchings GH. *Ann NY Acad Sci* 1958 Dec 5; 76 (3):490
- 2 中国医学科学院药物研究所. 一种初筛抗肿瘤药的方法——精原细胞法. *肿瘤防治研究* 1974 年 12 月; (4):72
- 3 中国医学科学院药物研究所. 中草药有效成分的研究(第二分册)药物筛选方法. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1972:113-8
- 4 Connors TA, Grover PL, McLoughlin AM. *Biochem Pharmacol* 1970 Apr; 19 (4):1533
- 5 Rutty CJ, Connors TA. *Ibid* 1977 Dec; 26 (24): 2385
- 6 Nash T. *Biochem J* 1953 Oct; 55 (3):416
- 7 潘启超、曾淑君、刘宗潮、陈小君. 抗癌药六甲密胺的药理研究. *新医学肿瘤研究专辑* 1975 年 11 月, 31 页
- 8 Lake LM, Grunden EE, Johnson BM. *Cancer Res* 1975 Oct; 35 (10):2858
- 9 Worzalla JF, Johnson BM, Ramirez G, Bryan GT. *Ibid* 1973 Nov; 33 (11):2810.
- 10 张覃沐. AT 1902 等几种胍类化合物的药理作用研究. (待发表)
- 11 Connors TA, Rutty CJ, Nguyen-Hoang-Nam, Do-Cao-Thang, Hoellinger H. *Eur J Cancer* 1978 May 17; 14 (6):713

*Acta Pharmacologica Sinica* 1983 Dec; 4 (4) : 276-280

## STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF HEXAMETHYL-MELAMINE DERIVATIVES

SU Yong-zhuang, PAN Qi-chao (*Cancer Institute, Zhongshan Medical College, Guangzhou 510026*)

SUN Mei-zhen, REN Yun-feng (*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

**ABSTRACT** Twenty derivatives of hexamethylmelamine (HMM), from AT2071 to 2080 and from AT2093 to 2102, substituted by carboxymethyl hydrazine or acetic ether groups for the methyl groups of HMM were studied by measurement of released formaldehyde cata-

lyzed by microsomal enzymes, antitumor test against rat W256 carcinosarcoma *in vivo*, *in vitro/in vivo*, microbiological, and spermatogonium tests.

The amount of released formaldehyde after enzymatic activation were 0-22.4% of that

of HMM. There was a correlation between the number of N-methyl groups and the amount of released formaldehyde. HMM and AT2071 showed antitumor activities *in vivo*. The W256 tumor cells, cultivated with drugs activated by liver microsome beforehand, were transplanted to the subcutaneous tissue of rats and the antitumor effect (*in vitro/in vivo*) was judged by the growth of the tumor in rats. The results were expressed by inhibition rate of tumor growth in comparison with controls.

HMM, AT2071, 2072 and 2096 possessed antitumor activity only after microsomal activation. The amount of released formaldehyde from these 4 compounds containing 2 dimethyl nitrogen groups were considerably higher than those from other compounds in this series. The only exception was AT2095 which contained 5 methyl groups released a double amount of formaldehyde as that of AT2071, but possessed only marginal antitumor effect. This suggested that the number of N-methyl groups and the

amount of released formaldehyde were not parallel sheerly with their antitumor activities. Two or more dimethyl nitrogen were necessary for the antitumor activity.

Carboxymethylhydrazine groups reduced the biological effects of N-methyl groups of the melamine, whereas melamine ring reduced also the effects of carboxymethylhydrazine groups.

All compounds showed negative results in spermatogonium test and microbiological assay, suggesting that they might not be antimetabolites and could not prevent DNA synthesis in the cells. The antitumor studies against W256 carcinosarcoma *in vitro/in vivo* suggest that the mechanism of their action may be due to the interaction of the released active methyl group with the biologic macromolecules in the cells.

**KEY WORDS** hexamethylmelamine derivatives; formaldehyde; antineoplastic agents; structure-activity relationship