

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01223

· 论 著 ·

新型苦参碱衍生物的设计合成及其体外抗炎活性

郭俊香¹, 梁萌¹, 张春梅¹, 王亮^{1,2}, 胡宏岗^{1*}

1. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433
2. 烟台大学药学院药物化学教研室, 烟台 264005

[摘要] **目的** 设计合成新型苦参碱衍生物, 并研究其体外抗炎活性。 **方法** 以槐果碱为起始原料, 经硫代和经典的 Michael 加成反应得到 10 个目标化合物; 所得化合物均考察了其体外对抗炎因子 TNF- α 释放以及 NF- κ B 转染的影响。 **结果** 合成的目标化合物经 ¹H NMR 和 ESI-MS 确证其结构。所得化合物体外对 TNF- α 的释放和 NF- κ B 转染均具有一定的抑制作用, 其中化合物 **1f** 对 TNF- α 的释放抑制作用最强, IC₅₀ 为 9.4 μ mol/L。 **结论** 苦参碱的 13 位引入小的直链氨基侧链能够增强其抗炎活性。

[关键词] 苦参碱; 衍生物; 肿瘤坏死因子 α ; NF- κ B

[中图分类号] R 971.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)11-1223-04

Synthesis of novel matrine derivatives and their *in vitro* anti-inflammatory activity

GUO Jun-xiang¹, LIANG Meng¹, ZHANG Chun-mei¹, WANG Liang^{1,2}, HU Hong-gang^{1*}

1. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To design and synthesize a series of novel matrine derivatives and to investigate their *in vitro* anti-inflammation activities. **Methods** Ten novel matrine analogues were synthesized *via* thiosulfate reaction and classical Michael addition using sophocarpine as the starting material. The effects of all the analogues on TNF- α production and NF- κ B transcriptional activity were evaluated *in vitro*. **Results** The synthesized compounds were confirmed correct by ¹H NMR and ESI-MS. Biological studies showed that the synthetic derivatives had inhibitory effects against TNF- α production and NF- κ B transcriptional activity. Compound **1f** had the strongest inhibitory effect against TNF- α production, with an IC₅₀ value of 9.4 μ mol/L. **Conclusion** Introduction of liner small substitutes at the 13-position of matrine can enhance its anti-inflammatory activity.

[Key words] matrine; derivatives; tumor necrosis factor- α ; NF- κ B

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1223-1226]

苦参为豆科植物苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 的干燥根, 具有强心、抗炎、抗肿瘤、抗菌、免疫抑制等多种药理活性^[1-5]。它主要含生物碱和黄酮类化合物, 生物碱以苦参碱和氧化苦参碱为主, 另含有微量的槐果碱、槐胺碱、槐定碱等。苦参碱和槐果碱的化学结构如图 1 所示, 二者均属于四环的喹啉啶类, 分子骨架可看作 2 个喹啉啶的杂合体, 区别在于槐果碱比苦参碱多一个 α, β -不饱和双键。本课题组的前期研究工作表明^[6-8], 苦参碱对于 LPS 诱导的小鼠血清及培养的大鼠枯否细胞的炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的升高都具有抑制作用。其他的研究小组

也报道了有关苦参碱和氧化苦参碱通过抑制核转录因子 (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 的活性而发挥抗炎作用^[9-10]。

鉴于苦参碱良好的药理活性, 硫原子在有机体的组成、生理活性和药物代谢等方面的重要作用, 本研究选择了常见的氨基侧链作为亲核试剂, 设计并合成了一系列硫代苦参碱衍生物, 旨在为其构效关系的研究及其抗炎药物的研发提供新的思路和依据。在此研究中, 我们共合成了 10 个苦参碱衍生物 **1a~1j** 以及 1 个考察硫原子对化合物活性影响的对照化合物 **5**。所得的化合物均进行了体外对 TNF- α

[收稿日期] 2011-04-13

[接受日期] 2011-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金 (20902109). Supported by National Natural Science Foundation of China (20902109).

[作者简介] 郭俊香, 硕士生. E-mail: guojunxiang929@hotmail.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871225, E-mail: huhonggang_fox@msn.com

分泌和 NF- κ B 转录的抑制活性研究。

1 试剂、菌株和仪器

合成所用试剂均为上海化学试剂公司化学纯或分析纯试剂,柱层析用硅胶为青岛海洋化工有限公司生产。核磁共振氢谱用 Bruker Spectmspin AC-P600 型核磁共振仪测定,CDCl₃ 为溶剂,TMS 为内标;元素分析采用 MOD-1106 型自动元素分析仪测定。活性测试所用 RPMI 1640 培养基、脂多糖、卡西霉素均为 Sigma 公司产品;细胞株 RAW264.7 和 L929 购自中国科学院细胞学研究所。

2 方法和结果

合成路线的设计过程中我们发现苦参碱可修饰的结构位点很少且不活泼,而槐果碱与其结构非常相似,多一个非常活泼的 α,β -不饱和双键基团,所以,我们设想通过槐果碱,经硫代、Michael 加成反应在其内酰胺的 β 位引入一系列亲核性取代基来获得苦参碱的衍生物。我们共设计合成了 11 个目标化合物。其中化合物 1a~1j 是以槐果碱为起始原料,经劳森试剂硫代后,再通过 Michael 加成反应引入相应的氨基侧链而得到的。化合物 5 是以槐果碱为起始原料,经 Michael 加成反应直接引入叠氮基后再催化氢化得到的。具体的合成路线见图 1,目标化合物的理化数据见表 1。

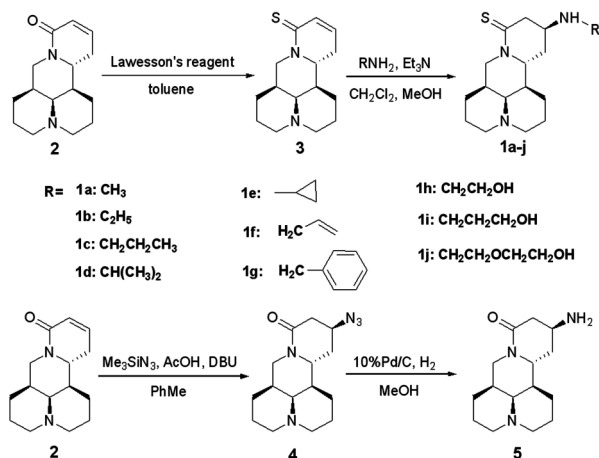


图 1 目标化合物的合成路线

Fig 1 Synthesis route of the target compounds

2.1 18-硫代槐果碱(3)的制备 将槐果碱 1.0 g (0.004 mol)劳森试剂^[11] 2.0 g(0.005 mol,购自 Alfa 公司)置于 50 ml 反应瓶中,加入 20 ml 甲苯,加热回流反应 12 h。反应完毕,减压浓缩除去溶剂,粗品

过硅胶柱,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇(25:1),得产物 0.96 g,收率 91.2%。

2.2 13-(N-甲基)-氨基-18-硫代苦参碱(1a)的制备 将18-硫代槐果碱(3)100 mg(0.000 4 mol)置于 20 ml 反应瓶中,加入 2 ml 甲胺醇溶液和 1 ml 三乙胺,室温搅拌反应 12 h。反应完毕,减压浓缩除去溶剂,粗品过硅胶柱,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇(20:1),得产物 98 mg,收率 83.5%。化合物 1a~1g 均以不同的取代胺为原料按此法合成^[12-13]。

2.3 13-叠氮基苦参碱(4)的制备 将槐果碱 1.0 g (0.004 mol)置于 50 ml 反应瓶中,抽真空,氩气保护下加入 4 ml 甲苯,室温搅拌下依次滴加乙酸 2.32 ml(0.041 mol),叠氮三甲基硅烷(TMSN₃)5.28 ml(0.040 mol),20 min 后滴加 1,8-二氮杂环[5,4,0]十一-7-烯(DBU)180 μ l (0.001 mol),反应 42 h 后,加入甲苯 20 ml,搅匀,K₂CO₃水溶液洗涤两遍,饱和食盐水洗涤 1 次,无水 Na₂SO₄干燥。浓缩后粗品过硅胶柱,洗脱剂为二氯甲烷:甲醇(40:1),得产物 0.97 g,收率83.6%。

2.4 13-氨基苦参碱(5)的制备 13-叠氮基苦参碱(4)100 mg(0.000 3 mol)置于 20 ml 反应瓶中,加入 10% Pa-C 15 mg 和 5 ml 甲醇,通入氢气,室温搅拌反应 4 h。反应完毕,抽滤,滤液浓缩后过凝胶柱,洗脱剂为甲醇,得产物 48 mg,收率 51.4%。

2.5 生物活性测试 体外抗炎活性实验委托第二军医大学药学院生化药理学教研室进行。

2.5.1 体外抑制细胞因子 TNF- α 分泌实验 采用细胞因子诱生法^[13]来测定目标化合物对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞释放 TNF- α 的半数抑制浓度(IC₅₀),具体操作方法是:将小鼠巨噬细胞系 RAW264.7(1 \times 10⁶/ml)接种于 24 孔板中培养 24 h,待细胞完全贴壁,更换 1 ml 完全培养基,同时加入药物和 LPS(终浓度 1 μ g/ml)共育 24 h,收集细胞上清液,然后用 L929 细胞测定巨噬细胞释放的细胞因子 TNF 活性,测试结果见表 2。结果显示所合成的目标化合物体外抑制 TNF 释放活性均强于苦参碱、槐果碱以及所合成的对照化合物 5,其中化合物 1f 的活性最强,IC₅₀ 达到 9.4 μ mol/L。

2.5.2 体外抑制核因子 NF- κ B 转录活性实验 采用报告基因法来测定目标化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞核因子 NF- κ B 转录活性的影响,最后获得的细胞裂解液按 Promega 双报告基因检测试剂盒说明书,用 GloMaxTM 20/20ⁿ Luminometry

System 荧光检测仪测定萤火虫荧光素酶以及内参海参荧光素酶含量, 计算两者比值作为判断终点, 测试结果见表 3。结果显示所合成的目标化合物体外均能显著抑制 LPS 诱导 RAW264. 7 细胞核因子

NF- κ B 转录活性, 部分目标化合物体外抑制 NF- κ B 转录活性强于苦参碱、槐果碱以及所合成的对照化合物 **5**, 其中化合物 **1f** 的活性最强, NF- κ B/TK 达到 $1.40 \pm 0.33 (P < 0.01)$ 。

表 1 目标化合物的物理数据
Tab 1 Physical data of title compounds

Compound	Yield (%)	Formula	MS [M+H ⁺]	¹ HNMR(CDCl ₃)
1a	83.5	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ S	294.20	5.46(dd, 1H, <i>J</i> =12.0 Hz, 3.6 Hz), 4.29(m, 1H), 3.55(t, 1H, <i>J</i> =12.6 Hz), 3.26(m, 1H), 3.00(m, 1H), 2.89-2.78(m, 3H), 2.46(s, 3H, -CH ₃), 2.18(m, 1H, NH), 2.08-1.86(m, 7H), 1.80-1.68(m, 2H), 1.67-1.52(m, 3H), 1.51-1.39(m, 3H)
1b	74.6	C ₁₇ H ₂₉ N ₃ S	308.86	5.30(dd, 1H, <i>J</i> =12.6 Hz, 4.2 Hz), 4.88(m, 1H), 3.96(t, 1H, <i>J</i> =12.9 Hz), 3.64(m, 1H), 3.46-3.43(m, 5H), 3.26(m, 2H), 2.56(m, 1H), 2.51(m, 2H, -CH ₂), 2.20(m, 1H, NH), 2.08-2.04(m, 3H), 1.95-1.72(m, 3H), 1.67-1.54(m, 5H), 1.22(t, 3H, <i>J</i> =7.14 Hz, -CH ₃)
1c	74.6	C ₁₈ H ₃₁ N ₃ S	322.64	5.44(dd, 1H, <i>J</i> =12.1 Hz, 3.8 Hz), 4.23(m, 1H), 3.51(t, 1H, <i>J</i> =12.6 Hz), 3.22(m, 1H), 2.94-2.80(m, 4H), 2.59(m, 2H, -CH ₂), 2.17(m, 1H, NH), 2.02(m, 2H), 1.91-1.88(m, 4H), 1.73(m, 2H), 1.58-1.43(m, 9H), 0.91(t, 3H, <i>J</i> =7.4 Hz, -CH ₃)
1d	74.6	C ₁₈ H ₃₁ N ₃ S	322.96	5.39(dd, 1H, <i>J</i> =12.1 Hz, 3.8 Hz), 4.31(m, 1H), 3.52(t, 1H, <i>J</i> =12.6 Hz), 3.14(m, 1H), 3.10-2.87(m, 4H), 2.21-2.11(m, 2H), 2.02(m, 6H), 1.90(m, 2H), 1.73-1.43(m, 7H), 1.15(t, 6H, <i>J</i> =5.9 Hz, -CH ₃)
1e	74.4	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ S	321.35	5.45(dd, 1H, <i>J</i> =12.1 Hz, 3.5 Hz), 4.23(m, 1H), 3.50(t, 1H, <i>J</i> =12.5 Hz), 3.25(m, 1H), 3.03(m, 1H), 2.93(m, 2H), 2.26(m, 1H), 2.14(m, 1H, NH), 2.00(m, 6H), 1.93(m, 3H), 1.74-1.45(m, 7H), 0.50-0.41(m, 4H, -CH ₂ CH ₂ -)
1f	74.8	C ₁₈ H ₂₉ N ₃ S	320.67	5.44(dd, 1H, <i>J</i> =12.2 Hz, 4.0 Hz), 5.18(dd, 1H, <i>J</i> =17.2 Hz, 1.5 Hz, ethylene-H), 5.10(dd, 1H, <i>J</i> =11.3 Hz, 1.1 Hz, ethylene-H), 4.24(m, 1H), 3.51(t, 1H, <i>J</i> =12.3 Hz), 3.26(m, 2H), 3.22(dd, 1H, <i>J</i> =17.5 Hz, 3.5 Hz, ethylene-H), 2.95(m, 2H), 2.83(m, 2H), 2.04-1.87(m, 7H), 1.72(m, 2H), 1.64-1.53(m, 4H), 1.48-1.42(m, 4H)
1g	67.4	C ₂₂ H ₃₁ N ₃ S	370.70	7.34-7.31(m, 5H, Ar-H), 5.46(dd, 1H, <i>J</i> =12.2 Hz, 3.96 Hz), 4.24(m, 1H), 3.89-3.79(m, 3H), 3.53(t, 1H, <i>J</i> =12.4 Hz), 3.22(m, 1H), 3.02(m, 2H), 2.04-1.83(m, 6H), 1.75-1.71(m, 5H), 1.60-1.42(m, 6H)
1h	71.6	C ₁₇ H ₂₉ N ₃ OS	324.49	5.44(dd, 1H, <i>J</i> =12.0 Hz, 3.6 Hz), 4.24(m, 1H), 3.65(t, 2H, <i>J</i> =4.8 Hz, -CH ₂ OH), 3.52(t, 1H, <i>J</i> =12.5 Hz), 3.22(m, 1H), 2.97(m, 2H), 2.87-2.75(m, 4H), 2.18(s, 1H), 2.05-1.87(m, 8H), 1.73(m, 2H), 1.64-1.56(m, 3H), 1.49-1.42(m, 3H), 1.28(s, 1H)
1i	72.1	C ₁₈ H ₃₁ N ₃ OS	339.38	5.43(dd, 1H, <i>J</i> =12.2 Hz, 4.1 Hz), 4.23(m, 1H), 3.79(t, 2H, <i>J</i> =5.4 Hz, -CH ₂ OH), 3.51(t, 1H, <i>J</i> =12.5 Hz), 3.21(dd, 1H, <i>J</i> =17.5 Hz, 3.7 Hz), 2.95-2.91(m, 3H), 2.87-2.80(m, 3H), 2.18-1.99(m, 2H), 1.95-1.87(m, 4H), 1.78-1.69(m, 4H), 1.64-1.54(m, 3H), 1.48-1.42(m, 3H)
1j	70.6	C ₁₉ H ₃₃ N ₃ O ₂ S	368.79	5.43(dd, 1H, <i>J</i> =12.4 Hz, 4.1 Hz), 4.23(m, 1H), 3.71(m, 2H, -CH ₂ OH), 3.61-3.56(m, 4H), 3.49(t, 1H, <i>J</i> =12.5 Hz), 3.18(dd, 1H, <i>J</i> =17.7 Hz, 3.7 Hz), 2.97(m, 2H), 2.86-2.76(m, 4H), 2.04-1.98(m, 3H), 1.90-1.85(m, 3H), 1.72(m, 2H), 1.61-1.55(m, 3H), 1.47-1.45(m, 3H)
5	51.4	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O	264.21	8.50-7.80(m, 2H), 4.11(dd, 1H, <i>J</i> =12.0 Hz, 4.2 Hz), 3.96-3.89(m, 1H), 3.53-3.45(m, 1H), 3.01(t, 1H, <i>J</i> =12.0 Hz), 2.80-2.70(m, 2H), 2.62-2.57(m, 1H), 2.40-2.35(m, 1H), 2.15-1.96(m, 3H), 1.95-1.82(m, 3H), 1.66-1.52(m, 2H), 1.50-1.26(m, 5H)

表 2 目标化合物对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放 TNF-α 的影响

Tab 2 Effects of target compounds on TNF-α production in LPS-stimulated mouse RAW264.7 cells

Compound	TNF-α activity	
	Inhibition (% , 10 μmol/L) ^a	IC ₅₀ c _B /(μmol · L ⁻¹)
Matrine	-	>200
Sophoramine	-	>200
5	-	>200
1a	9.1	93.2
1b	41.5	23.5
1c	9.6	93.5
1d	23.99	52.3
1e	16.17	119.4
1f	52.5	9.4
1g	33.9	62.0
1h	29.3	39.2
1i	22.8	53.8
1j	8.4	57.5

^a: Inhibitory rate of target compounds (10 μmol/L) against TNF-α production by LPS-stimulated mouse RAW 264.7 cells

表 3 目标化合物对脂多糖(LPS)诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 核因子 NF-κB 转录活性的影响

Tab 3 Effects of target compounds on NF-κB transcriptional activity in LPS-stimulated mouse RAW264.7 cells

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

Compound	Relative NF-κB activity (NF-κB/TK, fold)
Control	1.18 ± 0.37
LPS	11.26 ± 2.52 **
Matrine	5.11 ± 1.24 △△
Sophoramine	3.47 ± 0.47 △△
5	6.54 ± 0.06 △△
1a	3.69 ± 1.07 △△
1b	1.96 ± 0.53 △△
1c	3.40 ± 0.16 △△
1d	6.56 ± 0.47 △△
1e	7.83 ± 1.38 △△
1f	1.47 ± 0.33 △△
1g	8.39 ± 3.89 △△
1h	4.85 ± 1.97 △△
1i	3.14 ± 1.90 △△
1j	4.75 ± 1.23 △△

** P<0.01 vs control; △△ P<0.01 vs LPS

3 讨论

本课题以一种简便高效的方法设计合成了一系列新型苦参碱衍生物,活性测试结果表明所合成的目标化合物均具有较好的抗炎活性,尤其是化合物 **1f** 活性远远强于苦参碱,有进一步研究的价值。

分析目标化合物的结构与抗炎活性结果,可以初

步得到以下的构效关系:通过与对照化合物 **5** 比较可知硫原子的引入有助于活性的增强;在苦参碱 13 位引入取代氨基侧链尤其是短直链氨基取代基对活性的增强至关重要。由于化合物数量有限,该类化合物抗炎活性与侧链取代基的构效关系有待进一步研究。

志谢 感谢第二军医大学药学院生物化学教研室张俊平教授提供的药理活性数据。

[参考文献]

- [1] Jiang H, Hou C H, Zhang S B, Xie H Y, Zhou W Y, Jin Q H, et al. Matrine upregulates the cell cycle protein E2F-1 and triggers apoptosis via the mitochondrial pathway in K562 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559(2-3): 98-108.
- [2] Liu J Y, Hu J H, Zhu Q G, Li F Q, Wang J, Sun H J. Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 816-823.
- [3] Gao Y L, Li G S, Li C M, Zhu X Y, Li M, Fu C L, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sophocarpine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125: 324-329.
- [4] Ma L D, Wen S D, Zhan Y, He Y J, Liu X S, Jiang J K. Anticancer effects of the chinese medicine matrine on murine hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Planta Med*, 2008, 74: 245-251.
- [5] Azzam H S, Goertz C, Fritts M, Jonas W B. Natural products and chronic hepatitis C virus[J]. *Liver Int*, 2007, 27: 17-25.
- [6] Hu Z L, Zhang J P, Wan M B, Yu X B, Yu X B, Lin W, Qian D H, et al. Effect of matrine on lipopolysaccharide/D-galac tosamine induced hepatitis and tumor necrosis factor release from macrophages *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, 17: 351-353.
- [7] Hu Z L, Zhang J P, Qian D H. Effects of matrine on mouse splenocyte proliferation and release of interleukin-1 and -6 from peritoneal macrophages *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1996, 17: 259-261.
- [8] Zhang Y F, Wang S Z, Li Y Y, Xiao Z Y, Hu Z L, Zhang J P. Sophocarpine and matrine inhibit the production of TNF-α and IL-6 in murine macrophages and prevent cachexia-related symptoms induced by colon26 adenocarcinoma in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(13-14): 1767-1772.
- [9] Zheng P, Niu F L, Liu W Z, Shi Y, Lu L G. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 4912-4915.
- [10] Yu P F, Liu Q, Liu K, Yagasaki K, Wu E, Zhang G Y. Matrine suppresses breast cancer cell proliferation and invasion *via* VEGF-Akt-NF-κB signaling[J]. *Cytotechnology*, 2009, 59: 219-229.
- [11] Kaleta Z, Makowski B, Soś T, Dembinski R. Thionation using fluoros Lawesson's reagent[J]. *Org Lett*, 2006, 8: 1625-1628.
- [12] Liebscher J, Jagodziński T S, Sośnicki J G, et al. Diastereoselective michael addition of nitrogen and sulfur-nucleophiles to α,β-unsaturated δ-thiolactams[J]. *J Heterocycl Chem*, 1997, 34: 643-648.
- [13] Tinarelli A, Paolucci C. Stereoselective Michael addition of carbon-, nitrogen-, oxygen-, and sulfur-centered nucleophiles on enantiopure hydroxylated 6,7-dehydro-5-oxoindolizidine[J]. *J Org Chem*, 2006, 71: 6630-6633.

[本文编辑] 尹 茶