

## 9-取代小檗碱类似物的体外降糖活性研究

任 刚<sup>1</sup>, 张明睿<sup>2</sup>, 宋丹青<sup>1</sup>, 蒋建东<sup>1,3</sup>, 李迎红<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116081; 3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 本研究系统评价了 20 个 9-取代小檗碱类似物的糖消耗活性, 结果表明, 在 9 位引入乙氧基有利于体外糖消耗活性的增加。9-乙氧小檗碱化合物 **2a** 在多个剂量水平下显示出高于阳性对照小檗碱的活性, 在  $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下, **2a** 的活性达到小檗碱的 5.4 倍。同时, **2a** 激活 AMPK 的活性是小檗碱的 2.8 倍。因此, 化合物 **2a** 可成为进一步改造的母核。

**关键词:** 小檗碱类似物; 糖消耗; 合成

中图分类号: R914.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1282-05

## Study on hypoglycemic activity of 9-substituted berberine derivatives *in vitro*

REN Gang<sup>1</sup>, ZHANG Ming-rui<sup>2</sup>, SONG Dan-qing<sup>1</sup>, JIANG Jian-dong<sup>1,3</sup>, LI Ying-hong<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The glucose consumption activity of 9-substituted analogues of berberine was evaluated in L6 myotubes. It was found that the introduction of an ethoxy group on the 9-position of berberine was beneficial for the activity. 9-Ethoxy berberine analogue **2a** exhibited superior activity to berberine in multiple dose levels, and the activity of **2a** was 5.4 times as high as that of berberine at the dose of  $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . At the meantime, the potency on AMPK activation of **2a** was 2.8 times of that of berberine at the dose of  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Therefore, the compound **2a** is a promising scaffold for further modification.

**Key words:** berberine analogues; glucose consumption; synthesis

小檗碱 (berberine, BBR) 的降血糖作用已在临床试验中得到证实<sup>[1,2]</sup>。有研究显示, BBR 降糖作用可能与其增加肌肉和脂肪等组织中细胞对葡萄糖的摄取和利用有关; 体外的葡萄糖消耗实验 (glucose consumption assay) 能直观地反映 BBR 处理后, 这些

细胞对葡萄糖利用的增加; 而 BBR 增加组织的葡萄糖利用可能与其抑制线粒体的有氧呼吸有关<sup>[3]</sup>。另有文献报道, BBR 抑制线粒体的有氧呼吸, 将增加细胞内 AMP/ATP 的比例, 进而激活 AMPK (AMP-activated protein kinase)<sup>[4]</sup>。但是, 对于 BBR 是否通过激活 AMPK 而发挥降糖作用, 尚有争论。有研究认为, BBR 增加肌肉糖摄取的作用与 AMPK 的激活以及 Glut4 (glucose transporter type 4, 葡萄糖转运蛋白 4) 的转位有关<sup>[5]</sup>。但另有研究发现, BBR 不影响 Glut4 介导的糖摄取; 在不表达 Glut4 的肝细胞中, BBR 可以增加其糖消

收稿日期: 2017-01-10; 修回日期: 2017-01-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302823); 国家重大协同创新资助项目 (2016-I2M-1-011).

\*通讯作者 Tel: 86-10-63033012, Fax: 86-10-63165284,

E-mail: yinghongli523@aliyun.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0040

耗<sup>[3]</sup>。还有研究显示, BBR 增加细胞糖消耗的作用与 AMPK 无关<sup>[6]</sup>。为更全面地评价 BBR 衍生物的体外降糖活性, 本文同时使用了糖消耗和 AMPK 激活两个活性评价指标。

本课题组前期研究表明, BBR 结构中的 9 位引入亲电子基团有利于提升其体外降糖活性<sup>[7]</sup>。因此, 本研究以 BBR 为先导化合物, 着重考察了 9 位取代基变化对其体外降糖活性的影响。使用的 20 个 BBR 衍生物包括 9-简单醚 (4a~4e)、9-杂烷醚 (包括乙氧酰亚甲醚 4f、特戊酰氧亚甲醚 5、苄氧酰亚甲醚 6a 和异丁氧酰亚甲醚 6b)、9-酯基 (乙氧酯 6c 和简单酯 6d~6m)。同时, 本研究选取重点化合物开展了糖消耗活性的量效关系以及 AMPK 活性研究。

## 结果与讨论

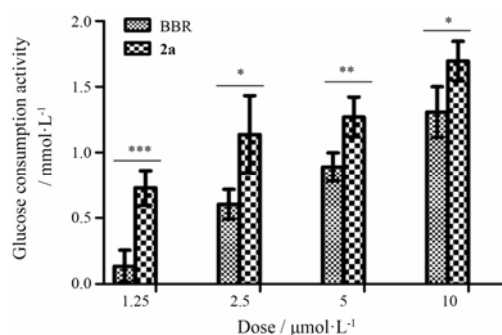
### 1 化合物的合成

本研究以 BBR 为先导化合物, 在其 9 位引入醚类取代基, 共合成 7 个 BBR 类似物并首次评价了它们对肌管细胞糖消耗水平的影响。目标化合物的合成如合成路线 1 所示。以 BBR 为起始原料, 在高温减压条件下选择性脱去 9-位甲基获得关键中间体<sup>[8]</sup>, 后者在无水碳酸钾的催化作用下与相应卤代烷反应, 以 30%~72% 的收率生成目标化合物 2a~2f (路线 A), 其中。在制备目标化合物 9-特戊酰氧亚甲醚 5<sup>[9]</sup>的过程中, 特戊酰氯与多聚甲醛加成生成特戊酸氯甲酯 3 的反应是关键步骤, 严格控制反应温度在 95~100 °C 之间有助于提高收率。3 在无水 NaI 的作用下发生碘代反应生成中间体 4, 后者与中间体 1 发生取代反应生成目标化合物 5, 总收率为 34% (路线 B)。目标化合物的结构均经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 HR-ESI-MS 确证 (表 1)。化合物 6a~6m (表 2) 按照已报道的方法合成<sup>[8]</sup>。

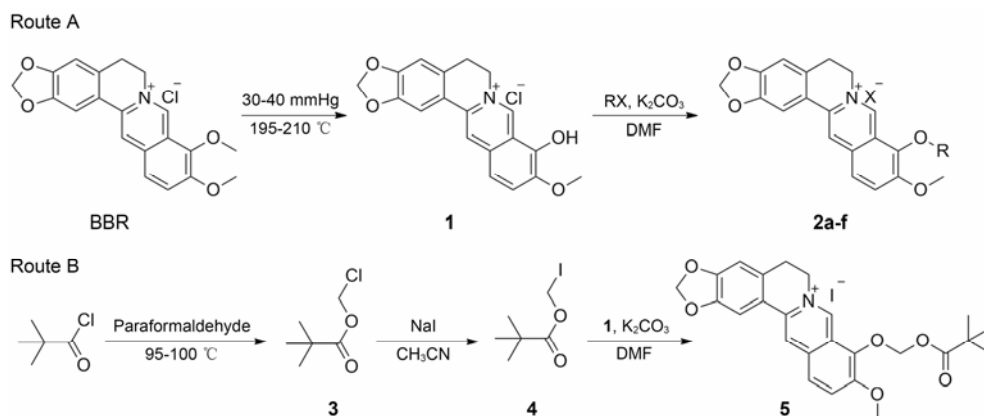
### 2 化合物增加细胞糖消耗水平的活性评价

以 L6 肌管细胞为筛选模型, BBR 为阳性对照, 本论文系统评价了 9-烷醚 (2a~2e)、9-杂烷醚 (2f、5 和 6a~6c<sup>[8]</sup>) 以及 9-酯基小檗碱衍生物 (6d~6m<sup>[8]</sup>) 在 20 μmol·L<sup>-1</sup> 的剂量下的体外糖消耗活性。目标化合物的结构与活性如表 2 所示。9-烷醚小檗碱类似物 2a~2e 的活性随烷基链长度的增加而减弱, 其中, 9-乙氧小檗碱 2a 的活性略优于 BBR。类似的, 9-杂烷醚小檗碱化合物 (2f、5 和 6a~6c) 均未显示出明显的增加糖消耗的活性, 这可能是由于碳链增加的缘故。显然, 在 9 位引入酯基不利于活性, 所形成的化合物 6d~6m 的活性均有不同程度的降低或消失。以上结果表明, 在 9 位引入乙氧基有利于体外糖消耗活性的增加。通过本轮筛选获得了阳性化合物 9-乙氧小檗碱类似物 2a。

为进一步证实 2a 的作用, 本研究比较了 BBR 和 2a 在多个剂量下的糖消耗活性。结果如图 1 所示, 在



**Figure 1** Compound 2a showed a stronger activity on glucose consumption than BBR *in vitro*. After differentiation, L6 myotubes were treated with compound 2a and BBR at the indicated dosage for 48 h independently. Glucose consumption was calculated as follows: glucose level in medium of cells treated with compound 2a or BBR minus the level of cells treated with vehicle (DMSO).  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs that of BBR

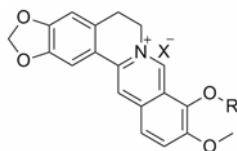


**Scheme 1** Synthetic routes of target compounds. BBR: Berberine

**Table 1** Physical properties and spectra data of compounds

Compd.	mp/°C	<sup>1</sup> H NMR		<sup>13</sup> C NMR	HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )
		(400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ		(126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ	Formula Calcd. Found
<b>2a</b>	220–222	9.74 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.19 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 4.94 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.35 (q, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.19 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.44 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).		151.0, 150.2, 148.1, 145.9, 143.0, 137.9, 133.4, 131.1, 127.0, 123.8, 122.3, 120.9, 120.7, 108.9, 105.9, 102.6, 70.4, 57.5, 55.7, 26.8, 15.9.	[M–Br] <sup>+</sup> C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub> 350.138 7 350.138 4
<b>2b</b>	235–236	9.74 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 4.94 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.19 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.88 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.04 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).		151.0, 150.4, 148.3, 145.9, 143.4, 138.1, 133.6, 131.3, 127.3, 123.9, 122.3, 121.1, 120.8, 109.1, 106.1, 102.8, 76.4, 57.7, 56.0, 27.0, 23.5, 10.9.	[M–I] <sup>+</sup> C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> 364.154 3 364.154 5
<b>2c</b>	224–226	9.77 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.14 (s, 2H), 4.94 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.19 (t, 2H, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.87 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.50 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 0.98 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).		151.1, 150.5, 148.3, 146.0, 143.5, 138.1, 133.6, 131.4, 127.3, 123.9, 122.3, 121.1, 120.9, 109.1, 106.1, 102.7, 74.6, 57.7, 55.9, 32.2, 27.0, 19.2, 14.5.	[M–Br] <sup>+</sup> C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub> 378.170 0 378.169 9
<b>2d</b>	235–236	9.74 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.19 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 4.94 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.18 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.89–1.83 (m, 2H), 1.46–1.40 (m, 4H), 0.91 (t, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz).		151.1, 150.4, 148.3, 145.9, 143.5, 138.0, 133.6, 131.3, 127.2, 123.9, 122.3, 121.1, 120.9, 109.1, 106.1, 102.7, 74.9, 57.7, 55.9, 29.8, 28.1, 27.0, 22.6, 14.7.	[M–Br] <sup>+</sup> C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub> 392.185 6 392.185 5
<b>2e</b>	212–214	9.74 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 4.94 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.25 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.18 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.89–1.83 (m, 2H), 1.67–1.61 (m, 2H), 1.46–1.40 (m, 16H), 0.84 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).		151.0, 150.4, 148.3, 145.9, 143.5, 138.0, 133.6, 131.3, 127.2, 124.0, 122.3, 121.1, 120.9, 109.1, 106.1, 102.7, 74.9, 57.7, 55.9, 32.0, 30.1, 29.7 (4), 29.5, 29.4, 27.0, 25.9, 22.8, 14.6.	[M–Br] <sup>+</sup> C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>4</sub> 490.295 2 490.294 8
<b>2f</b>	220–222	9.93 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.19 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.99 (d, 1H, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.93 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.15 (q, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.20 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.19 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H).		170.0, 150.5, 149.9, 148.3, 146.4, 142.1, 138.2, 133.5, 131.3, 127.4, 124.2, 121.8, 121.1, 120.7, 109.1, 106.1, 102.8, 69.9, 61.4, 57.8, 56.0, 27.0, 14.7.	[M–Br] <sup>+</sup> C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>6</sub> 408.144 2 408.144 0
<b>5</b>	220–222	9.78 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.23 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 8.08 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.17 (s, 2H), 5.94 (s, 2H), 4.93 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.18 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 1.05 (s, 9H).		177.3, 151.2, 150.6, 148.4, 145.4, 140.3, 138.5, 133.6, 131.4, 127.1, 125.7, 123.4, 122.4, 121.2, 121.0, 109.1, 106.1, 102.8, 89.4, 57.8, 55.9, 27.2 (2), 27.1, 27.0.	[M–I] <sup>+</sup> C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>6</sub> 436.175 5 436.175 3

**Table 2** Glucose consumption activity of BBR derivatives in L6 myotubes. <sup>a</sup>L6 myotubes were treated with or without 20 μmol·L<sup>-1</sup> BBR or its analogs for 48 h. *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$



Code	R	X	Glucose consumption <sup>a</sup>	Code	R	X	Glucose consumption <sup>a</sup>
BBR	CH <sub>3</sub>	Cl	1	<b>6d</b>	COC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Cl	0.3 ± 0.12
<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	1.06 ± 0.04	<b>6e</b>	COCH=CHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	0.15 ± 0.14
<b>2b</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	I	0.82 ± 0.05	<b>6f</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	-0.15 ± 0.13
<b>2c</b>	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	0.88 ± 0.04	<b>6g</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	0.1 ± 0.15
<b>2d</b>	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Br	0.81 ± 0.06	<b>6h</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	0.51 ± 0.04
<b>2e</b>	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	Br	-0.46 ± 0.16	<b>6i</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	0.48 ± 0.11
<b>2f</b>	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	0.67 ± 0.09	<b>6j</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	0.21 ± 0.18
<b>5</b>	CH <sub>2</sub> OOC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	I	0.42 ± 0.07	<b>6k</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	0.34 ± 0.1
<b>6a</b>	CH <sub>2</sub> COOPh	Br	0.87 ± 0.06	<b>6l</b>	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	-0.37 ± 0.03
<b>6b</b>	CH <sub>2</sub> COOCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Br	0.77 ± 0.06	<b>6m</b>	COC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Cl	-0.02 ± 0.12
<b>6c</b>	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	-0.17 ± 0.15				

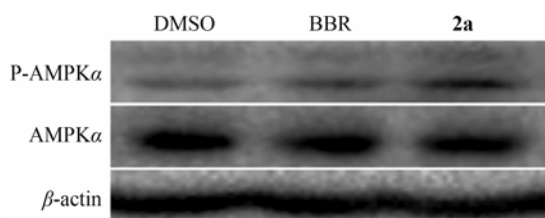
1.25、2.5、5 和 10 μmol·L<sup>-1</sup> 4 个剂量下, BBR 和 **2a** 的糖消耗活性均呈剂量依赖性的增高。同时看到, 在这 4 个剂量下, **2a** 的活性都显著优于 BBR。在 10、

5.0 和 2.5 μmol·L<sup>-1</sup> 的剂量下, **2a** 的活性较 BBR 分别提高了 30%、43% 和 88%, 而在更低的 1.25 μmol·L<sup>-1</sup> 剂量下, BBR 刚达到起效浓度, 此时 **2a** 的活性达到

了 BBR 的 5.4 倍。由于 BBR 的生物利用度较低, 其在人体各组织内可达到的药物浓度有限。2a 在低剂量下比 BBR 活性提高更显著, 提示其可能在体内发挥更好的降血糖效果, 这一结果具有一定的应用价值。

### 3 代表性化合物激活 AMPK 的活性评价

本课题组前期构建了以 AMPK 激活为评价指标的筛选模型<sup>[10]</sup>, 但截至目前, 尚未筛选出体外活性优于 BBR 的结构类似物。因此, 本文进一步研究了化合物 2a 在体外对 AMPK 的激活作用。结果如图 2 所示, 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下, 化合物 2a 激活 AMPK 的活性显著高于 BBR。通过灰度扫描和计算得到 2a 激活 AMPK 的活性是 BBR 的 2.8 倍 (详见实验部分 3), 这与糖消耗活性的变化趋势是一致的。这一结果提示, 对于评价 BBR 类似物的体外降糖活性而言, AMPK 的激活强度可以在一定程度上代表糖消耗活性的强弱。



**Figure 2** Compound 2a had a stronger potency on AMPK activation than BBR *in vitro*. HepG2 cells were starved overnight, and treated with or without  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BBR or its analog 2a for 24 h respectively. P-AMPK $\alpha$ , AMPK $\alpha$ , and the reference protein  $\beta$ -actin expression were detected by Western blot. The bands were scanned and the potency on AMPK activation (P-AMPK $\alpha$ / $\beta$ -actin ratio) was calculated as mentioned in the methods

### 4 小结

本研究系统评价了 20 个 9-取代小檗碱类似物的糖消耗活性。结果表明, 在 9 位引入乙氧基有利于体外糖消耗活性的增加。9-乙氧小檗碱化合物 2a 在 5 个剂量水平 ( $1.25$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $10$  和  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 下的糖消耗活性均高于阳性对照 BBR; 在  $1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下, 2a 的糖消耗活性达到 BBR 的 5.4 倍。同时, 2a 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量下激活 AMPK 的活性是 BBR 的 2.8 倍。因此, 化合物 2a 是活性更优的 BBR 衍生物, 可作为进一步改造的母核。

### 实验部分

熔点用 CXM-300 型精密熔点仪测定, 温度未校正; 核磁共振氢谱用 Varian Mercury Plus 400 测定

(400 MHz), 核磁共振碳谱用 Bruker Avance III 500 核磁共振仪测定 (126 MHz), 溶剂均为 DMSO-*d*<sub>6</sub>, TMS 为内标; HR-MS 用 AutospecUltima-TOF 质谱测定仪测定; 荧光检测用 ZF-20D 暗箱式紫外分析仪; 薄层色谱 (TLC) 采用 E-Merck 公司预铺硅胶铝箔卷; 所用试剂为 Acros 公司和国产分析纯或化学纯的试剂。

### 1 化学合成

**1.1 2,3-亚甲二氧基-9-苄氧-10-甲氧基原小檗碱溴化物 (2a)** 室温下, 将 **1**<sup>[8]</sup> ( $0.50 \text{ g}$ ,  $1.4 \text{ mmol}$ ) 混悬于 DMF ( $50 \text{ mL}$ ) 中, 加入无水  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ( $0.15 \text{ g}$ ,  $1.1 \text{ mmol}$ ) 和溴乙烷 ( $2 \text{ mL}$ ), 升温至  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  继续反应  $10 \text{ h}$ , 薄层色谱监测反应完全。减压浓缩除去溶剂, 残余物用稀盐酸酸化, 抽滤收集析出的黄色固体, 以二氯甲烷-甲醇 ( $40:1$ ) 为流动相用减压快速硅胶柱分离纯化, 无水乙醇重结晶, 得到黄色固体 2a ( $0.14 \text{ g}$ ,  $33\%$ )。

以 **1** 和卤代烷或溴乙酸乙酯为原料, 参照化合物 2a 制备方法, 得化合物 2b~2f。

**1.2 2,3-亚甲二氧基-9-丙氧-10-甲氧基原小檗碱碘化物 (2b)** 以 **1** 和碘丙烷为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成, 目标产物为黄色固体, 收率  $72\%$ 。

**1.3 2,3-亚甲二氧基-9-丁氧-10-甲氧基原小檗碱溴化物 (2c)** 以 **1** 和溴丁烷为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成, 目标产物为黄色固体, 收率  $72\%$ 。

**1.4 2,3-亚甲二氧基-9-戊氧-10-甲氧基原小檗碱碘化物 (2d)** 以 **1** 和溴戊烷为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成, 目标产物为黄色固体, 收率  $45\%$ 。

**1.5 3-亚甲二氧基-9-十二烷氧-10-甲氧基原小檗碱溴化物 (2e)** 以 **1** 和 1-溴代十二烷为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成, 目标产物为黄色固体, 收率  $30\%$ 。

**1.6 2,3-亚甲二氧基-9-乙氧酰亚甲氧-10-甲氧基原小檗碱溴化物 (2f)** 以 **1** 和溴乙酸乙酯为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成, 目标产物为黄色固体, 收率  $58\%$ 。

**1.7 2,3-亚甲二氧基-9-特戊酰氧亚甲氧-10-甲氧基原小檗碱碘化物 (5)** 将多聚甲醛 ( $0.16 \text{ g}$ ,  $5.3 \text{ mmol}$ )、氯化锌 ( $0.072 \text{ g}$ ,  $0.53 \text{ mmol}$ ) 与特戊酰氯 ( $0.60 \text{ mL}$ ,  $5.3 \text{ mmol}$ ) 加入至  $25 \text{ mL}$  茄形瓶中, 反应体系升温至  $95\sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$  反应  $4 \text{ h}$ , 逐渐变澄清。向反应体系中加入无水乙腈 ( $12 \text{ mL}$ ), 同时加入 NaI ( $0.80 \text{ mL}$ ,  $5.3 \text{ mmol}$ ), 室温搅拌过夜, 生成中间体 **4**。以 **1** 和 **4** 为原料, 以类似于化合物 2a 的方法合成目标产物 **5**, 为黄色固体, 收率  $34\%$ 。

## 2 糖消耗活性的测定和计算

使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 L6 细胞。检测糖消耗时, 将 L6 细胞接种于 96 孔板, 用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养 5~7 天, 期间每隔两天换液一次。药物溶解于 DMSO 后处理肌管细胞。检测时, 取 2  $\mu\text{L}$  培养基上清, 加入 200  $\mu\text{L}$  检测试剂 (Randox 公司, 葡萄糖氧化法), 通过标准曲线计算出培养基的葡萄糖浓度, 进而得到细胞消耗的葡萄糖含量, 即糖消耗量。加药组的糖消耗量减去溶剂对照组的糖消耗量, 得到的差值, 即药物增加的糖消耗值, 作为药物的糖消耗活性。把 BBR 组的活性值设为 1, 其他药物的活性表示为该药物处理组增加的糖消耗值与 BBR 处理组增加糖消耗值的比值。

## 3 AMPK 活性的检测和计算

HepG2 细胞使用含 10% 胎牛血清的 EMEM 培养基培养。细胞接于 6 孔板 24 h 后, 换用无血清的 EMEM 培养基继续培养过夜。药物溶解于 DMSO 并处理细胞 18 h 后, 裂解细胞并进行 SDS-PAGE 电泳。经转印 (Mini-PROTEAN 转印系统, Bio-rad 公司) 后, 蛋白被转至 PVDF 膜上, 并分别与 P-AMPK $\alpha$ 、AMPK $\alpha$  和  $\beta$ -actin 抗体及对应的二抗 (所有抗体购自 Cell Signaling 公司) 结合。最终经过 ECL 显影和灰度扫描得到 Western blot 的条带影像和蛋白表达的相对定量值 (Image Lab 4.0 软件, Bio-rad 公司)。AMPK 活性  $\alpha$  亚基 172 位苏氨酸的磷酸化即 P-AMPK $\alpha$  的表达水平可以代表 AMPK 的激活水平<sup>[5]</sup>。因此用 P-AMPK $\alpha$  与  $\beta$ -actin 灰度值的比值来表示化合物激活 AMPK 的活性强弱。

对于 DMSO 对照, BBR 和 **2a** 处理组 P-AMPK $\alpha$  和  $\beta$ -actin 条带的灰度扫描值分别为 78、157.2、313.4, 以及 2 006.3、1 808.7、1 810.2; 则对应二者的比值 P-AMPK $\alpha$ / $\beta$ -actin 分别为 0.039 (78/2 006.3)、0.087 (157.2/1 808.7) 和 0.173 (313.4/1 810.2)。BBR 和 **2a** 加药组的 P-AMPK $\alpha$ / $\beta$ -actin 比值减去 DMSO 对照组的比值, 即为药物激活 AMPK 的活性值, 则 BBR 和 **2a** 激活 AMPK 的活性值分别为 0.048 (0.087~0.039) 和 0.134 (0.173~0.039)。将 BBR 处理组的活性值设为 1, 则 **2a** 的活性值为 2.8 (0.134/0.048)。

致谢: 核磁共振氢谱和碳谱由中国医学科学院药物研究所分析测试中心测定, 高分辨质谱由中国医学科学院医药生物技术研究所分析测试中心测定。

## References

- [1] Zhang H, Wei J, Xue R, et al. Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression [J]. *Metabolism*, 2010, 59: 285–292.
- [2] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10: 1344–1351.
- [3] Yin J, Gao Z, Liu D, et al. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294: E148–E156.
- [4] Turner N, Li JY, Gosby A, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 1414–1418.
- [5] Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. *Diabetes*, 2006, 55: 2256–2264.
- [6] Xu M, Xiao Y, Yin J, et al. Berberine promotes glucose consumption independently of AMP-activated protein kinase activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e103702.
- [7] Ren G, Wang Y, Li Y, et al. Structure-activity relationship of berberine derivatives for their glucose-lowering activities [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10: 5054–5060.
- [8] Li YH, Li Y, Yang P, et al. Design, synthesis, and cholesterol-lowering efficacy for prodrugs of berberrubine [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 6422–6428.
- [9] Iyer PR, Yu D, Ho NH, et al. Synthesis of iodoalkylacylates and their use in the preparation of s-alkyl phosphorothiolates [J]. *Syn Commun*, 1995, 25: 2739–2749.
- [10] Wang YX, Kong WJ, Li YH, et al. Synthesis and structure-activity relationship of berberine analogues in LDLR up-regulation and AMPK activation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 6552–6558.