

Synthesis of Novel Pyrazolinecarbothioamide and Evaluation of Its Anti-Cancer Activity

Dongsoo Koh

새로운 피라졸린카르보티오아미드 화합물의 합성과 항암효과

고 동 수

Received: 19 June 2012 / Accepted: 20 July 2012 / Published Online: 30 September 2012
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract Novel pyrazolinecarbothioamide (5) was synthesized from chalcone (3) which was prepared from 2'-hydroxy-1'-acetonephthone (1) and 2-methoxy benzaldehyde (2). Treatment of pyrazolinecarbothioamide (5) on HCT116 cancer cell showed upregulation of p21 and downregulation of cyclin D1 protein. Flowcytometer analysis revealed that pyrazolinecarbothioamide (5) controls the expression of cell cycle regulatory proteins, which blocks cell cycle progression of HCT116 cancer cell at the G1 phase.

Keywords anti-cancer · cell cycle · chalcone · cyclin D1 · pyrazolinecarbothioamide

Chalcones 화합물들은 광범위한 생리활성을 보이는 flavanones, flavones의 전구체가 될 뿐만 아니라, 그 자체로도 다양한 생리활성을 나타낸다(Bazzaro 등, 2011; Wu 등, 2011; Hsieh 등, 2012). Chalcones과 hydrazine 간의 반응을 통해 생성되는 pyrazoline계열의 화합물들 또한 항염증(anti-inflammatory) (Joshi 등, 2010), 항균(antibacterial) (Siddiqui 등, 2011), 항암(anticancer) (Bano 등, 2011) 작용 등 광범위한 생리학적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 특별히 pyrazoline에 thiocarbonyl 기를 포함하는 피라졸린카르보티오아미드(pyrazolinecarbothioamide) 계열의 화합물들이 다양한 생리 활성을 보이는 것으로 최근 보고되고 있다(Maccioni 등, 2010; Ahsan 등, 2011).

항암과정을 설명하는 다양한 메카니즘 연구 중에서 세포주기 조절은 중요한 연구 영역이다(Gao 등, 2007; Rao 등, 2010).

세포분열 과정에 관여하는 각종 사이클린(Cyclin) 단백질은 세포주기의 단계를 조절하는데, 이중에서도 사이클린 D1 (Cyclin D1)은 G1 단계에서 S 단계로 진행하는데 있어 중요한 역할을 하는 단백질이다(Cordon-Cardo, 1995). 따라서, 사이클린 D1의 발현량을 감소시키면, 세포주기가 G1 단계에 머무르게 되어 암 세포의 비정상적인 세포분열 및 증식을 막아 암 치료에 적용할 수 있다. 본 연구에서는 새로운 합성물질인 피라졸린카르보티오아미드(5)를 사용하여 사이클린 D1의 발현량 감소 여부를 확인하고, 이를 통한 세포주기 진행 억제 효과를 측정하여 이 화합물이 가지는 항암효과를 보고하고자 한다.

Chalcone 3의 합성. 2-히드록시-1-아세토나프톤(1, 1.9 g, 10 mmol)과 2-메톡시벤즈알데히드(2, 1.4 g, 10 mmol)를 20 mL 에탄올에 교반 하면서 녹인 후 온도를 약 3°C 낮춘 다음에 50% KOH용액을 3 mL 천천히 첨가하였다. 그 다음 상온에서 20 시간 교반 후 얼음물에 가하여 냉각시키고, 6 N 염산(HCl)으로 중화시켜 생성된 고체를 감압 여과하여 칼콘(chalcone) 화합물 3을 87% (2.6 g)의 수율로 얻었다. Chalcone 3에서 새로 형성된 탄소-탄소 간의 이중결합은 두 탄소에 붙어 있는 수소들(7.72 ppm, d; 7.91 ppm, d) 사이의 짝지음 상수($J=15.4$ Hz)를 통해 *trans* 이중 결합을 나타내는 것으로 확인되었다. 용융점; 123–124°C. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=15.4$ Hz, 1H), 7.64 (ddd, $J=8.2, 6.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.51 (ddd, $J=8.2, 6.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.41–7.34 (m, 1H), 7.34–7.25 (m, 2H), 7.20 (d, $J=1.7$ Hz, 1H), 7.04–6.97 (m, 1H), 3.87 (d, $J=9.9$ Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 188.4, 159.6, 155.2, 140.1, 132.6, 131.3, 125.5, 125.2, 122.6, 121.1, 120.7, 119.7, 119.1, 116.5, 115.9, 113.4, 111.7, 108.9, 108.6, 50.6.

Pyrazoline 4의 합성. Chalcone 3 (608 mg, 2 mmol)을 에탄올 10 mL에 가한 후 교반 하면서 hydrazine (1 mL)을 적가하고, 약 90°C에서 3 시간 환류 시킨다. 반응 혼합물을 상온으로 냉

D. Koh (✉)
Dept. of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Wolkok-Dong 23-1, Sungbuk-Ku, Seoul 136-714, Republic of Korea
Email: dskoh@dongduk.ac.kr

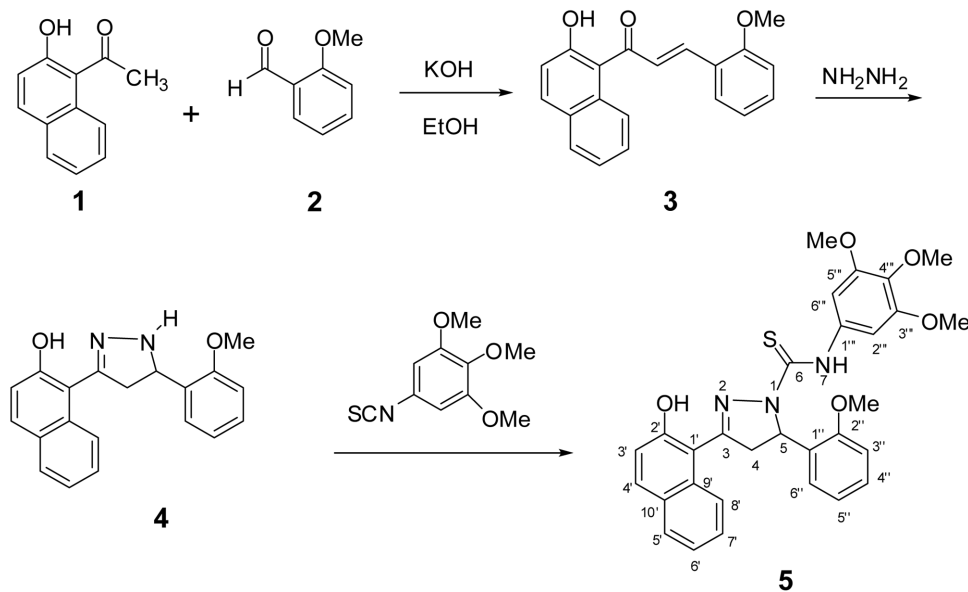


Fig. 1. Synthetic scheme for pyrazolinecarbothioamide (5).

각 시킨 후 형성된 고체를 여과하고 이를 에탄올에서 재결정하여 70% (446 mg)의 수율로 pyrazoline 4를 얻었다. Chalcone 3에 존재하던 탄소-탄소 간의 이중 결합은 pyrazoline 4를 형성함에 따라, 4번- 5번 탄소 간의 단일결합으로 바뀌면서 H-5 (5.10 ppm, dd, $J=3.0, 10.2$ Hz)와 두 개의 H-4 (3.70 ppm, dd, $J=10.2, 16.7$ Hz), H-4' (3.00 ppm, dd, $J=3.0, 16.7$ Hz)를 나타낸다. 4번 탄소에 있는 두 개의 methylene 수소가 서로 다른 화학적 환경에 있어 $^1\text{H-NMR}$ 상 다른 화학적 이동을 나타내고, geminal 짝지움 상수가 16.7 Hz로 매우 큰 것은 pyrazoline 화합물이 보이는 전형적인 양상이다(Acharya 등, 2010). 용융점; 116–118°C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.33 (s, 1H), 8.24 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.73 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 7.54 (td, $J=2.0, 6.8, 6.8$ Hz, 1H), 7.51 (td, $J=2.0, 6.8, 6.8$ Hz, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.43 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.04 (dd, $J=0.8, 8.2$ Hz, 1H), 6.95 (td, $J=0.8, 7.5, 7.5$ Hz, 1H), 5.10 (dd, H-5, $J=3.0, 10.2$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.70 (dd, H-4, $J=10.2, 16.7$ Hz, 1H), 3.00 (dd, H-4, $J=3.0, 16.7$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 156.6, 153.2, 153.1, 133.7, 129.8, 128.4, 127.5, 127.0, 126.3, 125.4, 124.7, 123.9, 122.3, 120.3, 118.5, 110.8, 110.1, 56.4, 55.5, 39.5.

Pyrazolinecarbothioamide 5의 합성. 피라졸린 4 (319 mg, 1 mmol)와 3,4,5-트리메톡시 이소티오시아네이트(225 mg, 1 mmol)를 에탄올 10 mL에 녹이고 약 90°C에서 8 시간 환류한다. 반응 혼합물을 상온으로 낮추고 형성된 고체를 감압 여과하여 pyrazolinecarbothioamide 5 (347 mg, 64%)를 얻었다. 각각의 수소는 correlated spectroscopy (COSY)를 통해 할당하였고, 탄소는 heteronuclear multiple bonded connectivities (HMBC)를 통한 탄소-수소간의 상관관계를 통해 할당하여 Table 1에 나타내었다. 용융점; 188–190°C.

사이클린-D1 (Cyclin D1) 단백질 발현 억제 효과. Pyrazolinecarbothioamide 5 대한 항암 효과를 확인하기 위하여, HCT116 대장암세포에 pyrazolinecarbothioamide 5를 처리한 후 암세포의

성장에 중요한 세포주기 조절 단백질인 사이클린 D1의 발현량을 웨스턴 블롯법(Western blot assay)으로 분석하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다(Koh, 2010). Pyrazolinecarbothioamide 5를 처리하면 시간 의존적으로 사이클린 D1 단백질 발현량이 점차 감소되었다. 이때 대조 단백질인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 양은 변하지 않았으나 세포주기 진행 억제 단백질인 p21 발현이 증가되었다. 이러한 결과는, pyrazolinecarbothioamide 5가 대장암세포에 작용하면 사이클린 D1 단백질 발현은 감소시키고, 세포주기 진행 억제 단백질인 p21 단백질의 양은 증가시켜 암세포의 성장을 억제시킨다는 것을 의미한다.

세포주기 진행 억제 효과. 세포주기 진행과정(cell cycle progression)의 분석은 세포 내 DNA 함량 측정을 통하여 하였다. 세포 주기 중에서 G1 주기 세포는 2N 함량의 DNA를 포함하며, S기 세포는 2N과 4N 사이의 양을, G2기와 M 주기 세포는 4N DNA 양을 포함한다. 사이클린 D1 단백질은 세포 주기의 G1 단계에서 S단계로 진행을 촉진하는 단백질이므로, pyrazolinecarbothioamide 5에 의해 사이클린 D1 단백질이 감소되었을 때, 암세포의 세포 주기 진행이 손상되는 정도를 유세포 분리 측정기(Flowcytometer; BD Science, USA)를 이용하여 조사하였다. HCT116 세포를 웨스턴 블롯 분석법과 동일하게 배양한 후, pyrazolinecarbothioamide 5를 처리 하고 0, 24, 48 시간 후에 트립신-EDTA(1%)을 첨가해 세포를 배양기에서 떼어낸 후, 70% 에탄올로 세포를 고정시켰다. PI (Propidium Iodine)를 30분간 반응하여 세포내 DNA를 염색한 후, DNA 양의 변화를 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 정상적으로 성장하고 있는 HCT116 대장암세포에서 G1 세포 주기를 가지는 세포는 약 50.13%였지만 pyrazolinecarbothioamide 5를 처리한 세포군에서는 처리 24 시간 후 55.08%로 증가하였으며, 처리 48 시간 후에는 60.18%로 증가하였다. 또한, 대조군 세포의 S기는 19.73%이었지만 pyrazolinecarbothioamide 5를 처리한 세포에서 S주기 세포는 처리 24 시간과 48 시간 후에 각각 14.28와 8.04%로 시간에 따라 점차 감소하였다. 이때, 세

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR assignment of pyrazolincarbothioamide 5 through COSY and HMBC. CHn denotes the multiplicity of carbon obtained from the distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) experiment

No.	δ of ¹³ C	CHn	δ of ¹ H	COSY	HMBC
3	156.7	s	-	-	C3-H4, H5
4	45.1	t	2.97 (dd, 18.2, 3.5) 4.12 (dd, 11.2, 3.4)	H4-H5	-
5	58.8	d	6.25 (dd, 11.2, 3.4)	H5-H4	C5-H6"
6	173.2	s	-	-	-
7	-	-	9.86 (s)	-	-
1'	110.7	s	-	-	C1'-H3', H8'
2'	154.7	s	-	-	C2'-H4'
3'	118.1	d	7.21 (d, 9.0)	H3'-H4'	-
4'	131.4	d	7.87 (d, 9.0)	H4'-H3'	C4'-H5'
5'	128.2	d	7.83 (d, 8.0)	H5'-H6'	C5'-H4', H7'
6'	123.0	d	7.33 (ddd, 8.0, 6.9, 1.4)	H6'-H5' H6'-H7'	C6'-H8'
7'	127.2	d	7.48 (ddd, 8.5, 6.9, 1.0)	H7'-H6' H7'-H8'	C7'-H5'
8'	123.8	d	8.09 (d, 8.5)	H8'-H7'	C8'-H6'
9'	132.2	s	-	-	C9'-H4', H5', H7'
10'	127.7	s	-	-	C10'-H3', H6', H8'
1"	129.6	s	-	-	C1"-H4, H3", H5"
2"	155.7	s	-	-	C2"-H4", H6", H2"OMe
3"	111.3	d	7.06 (d, 8.0)	H3"-H4"	C3"-H5"
4"	128.3	d	7.27 (m)	H4"-H3" H4"-H5"	C4"-H6"
5"	120.2	d	6.98 (t, 7.5)	H5"-H4" H5"-H6"	C5"-H3"
6"	125.6	d	7.17 (dd, 7.5, 1.4)	H6"-H5"	C6"-H4"
1'''	135.3	s	-	-	-
2'''6'''	102.2	d	7.09 (s)	-	C2'''-NH7
3'''5'''	152.0	d	-	-	-
4'''	134.3	s	-	-	C4'''-H2''', H4'''OMe
2"-OMe	55.5	q	3.85 (s)	-	-
3''',5'''-OMe	55.8	q	3.72 (s)	-	-
4'''-OMe	60.0	q	3.64 (s)	-	-
2'-OH	-	-	10.42 (bs)	-	-

q: quartet; t: triplet; d: doublet; s: singlet

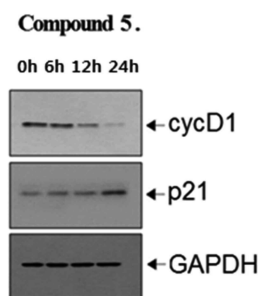


Fig. 2. Effect of pyrazolincarbothioamide (5) on the expression of cell cycle regulatory proteins. After treatment with 20 μM of pyrazolincarbothioamide (5) for 48 h, level of p21 increased, where the cyclin D1 decreased and GAPDH unchanged.

포사멸을 의미하는 sub-G1 세포의 양은 pyrazolincarbothioamide 5를 처리시간에 따라 0.99에서 3.12%로 점차 증가 되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과를 통해 pyrazolincarbothioamide 5는

HCT116 대장암 세포의 G1 단계에서 S 단계로의 진행을 차단하여 암세포의 성장을 억제시킬 수 있다는 사실을 확인할 수 있다. **대장암 세포주 성장 억제 효과.** Pyrazolincarbothioamide 5에 처리에 의해 HCT116 대장암 세포의 세포주기 진행이 억제되었으므로, 이로 인한 HCT116 대장암 세포의 성장능이 억제되는지를 CCK-8 키트(CellCounting Kit-8; Dojindo, Japan)를 이용하여 측정하였다. HCT116 대장암세포를 96-well 세포 배양판에 1×10⁴개 되도록 분주한 후 0, 5, 10, 20 μM 농도의 pyrazolincarbothioamide 5 화합물을 처리하고, 각각 24 시간과 48 시간 후에 CCK-8 용액 10 μL를 첨가하였다. 2 시간 후에 세포배양액의 흡광도를 450 nm에서 측정하여 세포 생존능을 분석하였다. 그 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 아무 처리하지 않은 대조 세포군에서는 세포 성장능이 시간에 따라 증가하였지만, pyrazolincarbothioamide 5를 처리한 세포군에서는 처리 농도와 시간 의존적으로 세포 성장이 감소되었다. 이러한 결과는 pyrazolincarbothioamide 5 화합물에 의해 대장암세포의 세포 주기 진행이 억제되어 궁극적으로 암세포 성장이 저해되었

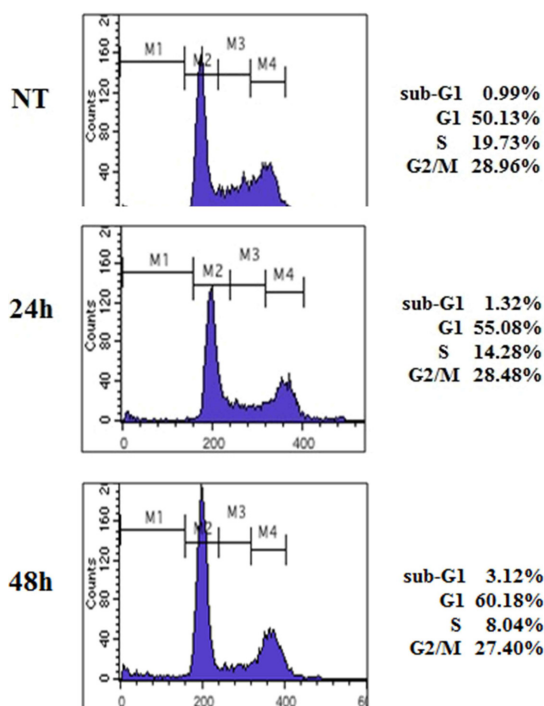


Fig. 3. Pyrazolinecarbothioamide (5) treatment arrested the cell cycle progression at the G1 phase for HCT116 cancer cell.

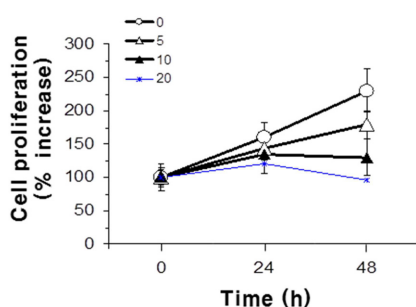


Fig. 4. Effect of pyrazolinecarbothioamide (5) on the cell survival of HCT116 cells. HCT116 cells were treated with different doses (0, 5, 10, or 20 μ M) of pyrazolinecarbothioamide (5) for varying lengths of time (24–48 h). Cell proliferation rate was determined by Cell Counting Kit-8.

음을 의미한다.

본 연구에서는 새로운 pyrazolinecarbothioamide 5를 합성하였고 이 화합물을 HCT116 대장암 세포에 처리하였을 때, 세포 주기 조절 단백질인 사이클린 D1의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 이 같은 결과로 이 화합물은, 세포 주기를 G1 단계에서 S단계로 진행되는 것을 저해하였고, 이로 인한 암세포의 성장을 억제하는 항암효능을 나타내었다. 본 연구는 기존의 항암 연구(Havrylyuk 등, 2009; Congui 등, 2010)에 주로 사용되는 NCI (National Cancer Institute) 인간 암세포주에 대한 무작위 screening과는 달리, 항암의 원인을 우선 규명을 하고 항암 효과를 측정하는 방법을 사용하였고, 이는 추후 구조-활성연구 등 체계적인 연구를 하는데 기초를 제공한다. 또한 구조적인 면에서, 최근 항암 효과를 나타내는 것으로 보고된(Bano 등, 2011) pyrazoline 계열의 화합물은 2번 질소에 벤젠 설폰아미드

드를 포함하는 특이성을 보이거나 기존에 보고된 다른 pyrazoline 화합물들처럼 3번, 5번 위치가 모두 벤젠 고리로 치환된 공통점을 가지고 있다. 하지만 이번에 보고하는 pyrazoline-carbothioamide 5는 2번 위치에 thioamide기를 가질 뿐만 아니라, 특히 5번 위치에 일반적인 벤젠고리 대신 나프틸 고리를 가지는 구조적인 특성을 지니고 있는 신규화합물이다. 현재 이 계열의 다양한 유도체가 합성되고 있고 이를 통한 구조-활성관계를 규명하여 새로운 형태의 항암제 선도물질을 개발하려 한다.

감사의 글 이 논문은 2011-12년도 동덕여자대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것이다.

References

- Acharya BN, Saraswat D, Tiwari M, Shrivastava AK, Ghorpade R, Bapna S et al. (2010) Synthesis and antimalarial evaluation of 1, 3, 5-trisubstituted pyrazolines. *Eur J Med Chem* **45**, 430–8.
- Ahsan MJ, Samya JG, Khalilullah H, Bakht MA, and Hassan MZ (2011) Synthesis and antimycobacterial evaluation of 3a,4-dihydro-3H-indeno [1,2-c] pyrazole-2-carboxamide analogues. *Eur J Med Chem* **46**, 5694–7.
- Bano S, Javed K, Ahmad S, Rathish IG, Singh S, and Alam MS (2011) Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents. *Eur J Med Chem* **46**, 5763–8.
- Bazzaro M, Anchoori RK, Mudiam KMR, Issaenko O, Kumar S, Karanam B et al. (2011) Alpha-beta-Unsaturated carbonyl system of chalcone-based derivatives is responsible for broad inhibition of proteasomal activity and preferential killing of human papilloma virus (HPV) positive cervical cancer cells. *J Med Chem* **54**, 449–56.
- Congui C, Onnis V, Vesce L, Castronia M, and Pisano C (2010) Synthesis and in vitro antitumor activity of new 4,5-dihydroxypyrazol derivatives. *Bioorg Med Chem* **18**, 6238–48.
- Cordon-Cardo C (1995) Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* **147**, 545–60.
- Gao J, Liu Y-G, Zhou Y, Boxer LM, Woolley FR, and Zingaro RA (2007) Artificial zinc(II) complexes regulate cell cycle and apoptosis-related gene in tumor cell lines. *ChemBioChem* **7**, 332–40.
- Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Zaprutko L, Gzella A, and Lesyk R (2009) synthesis of novel thiazolone-based compounds containing pyrazolone moiety and evaluation of their anti-cancer activity. *Eur J Med Chem* **44**, 1396–404.
- Hsieh C-T, Hsieh T-J, El-Shazly M, Chuang D-W, Tsai Y-H, Yen C-T et al. (2012) Synthesis of chalcone derivatives as potential anti-diabetic agents. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 3912–5.
- Joshi RS, Mandhane PG, Diwakar SD, Dabhade SK, and Gill GH (2010) Synthesis, analgesic and anti-inflammatory activities of some novel pyrazoline derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 3721–5.
- Koh D (2010) Synthesis of salens and their cobalt complexes from meso-1,2-diamine and their anti-cancer property. *J Appl Biol Chem* **53** 108–11.
- Maccioni E, Alcaro S, Orallo F, Cardia MC, Distinto S, Costa G et al. (2010) Synthesis of new 3-aryl-4,5-dihydropyrazole-1-carbothioamide derivatives. An investigation on their ability to inhibit monoamine oxidase. *Eur J Med Chem* **45**, 4490–8.
- Rao YK, Kao T-Y, Ko J-L, and Tzeng Y-M (2010) Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G1 phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 6508–12.
- Siddiqui ZN, Musthafa TNM, Ahmad A, and Khan AU (2011) Thermal solvent-free synthesis of novel pyrazolylchalcones and pyrazolines as potential antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 2860–5.
- Wu J, Li J, Cai Y, Pan Y, Ye F, Zhang Y et al. (2011) Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. *J Med Chem* **54**, 8110–23.