

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00413

青藤碱 N-取代衍生物的合成及抑制 NF- κ B 转录活性作用

杨帆^{1,2}, 管忠俊², 柴晓云², 吴秋业^{1,2}, 孟庆国^{1*}

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

[摘要] **目的** 设计合成一类青藤碱衍生物, 并研究其体外抗炎活性。 **方法** 以青藤碱为原料, 经脱 N-甲基、亲核取代、经典的 Click Reaction, 共合成 9 个青藤碱衍生物, 考察所得化合物体外对 NF- κ B 转染的影响。 **结果** 合成的目标化合物均为首次报道, 并经 ¹H NMR 和 LC-MS 确证结构。所得化合物体外对 NF- κ B 转染均具有一定的抑制作用, 但活性较青藤碱有所下降。 **结论** N 原子上引入较大基团或者长链可能会降低青藤碱的抗炎活性。

[关键词] 青藤碱; 修饰; NF- κ B; 消炎药

[中图分类号] R 916.63 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)04-0413-05

Synthesis of N-substituted sinomenine derivatives and its inhibitory effect against NF- κ B transcriptional activity

YANG Fan^{1,2}, GUAN Zhong-jun², CHAI Xiao-yun², WU Qiu-ye^{1,2}, MENG Qing-guo^{1*}

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

[Abstract] **Objective** To design and synthesize a series of sinomenine derivatives and to investigate their anti-inflammation activities *in vitro*. **Methods** Nine sinomenine derivatives were synthesized *via* demethylate of N atom, nucleophilic substitution and classical Click Reaction using sinomenine as the starting material. The target compounds were evaluated for their influence on NF- κ B transcriptional activity *in vitro*. **Results** All the synthesized compounds were reported for the first time, and they were confirmed by ¹H NMR and LC-MS. Biological studies showed that all the synthetic derivatives exhibited certain inhibitory effect against NF- κ B transfection *in vitro*, but was weaker than that of sinomenine. **Conclusion** Replacing N-methyl with large group or long side chain on nitrogen atom may weaken the anti-inflammatory activity of sinomenine.

[Key words] sinomenine; modification; NF- κ B; anti-inflammatory agents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(4): 413-417]

青藤碱 (sinomenine) 是从防己科植物青风藤及毛青藤的干燥藤茎中提取的异喹啉类生物碱, 它由氢菲核及乙胺桥组成, 结构与吗啡类似 (图 1)。现代药理学研究表明, 青藤碱具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等多种生物活性^[1]。但是, 青藤碱的生物半衰期较短, 生物利用度低, 临床治疗剂量偏大, 通过促进组胺释放而致皮疹、胃肠道不适等不良反应^[2], 还有对酸碱和光热不稳定、易分解等缺点^[3]。因此, 探讨青藤碱修饰和构效关系对抗炎抗风湿药物研究有重要意义。

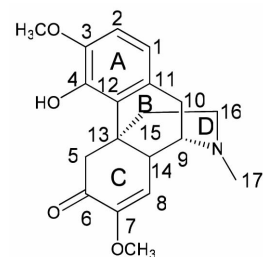


图 1 青藤碱的结构

Fig 1 Structure of sinomenine

[收稿日期] 2014-10-11 **[接受日期]** 2014-11-24

[基金项目] 上海市科委重点攻关项目 (08431903003)。Supported by Fund for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (08431903003)。

[作者简介] 杨帆, 硕士生。E-mail: YangFan_0220@hotmail.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 0535-6706022, E-mail: qingmeng@163.com

前期文献调研发现,对青藤碱的结构修饰主要集中在 A 环的 1 位、4 位,C 环的 6 位、7 位^[4-6]。D 环为 N 杂环,结构较不稳定,潘毅等^[7-8]通过苄基保护 C-4,在 N 位分别合成了一类 N-烃基和 N-磺酰基青藤碱衍生物,但未见其活性报道。

1,2,3-三氮唑作为潜在的药效团,具有抗菌^[9]、抗真菌^[10]和抗 HIV^[11]等活性。尽管 1,2,3-三氮唑不存在于天然产物中,但该结构在人体代谢过程中极其稳定。文献报道 1,4 位取代的三氮唑的强偶极矩可使其作为弱氢键供体,N-2、N-3 又可作为氢键受体^[12]。研究表明,三氮唑结构的偶极矩及氢键效应可增强与生物分子靶点的亲和力并改善溶解度^[13]。由于青藤碱有生物半衰期短、生物利用度低等缺点,为增强其体内稳定性,提高生物利用度,本课题组选择对青藤碱 N 位进行结构优化。1,2,3-三唑环是酰胺键的电子等排体,在代谢转化、氧化还原及酸碱条件下都具有相当强的稳定性,设想三唑环的引入能延长其体内代谢过程,并能增强化合物与靶酶的相互作用。本课题组通过溴化氰脱除 N 位上的 17-甲基,然后在氮原子上引入各种苄基取代的 1,2,3-三唑环,以期能增强活性,延长其体内代谢过程。

1 试剂、菌株和仪器

本实验合成所用试剂均为国药集团化学试剂有限公司或上海泰坦科技股份有限公司化学纯或分析纯试剂,柱层析硅胶为青岛海洋化工有限公司生产。核磁共振氢谱用 Bruker AC-300P 核磁共振仪测定,CDCl₃ 为溶剂,TMS 为内标;LC-MS 采用安捷伦 1100 系列。活性测试所用 RPMI 1640 培养基和脂多糖均为 Sigma 产品;所用细胞株 RAW 264.7 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法和结果

在设计路线时,我们的第一步是脱除甲基的反应。文献^[14-15]报道,氮甲基的脱除所用试剂为氯甲酸-1-氯乙酯。按照文献,我们以青藤碱为原料,以氯仿为反应溶剂,加热回流 6 h,将产物在甲醇中再加热回流 4 h,但该方法产率只有 13%。后来通过检索文献^[16-17],我们选用溴化氰来脱甲基,其产率可达 40%左右。脱甲基中间体进行亲核取代反应,再通过 Click Reaction 在青藤碱中间体上引入取代三氮唑结构^[18],具体的合成路线见图 2,目标化合物的理化数据见表 1。

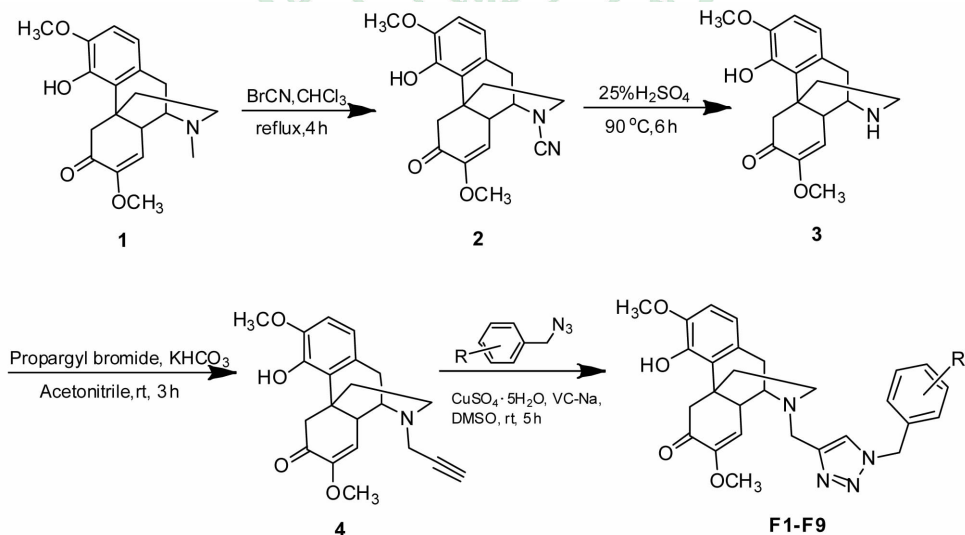


图 2 目标化合物的合成路线

Fig 2 Synthesis route of the target compounds

rt: Room temperature; DMSO: Dimethyl sulfoxide

2.1 17-脱甲基-17-氟基青藤碱(2)的制备 将溴化氰 4.24 g (0.04 mol) 溶于盛有 200 mL 经无水处理的氯仿的三颈瓶中,磁力搅拌下滴入含量为 0.2 mol/L 的青

藤碱氯仿溶液 100 mL,40 min 内滴完,加热回流反应 4 h。用 5% 的 HCl 调节 pH 为 5,水洗 3 次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得类白色固体 6.3 g。

表 1 目标化合物的物理数据

Table 1 Physical characteristics of title compounds

Compd.	R	Yield (%)	m. p. $\theta/^{\circ}\text{C}$	$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3)	LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^+$
F1	4-F	66	185.4-187.0	6.59-7.37 (7H, m, Ar-H), 5.44 (2H, s, H-20), 4.24-5.27(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.80(3H, s, H-3), 3.45(1H, s, H-8), 3.41(3H, s, H-7), 3.11-3.21 (2H, s, H-5), 2.69-3.11(2H, m, H-10), 2.46-2.54(2H, m, H-16), 2.35-2.41 (1H, m, H-9), 2.00-2.17 (1H, m, H-14)	505.2
F2	2-Br	59	186.1-187.8	6.66-7.53 (7H, m, Ar-H), 5.58 (2H, s, H-20), 4.27-5.43(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.80(3H, s, H-3), 3.46(1H, s, H-8), 3.44(3H, s, H-7), 3.15-3.27 (2H, s, H-5), 2.73-3.17(2H, m, H-10), 2.48-2.59(2H, m, H-16), 2.46-2.49 (1H, m, H-9), 2.32-2.37 (1H, m, H-14)	565.1
F3	3-Cl	76	184.6-186.5	6.61-7.65(7H, m, Ar-H), 5.58 (2H, s, H-20), 4.31-5.35(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.81(3H, s, H-3), 3.48(1H, s, H-8), 3.46(3H, s, H-7), 3.21-3.33 (2H, s, H-5), 2.77-3.16(2H, m, H-10), 2.54-2.69(2H, m, H-16), 2.47-2.51 (1H, m, H-9), 2.03-2.22(1H, m, H-14)	521.1
F4	4-NO ₂	58	188.3-189.8	6.51-7.32 (7H, m, Ar-H), 5.56 (2H, s, H-20), 4.36-5.38(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.82(3H, s, H-3), 3.52(1H, s, H-8), 3.48(3H, s, H-7), 3.19-3.27 (2H, s, H-5), 2.54-3.18(2H, m, H-10), 2.47-2.58(2H, m, H-16), 2.27-2.46 (1H, m, H-9), 2.12-2.21 (1H, m, H-14)	532.2
F5	3-CH ₃	62	183.3-184.6	6.43-7.33 (7H, m, Ar-H), 5.27 (2H, s, H-20), 4.21-5.22(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.75(3H, s, H-3), 3.42(1H, s, H-8), 3.40(3H, s, H-7), 3.17-3.26(2H, s, H-5), 2.62-3.09(2H, m, H-10), 2.46-2.54(2H, m, H-16), 2.52(3H, m, Ar-CH ₃), 2.32-2.44(1H, m, H-9), 2.05-2.16 (1H, m, H-14)	501.2
F6	2-CN	62	185.7-187.2	6.53-7.41(7H, m, Ar-H), 5.35 (2H, s, H-20), 4.22-5.28(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.79(3H, s, H-3), 3.46(1H, s, H-8), 3.41(3H, s, H-7), 3.19-3.35 (2H, s, H-5), 2.72-3.09(2H, m, H-10), 2.42-2.63(2H, m, H-16), 2.41-2.49 (1H, m, H-9), 2.02-2.23(1H, m, H-14)	512.2
F7	2-F	71	184.6-186.5	6.46-7.29 (7H, m, Ar-H), 5.25 (2H, s, H-20), 4.23-5.19(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.74(3H, s, H-3), 3.36(1H, s, H-8), 3.41(3H, s, H-7), 3.11-3.29 (2H, s, H-5), 2.64-3.09(2H, m, H-10), 2.41-2.57(2H, m, H-16), 2.31-2.48 (1H, m, H-9), 2.03-2.17 (1H, m, H-14)	505.2
F8	4-CN	69	187.2-188.7	6.57-7.39 (7H, m, Ar-H), 5.46 (2H, s, H-20), 4.38-5.34(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.81(3H, s, H-3), 3.48(1H, s, H-8), 3.42(3H, s, H-7), 3.12-3.25 (2H, s, H-5), 2.51-3.12(2H, m, H-10), 2.43-2.51(2H, m, H-16), 2.22-2.46 (1H, m, H-9), 2.13-2.20 (1H, m, H-14)	512.2
F9	3-Br	55	185.5-187.1	6.61-7.57 (7H, m, Ar-H), 5.51 (2H, s, H-20), 4.26-5.42(2H, dd, $J=15.9$ Hz, H-17), 3.80(3H, s, H-3), 3.45(1H, s, H-8), 3.44(3H, s, H-7), 3.15-3.27 (2H, s, H-5), 2.72-3.16(2H, m, H-10), 2.48-2.59(2H, m, H-16), 2.46-2.49 (1H, m, H-9), 2.32-2.37 (1H, m, H-14)	565.1

2.2 17-脱甲基青藤碱(3)的制备 将上述未经纯化的 17-脱甲基-17-氰基青藤碱(2)在 25%硫酸溶液 70 mL 中加热回流 6 h, 反应完毕, 饱和碳酸钠水

溶液中和并调节 pH 为 9, 氯仿 300 mL \times 3 萃取, 合并氯仿层, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 蒸除溶剂, 硅胶柱层析得棕色粉末 17-脱甲基青藤碱(3) 2.6 g, 产率

43%。m. p. 163.2~164.8°C; ¹HNMR (CDCl₃): 6.51~6.64 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-1, H-2), 5.46 (1H, s, H-8), 2.45~4.41 (2H, dd, *J*=15.6 Hz, H-5), 3.83 (3H, s, 3-OCH₃), 3.53 (3H, s, 7-OCH₃), 2.95~3.02 (2H, m, H-10), 2.74~2.87 (2H, m, H-16), 2.36~2.46 (1H, m, H-9), 2.15 (1H, m, H-14), 1.91~1.94 (2H, m, H-15)。

2.3 17-脱甲基-17-炔丙基青藤碱(4)的制备 将17-脱甲基青藤碱(3) 2.6 g (0.008 mol)、碳酸氢钾 0.8 g (0.008 mol) 加入三颈瓶,量取 200 mL 乙腈加入,加热至回流。将溴丙炔 2.8 g (0.024 mol) 溶于 100 mL 乙腈并滴入上述反应液,1 h 内滴加完毕,反应 3 h。反应完毕,过滤,蒸除溶剂,硅胶柱层析得棕黄色粉末 17-脱甲基-17-炔丙基青藤碱(4) 1.8 g,产率 65%。m. p. 165.4~167.2°C; ¹HNMR (CDCl₃): 6.51~6.65 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-1, H-2), 5.48 (1H, s, H-8), 2.43~4.38 (2H, dd, *J*=15.6 Hz, H-5), 3.81 (3H, s, 3-OCH₃), 3.51 (3H, s, 7-OCH₃), 3.41~3.43 (2H, m, H-17), 2.98~3.05 (2H, m, H-10), 2.75~2.87 (2H, m, H-16), 2.37~2.48 (1H, m, H-9), 2.31 (1H, s, H-19), 2.17 (1H, m, H-14), 1.92~1.96 (2H, m, H-15)。

2.4 17-脱甲基-17-(1-间氯苄基-1,2,3-三唑-4-甲基)青藤碱(F3)的制备 称取间氯溴苄 73 mg (0.35 mmol)、叠氮钠 24 mg (0.36 mmol) 加入茄形瓶中,量取 10 mL 二甲基亚砜,室温磁力搅拌反应过夜。次日,称取 17-脱甲基-17-丙炔基青藤碱(4) 100 mg (0.27 mmol)、抗坏血酸钠 14 mg,五水硫酸铜 20 mg,用 1 mL 水溶解,并迅速加入到反应茄形瓶中,继续反应 5 h。反应完毕,用 100 mL 氯仿将反应液转入至分液漏斗中,然后分别用氨水和水洗 60 mL×3,无水硫酸钠干燥氯仿层,过滤,蒸除溶剂,硅胶柱层析得棕黄色粉末 17-脱甲基-17-(1-间氯苄基-1,2,3-三唑-4-甲基)青藤碱(F3) 107 mg,产率 76%。化合物 F1、F2、F4~F9 均以不同的取代溴苄为原料按此法合成,产物均为棕黄色粉末。

2.5 体外抑制核因子(NF)-κB 转录活性实验^[19] 采用报告基因法来测定目标化合物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NF-κB 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 GloMax™ 20/20ⁿ Luminometry System 荧光检测仪测定萤火虫荧光素酶以及内参海參荧光素酶含量,计算两者比值作为判断终点,测试结果见表 2。所合成的目标化合物体外对 NF-κB 转染均具有一定的抑制作用,但活性较青藤碱有所下降。

表 2 目标化合物对脂多糖诱导小鼠巨噬细胞核因子 NF-κB 转录活性的影响

Tab 2 Effects of target compounds on NF-κB transcriptional activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells
n=3, $\bar{x} \pm s$

Group	Relative NF-κB activity (NF-κB/TK, fold)
Control	1.18±0.37
LPS	11.26±2.52**
Sinomenine	4.41±1.55△△
F1	10.07±5.50△△
F2	7.93±0.72△△
F3	8.08±0.08△△
F4	7.46±0.20△△
F5	9.19±2.07△△
F6	11.68±0.42△△
F7	9.65±0.91△△
F8	9.09±5.56△△
F9	8.54±7.70△△

LPS: Lipopolysaccharide. ** *P*<0.01 vs control; △△ *P*<0.01 vs LPS

3 讨论

虽然青藤碱衍生物的合成研究较多,但其构效关系研究并不系统。我们对青藤碱 N 原子进行修饰,以期获得活性较好的衍生物,并丰富其构效关系研究。

本课题以一种高效的方法设计合成了一类青藤碱衍生物。我们选用溴化氰脱 N 上的甲基,收率较使用传统的氯甲酸-1-氯乙酯有所提高。由于青藤碱结构中含有酚羟基,酚羟基也可以与溴化氰发生亲核取代反应生成副产物青藤碱-4-氰酸酯;因此在设计时我们选用了两种方法,一种将酚羟基进行苄基保护,一种是未保护直接进行反应,实验结果显

示两种方法的产率相当,因此为了避免保护、脱保护以及后处理的烦琐步骤,我们未对青藤碱 4-酚羟基进行保护。本实验通过 Click Reaction 将取代苄基引入目标化合物,该反应收率高,且环保,易于处理,活性测试结果表明所合成的目标化合物活性较青藤碱差,这可能是由于 N 原子处在靶分子活性腔的狭窄位置,大基团或者长链的引入阻碍了目标化合物与靶点的有效结合和作用,最终导致青藤碱衍生物抗炎活性下降。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。

[参考文献]

- [1] Liu L, Buchner E, Beitz D, Schmidt-Weber C B, Kaefer V, Emmrich F, et al. Amelioration of rat experimental arthritides by treatment with the alkaloid sinomenine[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18:529-543.
- [2] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应用[J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17: 310-313.
- [3] 傅绍萱,张士善,李蕴山,王耐勤. 青藤碱的药理作用 II. 毒性及一般药理[J]. *药学学报*, 1963, 10: 673-675.
- [4] 林红卫,李勇,朱士龙,陈迪钊,欧阳玉祝. 4-乙酰氧基-5-乙酰基-青藤碱的合成与表征[J]. *怀化学院学报*, 2013, 32: 31-33.
- [5] 林红卫,李勇,朱士龙,陈迪钊,欧阳玉祝. 取代苯偶氮基-青藤碱衍生物的合成与表征[J]. *化学研究与应用*, 2013, 25: 1575-1579.
- [6] 叶仙蓉,颜克序,吴克美,冯孝章,黄宇明,仇萍. 青藤碱衍生物的合成及其抗炎镇痛活性[J]. *药学学报*, 2004, 39:180-183.
- [7] 潘毅,李玉峰,卜清明,黄乐群,王捷,李建新. 一类 N-烃基青藤碱及其制备方法:中国,1785976A [P]. 2006-06-14.
- [8] 潘毅,李玉峰,卜清明,黄乐群,王捷,李建新. 一类 17-磺酰基青藤碱及其制备方法:中国,1785977A [P]. 2006-06-14.
- [9] Phillips O A, Udo E E, Abdel-Hamid M E, Varghese R. Synthesis and antibacterial activity of novel 5-(4-methyl-1H-1,2,3-triazole) methyl oxazolidinones[J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 3217-3227.
- [10] Aher N G, Pore V S, Mishra N N, Kumar A, Shukla P K, Sharma A, et al. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 759-763.
- [11] Giffin M J, Heaslet H, Brik A, Lin Y C, Cauvi G, Wong C H, et al. A copper(I)-catalyzed 1,2,3-triazole azide-alkyne click compound is a potent inhibitor of a multidrug-resistant HIV-1 protease variant[J]. *J Med Chem*, 2008, 51:6263-6270.
- [12] Wei J J, Jin L, Wan K, Zhou C H. Synthesis of novel d-glucose-derived benzyl and alkyl 1,2,3-triazoles as potential antifungal and antibacterial agents[J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2011, 32:229-238.
- [13] Collin M P, Hobbie S N, Böttger E C, Andrea Vasella A. Synthesis and evaluation of S- and C(1)-substituted analogues of lincomycin[J]. *Helv Chim Acta*, 2009, 92: 230-266.
- [14] Schmidhammer H, Smith C F, Erlach D, Koch M, Krassnig R, Schwetz W, et al. Synthesis and biological evaluation of 14-alkoxymorphinans. 3. Extensive study on cyprodimine-related compounds[J]. *J Med Chem*, 1990, 33: 1200-1206.
- [15] Fujii H, Imaide S, Watanabe A, Yoza K, Nakajima M, Nakao K, et al. A double decarboxylation reaction of an oxazolidinone and carboxylic acid; its application to the synthesis of a new opioid lead compound[J]. *J Org Chem*, 2010, 75: 995-998.
- [16] Kaiser C, Dandridge P A, Garvey E, Hahn R A, Sarau H M, Setler P E, et al. Absolute stereochemistry and dopaminergic activity of enantiomers of 2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-1-phenyl-1H-3-benzazepine[J]. *J Med Chem*, 1982, 25: 697-703.
- [17] Manton J, Mikklos S, Hasztafi S, Makleitit S. Synthesis of N-substituted 7 β -diprenorphine derivatives[J]. *Synthetic Communications*, 1995, 25: 829-848.
- [18] Zhang X, Hsung R P, Li H. A triazole-templated ring-closing metathesis for constructing novel fused and bridged triazoles[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2007 (23): 2420-2422.
- [19] Zhao Y, Li J, Yu K, Liu Y, Chen X. Sinomenine inhibits maturation of monocyte-derived dendritic cells through blocking activation of NF-kappa B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7: 637-645.