

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.04.0429

· 论 著 ·

新型二硫代二丙酰胺类衍生物的设计合成及其血管内皮细胞保护活性

杜红丽, 王琳召, 陈安妮, 夏锦, 胡云英, 张国庆*

海军军医大学(第二军医大学)东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

[摘要] **目的** 以卡托普利为先导化合物, 设计合成一类新型二硫代二丙酰胺类衍生物, 并考察其血管内皮细胞保护活性。**方法** 保留先导物卡托普利结构上的巯基丙酰胺骨架和侧链甲基, 对脯氨酸片段进行结构改造并进行二聚化, 设计合成了5个二硫代二丙酰胺类衍生物。以人脐静脉内皮细胞为实验细胞株, 利用400 μmol/L过氧化氢溶液刺激3 h建立氧化诱导损伤细胞模型, 以卡托普利为阳性对照药测试目标化合物对血管内皮细胞的保护活性。**结果** 所有目标化合物结构均通过核磁共振波谱(¹HNMR、¹³CNMR)和电喷雾电离质谱法(ESI-MS)确证。初步的血管内皮细胞保护活性测试结果表明, 除化合物4c外4个目标化合物均具有不同程度的血管内皮细胞保护活性, 其中化合物4e即3,3'-二硫(*N*-([1,1'-联苯]-3-甲基)-2-甲基丙酰胺)活性最优。**结论** 将卡托普利分子结构上的脯氨酸替换为4-甲基苄胺及4-叔丁基苄胺等相对较大的疏水性片段并进行二聚化, 能显著改善其血管内皮细胞保护活性。

[关键词] 卡托普利; 设计合成; 血管内皮细胞; 保护活性

[中图分类号] R 972.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2020)04-0429-04

Synthesis and vascular endothelial cell protective activity of novel dithiodipropionamide derivatives

DU Hong-li, WANG Lin-zhao, CHEN An-ni, XIA Jin, HU Yun-ying, ZHANG Guo-qing*

Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To design and synthesize a series of novel dithiodipropionamide derivatives based on precursor captopril, and to investigate their vascular endothelial cell protective activities. **Methods** Based on the structure of captopril, we designed and synthesized five dithiodipropionamide derivatives, whose mercapto propionamide and methyl side chain were retained and the proline were modified. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were exposed to H₂O₂ at a concentration of 400 μmol/L for 3 h. Then *in vitro* endothelial cell protective activities of the target compounds were determined using captopril as the positive control drug. **Results** The target compounds were confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹HNMR and ¹³CNMR) and electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS). Preliminary results of vascular endothelial cell protective activity test showed that, except for compound 4c, all the four target derivatives exhibited cytoprotective activity to different extents. The compound 4e, namely 3,3'-disulfide (*N*-([1,1'-biphenyl]-3-methyl)-2-methylpropionamide) had the best activity. **Conclusion** The proline structure on captopril substituted by relatively large hydrophobic fragments, such as 4-methylbenzylamine and 4-tert-butylbenzylamine, followed by dimerization, can improve protective activity of vascular endothelial cells.

[Key words] captopril; design and synthesize; vascular endothelial cells; protective activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(4): 429-432]

心血管疾病是致死率和致残率最高的疾病之一, 严重危害着人类健康^[1]。血管内皮细胞不仅能阻断血液与血管壁的直接接触, 而且具有分泌血管活性物质、血管保护因子及血管生长因子等生物活性因子的功能^[2-4]。血管内皮细胞受损会引起高血压、心力衰竭及动脉粥样硬化等心脑血管疾病的发生, 这些疾病也会加重血管内皮的损伤^[5-7], 因此

研发血管内皮细胞保护类药物已成为治疗心脑血管疾病的研究热点之一^[8]。

卡托普利是临床常用的降压药, 可通过抑制血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)活性、降低醛固酮分泌等降低血压, 具有间接的血管内皮细胞保护活性^[9]。卡托普利具有毒性低、安全性高及药代动力学性质明确等众多优势, 其结构主要

[收稿日期] 2019-11-06

[接受日期] 2020-01-06

[作者简介] 杜红丽, 硕士生, 药师. E-mail: Hongly_dsmmu@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com

由脯氨酸、侧链甲基和巯基丙酰胺骨架3个部分组成,以其为先导物进行结构改造的空间较大且化学合成难度相对较低。因此,我们选择从卡托普利出发研发新型血管内皮细胞保护类药物。

鉴于巯基在生物体的组成、生物活性及药物代谢方面的重要作用^[10-11],并基于卡托普利结构上的巯基丙酰胺核心骨架,本研究选择从先导物卡托普利结构中的脯氨酸进行结构改造,再进行二聚化,设计并合成了一系列二硫代二丙酰胺类衍生物,通过体外血管内皮细胞保护活性实验考察其对氧化诱导损伤的血管内皮细胞的保护活性,旨在发现全新结构的血管内皮细胞保护剂。

1 仪器和试剂

合成所用试剂均为国药集团化学试剂有限公司或上海毕得医药科技有限公司生产的分析纯或化学纯试剂,GF254薄层色谱分析硅胶板和柱层析硅胶为青岛海洋化工有限公司生产。核磁共振波谱

(¹HNMR、¹³CNMR)用Bruker AC-300P或Bruker AC-600P型核磁共振仪测试,溶剂为DMSO-d₆或氯仿(CDCl₃),内标为四甲基硅烷。采用Agilent 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS质谱仪进行电喷雾电离质谱分析(electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS)。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购于中国科学院上海细胞库。DMEM培养液、过氧化氢(H₂O₂)和卡托普利(纯度≥98%)均购于美国Sigma公司。

2 方法和结果

2.1 目标化合物的合成 以甲基丙烯酸(1)和硫代乙酸为起始原料,经Michael加成生成中间体2,再与不同的芳香苄胺缩合生成中间体3a~3e,最后用NaOH水解除除酯基,得到目标化合物4a~4e,具体的合成路线如图1所示。

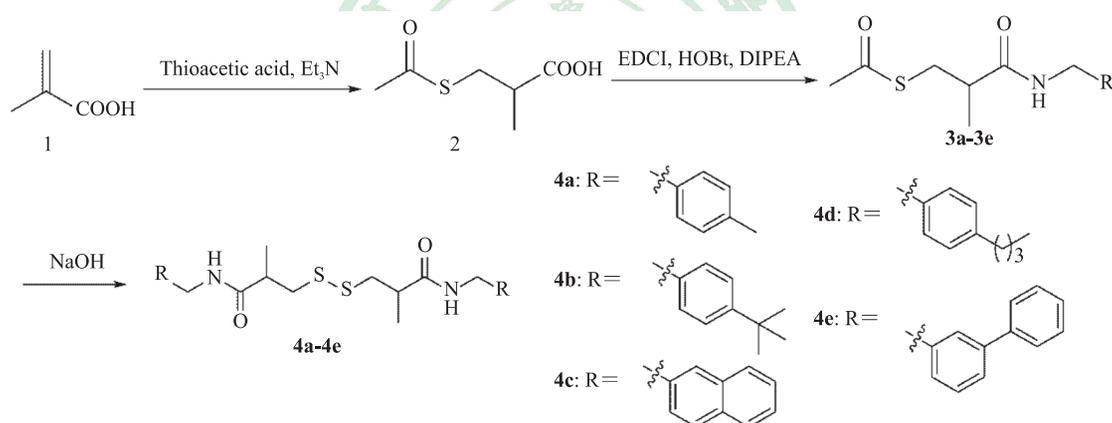


图1 目标化合物4a~4e的合成路线

Fig 1 Synthesis of target compounds 4a-4e

Et₃N: Triethylamine; EDCI: *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride; HOBT: 1-Hydroxybenzotriazole; DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

2.1.1 3-乙酰巯基-2-甲基丙酸(2)的制备 将甲基丙烯酸3.0 g(34.87 mmol)溶于50 mL无水二氯甲烷,加入催化量三乙胺,然后在氮气保护、室温、搅拌条件下滴加溶于50 mL无水二氯甲烷的硫代乙酸5.3 g(69.63 mmol),室温搅拌反应15 h,后减压蒸除硫代乙酸和有机溶剂,得到3.8 g淡黄色固体粗品中间体2。

2.1.2 *S*-(2-甲基-3-(4-甲基苄基氨基)-3-氧代丙基)乙硫醇酸酯(3a)的制备 称取1.0 g(6.17 mmol)粗品2、1.8 g(9.26 mmol)1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、1.25 g(9.26 mmol)1-羟基苯并三唑、1.5 mL *N,N*-二异丙

基乙胺及1.5 g(12.34 mmol)4-甲基苄胺溶于40 mL无水二氯甲烷,在氮气保护、室温下搅拌反应过夜。反应完成后,向反应液中加入50 mL二氯甲烷,再依次用5%柠檬酸洗2次、饱和NaCl溶液洗1次,无水硫酸钠干燥后减压蒸除有机溶剂,硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得白色固体1.1 g(4.15 mmol),两步收率45%。¹HNMR(400 MHz, CDCl₃)化学位移: 7.13(q, *J*=8.1 Hz, 4H), 5.81(s, 1H), 4.38(d, *J*=5.5 Hz, 2H), 3.08(dd, *J*=13.6、7.7 Hz, 1H), 2.82(dd, *J*=13.6、6.2 Hz, 1H), 2.40(dd, *J*=13.8、7.0 Hz, 1H), 2.29(d, *J*=10.5 Hz, 6H), 1.19(d, *J*=7.0 Hz, 3H)。

中间体**3b**~**3e**均参照化合物**3a**合成方法合成。

2.1.3 3,3'-二硫(2-甲基-N-(4-甲基苄基)丙酰胺)(**4a**)的制备 称取0.9 g(3.4 mmol)中间体**3a**溶于5 mL四氢呋喃,加入3 mol/L NaOH水溶液30 mL,室温搅拌反应6 h后加入2 mol/L硫酸调节pH至6~7,二氯甲烷萃取3次,合并有机层,无水硫酸钠干燥,减压蒸除有机溶剂,硅胶柱分离(石油醚:乙酸乙酯=5:1),得到目标化合物**4a**,收率69%。¹HNMR(400 MHz, CDCl₃)化学位移: 7.16(d, *J*=8.0 Hz, 4H), 7.13(d, *J*=8.0 Hz, 4H), 6.52(s, 1H), 6.42(s, 1H), 4.24~4.42(m, 4H), 2.94~3.12(m, 2H), 2.53~2.72(m, 4H), 2.30(s, 6H), 1.20(d, *J*=6.5 Hz, 3H), 1.14(d, *J*=6.8 Hz, 3H)。¹³CNMR(150 MHz, CDCl₃)化学位移: 173.95, 136.48, 134.50, 128.67, 127.17, 42.71, 41.25, 40.38, 39.55, 20.45, 16.74, 16.45。ESI-MS(*m/z*): 445.2(M+H)⁺。C₂₄H₃₂N₂O₂S₂[M+H]⁺计算值为445.1978, 实测值为445.1980。

其他目标化合物**4b**~**4e**均参照**4a**合成方法合成。

2.1.4 3,3'-二硫(N-(4-叔丁基苄基)-2-甲基丙酰胺)(**4b**)的结构鉴定 白色固体,收率75%。¹HNMR(400 MHz, CDCl₃)化学位移: 7.25(d, *J*=8.0 Hz, 4H), 7.13(d, *J*=8.0 Hz, 4H), 6.55(s, 1H), 6.39(s, 1H), 4.25~4.33(m, 4H), 3.03(s, 1H), 2.89(s, 1H), 2.60(d, *J*=8.5 Hz, 4H), 1.21~1.30(m, 18H), 1.05(d, *J*=8.0 Hz, 3H), 1.03(d, *J*=8.0 Hz, 3H)。¹³CNMR(150 MHz, CDCl₃)化学位移: 174.00, 149.82, 134.49, 126.94, 124.93, 42.61, 41.34, 40.38, 39.52, 33.87, 30.72, 16.83, 16.47。ESI-MS(*m/z*): 529.2(M+H)⁺。C₃₀H₄₄N₂O₂S₂[M+H]⁺计算值为529.2917, 实测值为529.2921。

2.1.5 3,3'-二硫(2-甲基-N-(萘-2-基甲基)丙酰胺)(**4c**)的结构鉴定 白色固体,收率82%。¹HNMR(400 MHz, DMSO-d₆)化学位移: 8.62(s, 2H), 7.74~7.90(m, 8H), 7.41~7.50(m, 6H), 4.51(s, 4H), 2.77~2.99(m, 6H), 1.12(d, *J*=8.4 Hz, 6H)。¹³CNMR(150 MHz, CDCl₃)化学位移: 173.75, 136.91, 132.69, 131.89, 127.70, 127.35, 127.27, 126.01, 125.60, 125.45, 125.00, 42.02, 41.92, 39.87, 17.51。ESI-MS(*m/z*): 517.2(M+H)⁺。C₃₀H₃₂N₂O₂S₂[M+H]⁺计算值为517.1978, 实测值为517.1981。

2.1.6 3,3'-二硫(N-(4-丁基苄基)-2-甲基丙

酰胺)(**4d**)的结构鉴定 白色固体,收率77%。¹HNMR(400 MHz, CDCl₃)化学位移: 7.08~7.17(m, 8H), 6.76(s, 1H), 6.58(s, 1H), 4.35(s, 4H), 3.08(dd, *J*=10.2, 7.8 Hz, 1H), 2.94(dd, *J*=10.7, 7.9 Hz, 1H), 2.63~2.79(m, 8H), 1.53~1.59(m, 4H), 1.30~1.34(m, 4H), 1.18(d, *J*=6.1 Hz, 3H), 1.11(d, *J*=6.6 Hz, 3H), 0.91(t, *J*=7.3 Hz, 6H)。¹³CNMR(150 MHz, CDCl₃)化学位移: 174.07, 141.51, 128.01, 127.11, 42.68, 41.31, 40.32, 39.44, 34.65, 33.02, 21.73, 16.81, 16.48, 13.33。ESI-MS(*m/z*): 529.2(M+H)⁺。C₃₀H₄₄N₂O₂S₂[M+H]⁺计算值为529.2917, 实测值为529.2932。

2.1.7 3,3'-二硫(N-(1,1'-联苯]-3-基甲基)-2-甲基丙酰胺)(**4e**)的结构鉴定 白色固体,收率83%。¹HNMR(400 MHz, CDCl₃)化学位移: 7.54(t, *J*=7.0 Hz, 4H), 7.49(s, 1H), 7.38~7.47(m, 7H), 7.33(q, *J*=6.7 Hz, 4H), 7.16~7.26(m, 2H), 6.73(d, *J*=5.3 Hz, 1H), 6.56(s, 1H), 4.44(s, 4H), 2.91~3.10(m, 2H), 2.51~2.68(m, 4H), 1.17(d, *J*=6.3 Hz, 3H), 1.06(d, *J*=6.8 Hz, 3H)。¹³CNMR(150 MHz, CDCl₃)化学位移: 174.17, 140.91, 140.13, 138.10, 128.44, 128.17, 126.82, 126.50, 126.00, 125.82, 125.55, 42.88, 41.28, 40.49, 39.50, 16.82, 16.48。ESI-MS(*m/z*): 569.2(M+H)⁺。C₃₄H₃₆N₂O₂S₂[M+H]⁺计算值为569.2291, 实测值为569.2295。

2.2 不同浓度H₂O₂对HUVEC活力的影响 分别取100、200、400、600、800 μmol/L浓度H₂O₂溶液处理HUVEC, 3 h后观察细胞形态, 利用CCK-8法测定细胞存活率(*n*=3), 结果分别为(94.15±1.87)%、(81.48±3.49)%、(63.88±2.86)%、(42.17±6.45)%、(13.35±1.13)%。空白对照组细胞存活率为(100.00±2.34)%。当H₂O₂溶液浓度为100 μmol/L或200 μmol/L时, HUVEC有一定损伤; H₂O₂溶液浓度提高至400 μmol/L时, 细胞存活率约65%, 显微镜下观察到细胞开始收缩变圆并出现部分脱落等现象; 继续提高H₂O₂溶液的浓度至600 μmol/L或800 μmol/L, 细胞存活率均大幅度降低, 显微镜下观察到细胞出现大面积损伤破裂和大片的脱落。综上分析, 选取400 μmol/L的H₂O₂溶液处理3 h建立氧化诱导损伤细胞模型。

2.3 目标化合物对氧化诱导损伤HUVEC的保护活性 取处于对数生长期的HUVEC接种于96孔板, 随机分成4组: 正常对照组, 常规培养; H₂O₂诱导损伤模型组, 常规培养24 h后换成含

400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养液处理 3 h; 阳性对照组, 在含 100 $\mu\text{mol/L}$ 卡托普利的培养液中培养 24 h 后, 换成含 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养液处理 3 h; 给药组, 在含 100 $\mu\text{mol/L}$ 或 200 $\mu\text{mol/L}$ 目标化合物的培养液中培养 24 h 后, 换成含 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养液处理 3 h。用 CCK-8 法测定细胞存活率, 结果见表 1。目标化合物 **4a**、**4b**、**4d** 和 **4e** 对氧化诱导损伤的 HUVEC 均有不同程度的保护活性。其中化合物 **4e** 的保护活性最优, 相对于 H_2O_2 处理的模型组, 经 100 $\mu\text{mol/L}$ 与 200 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 **4e** 保护后, 细胞存活率分别提高了 22.16% 和 14.43%。

表 1 目标化合物对氧化诱导损伤 HUVEC 的保护活性

Tab 1 Protective activity of target compounds on oxidative damage of HUVECs

(%), $n=3, \bar{x} \pm s$

Compound	Survival rate	
	100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2	200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2
L-captopril	59.23 \pm 5.12	
4a	78.74 \pm 4.98	72.42 \pm 5.66
4b	71.36 \pm 3.91	64.68 \pm 2.87
4c	49.53 \pm 6.44	54.09 \pm 6.52
4d	79.04 \pm 4.59	76.31 \pm 7.18
4e	86.04 \pm 2.10	78.31 \pm 5.39

The survival rates of normal control group and model group were 100% and 63.88%, respectively. HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

3 讨论

血管内皮细胞损伤引起的血管内皮功能障碍是心脑血管疾病发生的始发因素和关键环节, 研发血管内皮细胞保护类药物是治疗心脑血管疾病的重要策略和研究热点之一。本研究从老药卡托普利出发, 以一种简便、高效的方法合成了 5 个二硫代二丙酰胺类衍生物。生物活性测试结果显示, 除化合物 **4c** 外 4 个目标化合物均表现出不同程度的血管内皮细胞保护活性, 尤其是化合物 **4e** 对氧化诱导损伤血管内皮细胞具有最优保护活性, 值得进一步研究。此外, 通过分析目标化合物的结构与生物活性结果可初步得到以下构效关系: 对比目标化合物 **4a**、**4b**、**4d** 和 **4e** 与先导化合物卡托普利, 可发现脯氨酸替换成 4-甲基苄胺及 4-叔丁基苄胺等结构并进行二聚化有助于活性的改善; 化合物 **4c** 无血管内皮细胞保护活性, 说明不适合选取 2-萘甲胺

替代脯氨酸; 相对于化合物 **4a**、**4b**、**4d**, 化合物 **4e** 的保护活性更优, 表明在苄胺的苯环上引入苯基比烷基活性更优。综上所述, 本研究发现了新型二硫代二丙酰胺类的血管内皮细胞保护剂, 并获得了氧化诱导损伤血管内皮细胞具有较高保护活性的化合物 **4e**, 但其作用机制以及药代动力学性质有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 朱曼璐, 王文, 王拥军, 等. 《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33: 1-8.
- [2] CAHILL PA, REDMOND E M. Vascular endothelium—gatekeeper of vessel health[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 248: 97-109.
- [3] XU F, LIU Y, ZHU X, LI S, SHI X, LI Z, et al. Protective effects and mechanisms of vaccarin on vascular endothelial dysfunction in diabetic angiopathy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: E4587. doi: 10.3390/ijms20184587.
- [4] KRÜGER-GENGE A, BLOCKI A, FRANKE R P, JUNG F. Vascular endothelial cell biology: an update [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: E4411. doi: 10.3390/ijms20184411.
- [5] DAVIGNON J, GANZ P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2004, 109(23 Suppl 1): III 27- III 32.
- [6] FÉLÉTOU M. Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2016, 67: 373-387.
- [7] LEVINE A B, PUNIHAOLE D, LEVINE T B. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications[J]. *Cardiology*, 2012, 122: 55-68.
- [8] CHATZIZISIS Y S, COSKUN A U, JONAS M, EDELMAN E R, FELDMAN C L, STONE P H. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49: 2379-2393.
- [9] GAVRAS H, BRUNNER H R. Role of angiotensin and its inhibition in hypertension, ischemic heart disease, and heart failure[J]. *Hypertension*, 2001, 37(2 Pt 2): 342-345.
- [10] WINTERBOURN C C, HAMPTON M B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45: 549-561.
- [11] 张力文, 尚中博, 常志显, 祁志冲, 李德亮. 巯基检测方法研究进展[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2018, 48: 430-443.

[本文编辑] 尹 茶